

162



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS FUNCIONAL PRELIMINAR DE UN GEN MADS-box EN EL DESARROLLO DE LA RAIZ DE Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ENRIQUE ORTIZ MORENO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

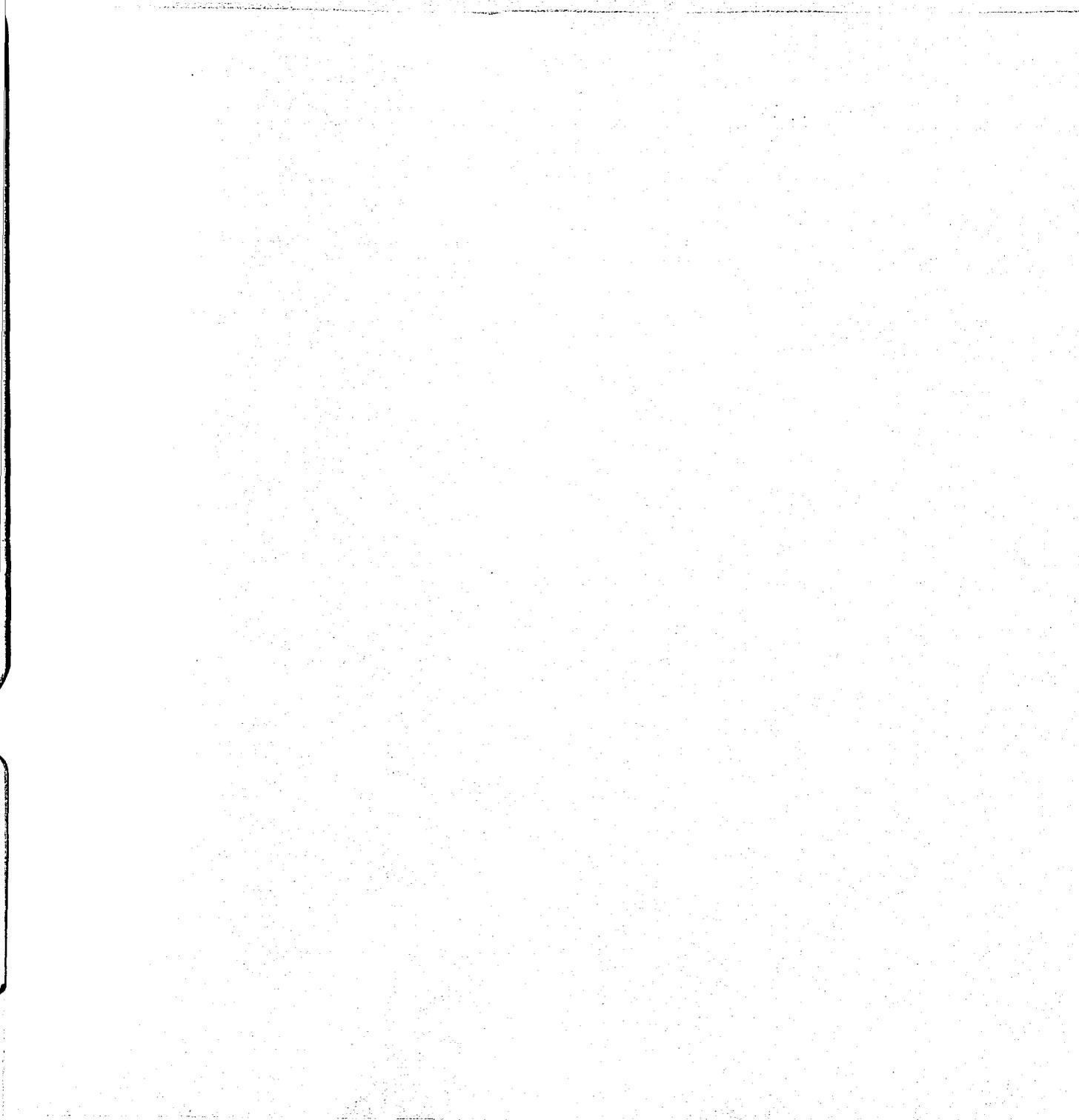


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Análisis funcional preliminar de un gen MADS-box en el
desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

realizado por Enrique Ortiz Moreno

con número de cuenta 9653300-6, quién cubrió los créditos 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. Joseph G Dubrovsky Jankovsky

Propietario

Dra. Caroline Nicole Laura Burgeff D'Hondt

Suplente

Dra. Gladys Iliana Cassab López

Suplente

Dra. Alicia Gamboa de Buen

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

PRÓLOGO

Este escrito es el resultado del trabajo de investigación que he realizado en el Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Elena Alvarez-Buylla. Los resultados que presento son de carácter preliminar, y forman parte de un proyecto más amplio en el cual sigo participando. Este trabajo fue posible gracias al apoyo de CONACYT, DGAPA, DGEF y del Departamento de Ecología Evolutiva del Instituto de Ecología de la U.N.A.M.

Quiero agradecer primero, con gran admiración y de manera muy especial, a Elena Alvarez-Buylla por el apoyo y el gran interés mostrado a lo largo de este trabajo. Además agradezco a los sinodales por compartirme sus conocimientos y opiniones a través de pláticas muy constructivas. En particular, a Joseph Dubrovsky por haber contribuido de manera directa con su experiencia y sus ideas en este trabajo. También quiero agradecer a Caroline Burgeff por sus enseñanzas en el laboratorio, incluida la paciencia.

Agradezco también a todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas por compartir su experiencia y amistad: Caroline Burgeff, Bárbara Ambrose, Francisco Vergara, Rosalinda Tapia, León Martínez, Amanda Ochoa, Francisca Acevedo, Alicia Gamboa, Miguel Ángel Soto, Mario Izaguirre, Ignacio Tlatelpa, Julio Páez, Angeles Cortés, Arturo Pérez y a todos los demás.

Quiero agradecer a mis maestros de la carrera: Michele Gold-Morgan, Daniel León, Aurora Zlotnik, David Benavides, Enrique Ortiz, Francisco Vega-Vera, Miguel Ángel Palomino, Víctor Valdés, Saúl Cano y Rosa Zugazagoitia.

Quiero dar las gracias muy especialmente a mi mamá, a mi papá y a mi hermano por todo el apoyo recibido y por el interés en las cosas que hago. Además, agradezco a toda la familia Ortiz y a la familia Moreno por los momentos que hemos pasado juntos.

Además, agradezco a Rodrigo Reyes, Santiago Casares, Kyzza Terrazas, Eneas Aguirre, Juan Pablo García, Ana Carolina Martínez, Amanda Ochoa, Pedro Cerrutti, Iván Tubert, Christian Rivera, Francisco Rivera, Mariana Silva, Marcela San Giacomo, Adriana Fuentes, Angélica Leo, Helena Chávez, Jorge Alberto Tovilla, Sara Schulz, Cristina Paoli, Daniel Cosío, Ana Cecilia Terrazas, Jimena Oliver, Julia Pozas, Eria Rebollar, Benjamín Quiroz, Jose Ignacio Saldaña, Paola de los Heros, Margarita Kiewek, Alejandra García-Naranjo, Nuria Flores, Misha Charreire, Lorena Gómez, Christian Stephan-Otto, Alejandra Valero, Laiza Dorcé, Ivalú Cacho, Julieta Rosell, Gabriel García, Alejandro Ocegüera y al resto de los amigos. Por último, a la Comunidad de la Herminio Almendros y a mis maestros.

RESUMEN

Los genes de la familia MADS-box codifican para factores de transcripción que juegan un papel funcional importante en el desarrollo de las plantas. Algunos de estos genes determinan la identidad de los órganos florales; otros participan en la diferenciación de ciertos tipos celulares; en regular los patrones normales de división, expansión y diferenciación celular de algunos tejidos; y en la transición entre el desarrollo vegetativo y el reproductivo. Se ha demostrado que los genes MADS-box son relevantes en el desarrollo de las estructuras en las cuales se expresan. En *Arabidopsis thaliana* —especie modelo en plantas para estudios de genética molecular— existen clados monofiléticos de genes MADS-box que se expresan en tejidos vegetativos, algunos específicamente en la raíz. Actualmente se conoce muy poco acerca de la función de los genes MADS-box en el desarrollo de estructuras vegetativas.

AGL14 es un gen MADS-box que se expresa en la raíz de *Arabidopsis thaliana*, cuyo papel en el desarrollo no se conoce. Con un enfoque de genética inversa, en este trabajo se identificaron dos líneas mutantes homocigas de *Arabidopsis thaliana* (denominadas W14.5-1 y W14.2-6), generadas previamente por la inserción de un transposón en *AGL14*. Se comprobó que W14.5-1 es nula en la expresión de mRNA, mientras que W14.2-6 presenta una baja expresión en comparación con el tipo silvestre (WT). Con estas líneas mutantes se inició la caracterización funcional de *AGL14*. Se identificó un medio en el cual las raíces de las plantas mutantes poseen una tasa de crecimiento menor que WT. A partir de análisis celulares, se determinaron las causas de esta disminución: (1) la raíz de W14.5-1 posee una tasa de producción celular menor que la de WT, debido a una reducción en el número de células meristemáticas; (2) la zona de elongación de W14.5-1 es más corta que la de WT; (3) en la raíz de W14.5-1 se producen células cuya longitud final al diferenciarse es menor. Adicionalmente, en las células de la columela se observaron probables defectos en los planos de división, en la elongación y en la diferenciación celular.

Por otro lado, en la región cis-regulatoria de *AGL14* se encontraron motivos que en otros genes se relacionan con la respuesta a hormonas, principalmente a auxinas. *AGL14* podría participar en respuesta a auxinas en la determinación del número de células meristemáticas, en el mantenimiento de los planos de división correctos de la columela y en la elongación adecuada de las células diferenciadas. Es necesario seguir realizando estudios funcionales de *AGL14* y de otros genes MADS-box que se expresan en la raíz de *Arabidopsis thaliana*, para entender el papel de esta familia multigénica en el desarrollo de estructuras vegetativas.

ABREVIATURAS

AG	AGAMOUS
ABA	Ácido abscísico
BSA	Albúmina sérica de bovino
cDNA	Acido desoxiribonucleico complementario
Col	Columbia
CLV3	CLAVATA3
ddH ₂ O	Agua bidestilada
DEF	DEFICIENS
DNA	Acido desoxiribonucleico
DEPC	Dietil Policarbonato
EtOH	Etanol (Alcohol etílico)
MCM1	MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
MS	Murashige / Skoog
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QC	Centro quiescente
RAM	Meristemo apical de raíz
SAM	Meristemo apical de tallo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa
RNA	Acido ribonucleico
SRF	SERUM RESPONSE FACTOR
WT	Tipo silvestre
WUS	WUSCHEL
WWW	World Wide Web

CONTENIDO

PÁGINA

PÁGINA DE APROBACIÓN	
PRÓLOGO	
RESUMEN	
ABREVIATURAS	
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Evolución, desarrollo y genética molecular	1
1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo en plantas	3
1.3 Genes MADS-box en plantas	5
1.4 La raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2. ANTECEDENTES	18
3. OBJETIVOS	20
4. HIPÓTESIS	21
5. MATERIAL Y MÉTODO	
5.1 Caracterización molecular de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1	22
5.2 Caracterización fenotípica de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1	26
5.3 Búsqueda de motivos en la secuencia cis-regulatoria de <i>AGL14</i> asociados a procesos de señalización	32
6. RESULTADOS	
6.1 Caracterización molecular de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1	33
6.2 Caracterización fenotípica de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1	37
6.3 Búsqueda de motivos en la secuencia cis-regulatoria de <i>AGL14</i> asociados a procesos de señalización	54
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES	70
ANEXO A. PROTOCOLOS	72
ANEXO B. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS	79
REFERENCIAS	80

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Evolución, desarrollo y genética molecular

Uno de los problemas centrales de la Biología Moderna se refiere a las causas que originan la diversidad de formas que existen en la naturaleza. La ontogenia de un organismo es el resultado de la expresión coordinada de los genes que, en respuesta a señales externas e internas al individuo, determinan las características celulares que dirigen la morfogénesis. A la par del progreso de metodologías biocomputacionales y de análisis filogenéticos, el enfoque molecular ha permitido que la biología del desarrollo y la biología evolutiva empiecen a unificarse en años recientes (Tautz y Schmid, 1998). De esta manera, no sólo está regresando la idea de que la evolución es el producto de cambios heredables en el desarrollo, sino que incluso se ha mostrado que en algunos casos la variación morfológica discontinua, producida por mutaciones homeóticas, puede ser un elemento causal de la macroevolución (Vergara-Silva y Alvarez-Buylla, 2001).

En este contexto, se puede afirmar que la diversidad de fenotipos que existen en la naturaleza tiene causas próximas y causas últimas. Las primeras se refieren a las redes de regulación genética que guían el desarrollo, y las segundas a los cambios evolutivos de esas redes (Baum, 1998). Se ha demostrado que los reguladores de la transcripción juegan un papel muy importante en el desarrollo de los individuos (Schwechheimer y Bevan, 1998). Cambios en los elementos cis-regulatorios (e.g. promotores) que modifiquen el patrón de expresión espacio-temporal de los genes que regulan la transcripción, pueden ser uno de los

mecanismos genéticos más importantes en el origen evolutivo de fenotipos novedosos (Doebley y Lukens, 1998; Wang *et al.*, 1998, Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a). Igualmente, la duplicación de estos reguladores junto con la diversificación de sus regiones codificantes y no codificantes podrían modificar los fenotipos (Ng y Yanofsky, 2001). Dentro de estos genes reguladores, destacan de manera muy importante aquellos que codifican para factores de transcripción.

La genética molecular del desarrollo ha permitido la caracterización de genes involucrados en la regulación de procesos ontogenéticos. Esto ha sido posible gracias al uso de mutantes con defectos específicos en su desarrollo. (Scheres y Wolkenfelt, 1998; Tautz y Schmid, 1998). Existen dos aproximaciones diferentes para entender la contribución de un gen en estos procesos. La "clásica" se basa en la identificación de un fenotipo mutante, y en la localización posterior del gen interrumpido que causa dicho cambio en el desarrollo. Por otro lado, la aproximación "inversa" parte de la interrupción de un gen cuya secuencia es conocida para analizar posteriormente el fenotipo resultante.

La duplicación génica ha sido uno de los principales factores en la evolución de los genomas de las plantas. Por lo tanto, genes muy cercanos filogenéticamente pueden compartir la misma función. En consecuencia, el fenotipo de un mutante de pérdida de función total sólo puede ser apreciado cuando ambos genes se encuentran inactivados (Smyth, 2000). En este caso, la aproximación clásica puede no ser la adecuada. Sin embargo, a través de la genética inversa se pueden generar mutantes múltiples que revelen las funciones de genes total o parcialmente redundantes.

1.2 *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo en plantas

A pesar de que a lo largo del tiempo se ha estudiado el desarrollo de una gran variedad de organismos, la gran mayoría del conocimiento acerca de los mecanismos moleculares del desarrollo proviene de un número pequeño de especies modelo (Wolpert *et al.*, 1998). Dentro del grupo de las plantas, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ha sido utilizada por más de 55 años en experimentos de genética clásica. Hace unos 15 años, esta planta fue adoptada por algunos laboratorios en estudios de genética molecular para resolver problemas de fisiología, bioquímica y desarrollo (Meyerowitz, 1989). Las razones del interés en esta planta son que, además de poseer un desarrollo, fisiología y respuestas al ambiente típicas de una angiosperma, posee propiedades en su ciclo de vida y en su organización genómica que la hacen conveniente para el uso de metodologías empleadas por la genética molecular (Meyerowitz, 1989).

El tamaño pequeño de los individuos de esta especie y su capacidad para crecer en luz fluorescente constante a temperatura ambiente, tanto en suelos como en medios de cultivo estériles, hacen que su mantenimiento en cámaras ambientales sea fácil y barato. Además, el reducido tamaño de la semilla permite almacenarlas en pequeños volúmenes y realizar mutagénesis a gran escala (Meyerowitz, 1989). La duración de cada generación es de aproximadamente seis semanas, lo cual permite la regeneración de semillas en tiempos relativamente cortos.

Esta planta produce flores perfectas que se autofecundan y que tienden a no polinizarse cuando están abiertas. Una ventaja de esto es que los mutantes

pueden ser propagados como líneas puras (Howell, 1998). La flor de *A. thaliana* produce un fruto que contiene alrededor de 50 semillas. Cada individuo produce de cientos a miles de semillas. Estos rasgos permiten obtener una gran cantidad de individuos en cada generación, lo cual es muy conveniente para análisis de segregación genética después de realizar mutagénesis o cruza.

El genoma haploide consta de cinco cromosomas pequeños, con un tamaño genómico total de unos 125 megabases (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), lo que lo hace uno de los genomas más pequeños de las plantas superiores (Meyerowitz, 1989; Meyerowitz, 1994). Actualmente ya se cuenta con la secuenciación completa de su genoma, cuyos análisis han revelado que posee una cantidad relativamente baja de DNA repetitivo disperso (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Esto permite una búsqueda constante y rápida de librerías genómicas con un esfuerzo relativamente bajo. Sin embargo, *A. thaliana* tiene un número elevado de genes duplicados, lo que limita el número de mutaciones que pueden ser fácilmente reconocidas partiendo del fenotipo de mutantes sencillos (Howell, 1998).

Además de las ventajas anteriores, es posible introducir fragmentos de DNA al genoma de esta planta, ya sean genes heterólogos clonados de otros organismos o secuencias de su propio genoma. Para ello se utiliza el plásmido Ti como vector y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como agente infeccioso (Meyerowitz, 1989). Esto ha permitido generar mutantes por inserción de T-DNA así como realizar experimentos de sobre-expresión, las cuales son estrategias muy útiles en las caracterizaciones funcionales de genes.

1.3 Genes MADS-box de plantas

Entre los factores de transcripción que han demostrado ser relevantes en el desarrollo de las plantas, destacan de manera muy importante los codificados por los genes MADS-box. Estos genes están relacionados evolutivamente entre sí, y se encuentran presentes en animales, plantas y hongos (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Baum, 1998). Los genes MADS-box forman una familia multigénica debido a que codifican para proteínas que comparten un dominio de unión a DNA llamado MADS. Este término fue construido a partir de las iniciales de los primeros miembros descritos de la familia: M*C*M1 de *Saccharomyces cerevisiae*, A*G* de *Arabidopsis thaliana*, D*E*F de *Antirrhinum majus* L. y S*R*F de *Homo sapiens*. (Vergara-Silva *et al.*, 2000; Jack, 2001; Ng y Yanofsky, 2001).

Existen dos tipos de proteínas MADS-box que difieren entre sí en la secuencia consenso de aminoácidos del dominio MADS. El tipo I (SRF-like) y el tipo II (MEF2-like) son resultado de una duplicación génica ancestral anterior a la divergencia de las plantas y los animales (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b).

En plantas, la mayoría de los genes MADS-box codifican para proteínas tipo II (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b). En este grupo de organismos, los genes que codifican para el tipo I no han sido caracterizados funcionalmente hasta este momento. Las proteínas MADS-box tipo II poseen una estructura modular estereotípica llamada tipo MIKC (figura 1). En ella se puede reconocer en el extremo amino-terminal el dominio MADS de 60 aminoácidos, que además de mediar la unión al DNA, tiene una función relacionada con la dimerización de la proteína. Asimismo, existe una segunda región altamente conservada llamada

dominio K, de 70 aminoácidos. Este segundo dominio forma un motivo tipo *coiled-coil* que tiene una similitud con la estructura secundaria de la queratina, una proteína de citoesqueleto animal. Este dominio parece estar involucrado en interacciones proteína-proteína. Los dominios MADS y K se encuentran conectados por la región I, la cual está moderadamente conservada y parece también estar relacionada con interacciones proteína-proteína. Finalmente la región C es un dominio de transactivación putativo que está poco conservado entre las secuencias, y que funciona como estabilizador de las interacciones proteína-proteína (Vergara-Silva *et al.*, 2000; Jack, 2001; Ng y Yanofsky, 2001;).

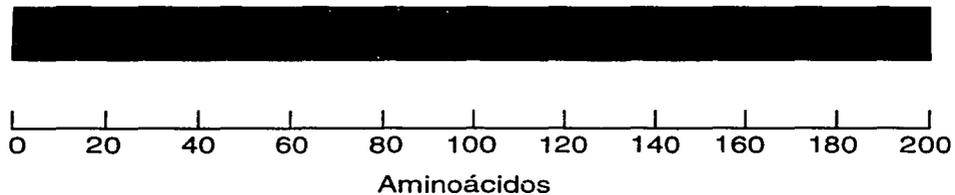


Figura 1. Estructura modular de las proteínas MADS-box de plantas tipo II.

Los análisis genéticos y moleculares de los mecanismos que controlan la morfogénesis floral en *Arabidopsis thaliana* y en *Antirrhinum majus* han permitido el planteamiento del modelo ABC para la especificación de la identidad de los órganos florales. En este modelo, la actividad combinada de un pequeño número de genes es responsable de determinar la identidad de los órganos de la flor, y cambios en su expresión pueden dar origen a mutantes homeóticos. Todos los genes comprendidos en este modelo, a excepción de uno, pertenecen a la familia MADS-box (Coen y Meyerowitz, 1991; Vergara-Silva *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se han realizado otros estudios funcionales de genes que pertenecen a esta familia, basados en mutantes con fenotipos de pérdida y de ganancia de función. De esta manera, se ha demostrado que los genes MADS-box son importantes en la determinación de la identidad y del tiempo de formación de los meristemas de inflorescencias y florales, regulando la transición entre el desarrollo vegetativo y el reproductivo (Bowman *et al.*, 1993; Blázquez *et al.*, 1998; Michaels y Amasino, 1999; Ferrándiz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Onouchi *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). Otros miembros participan en la diferenciación de tipos celulares al determinar apropiadamente la zona de dehiscencia de los frutos (Liljegren *et al.*, 2000). Además, algunos regulan los patrones normales de división celular, expansión y diferenciación en las valvas de las vainas y el desarrollo de las hojas (Gu *et al.*, 1998; Ferrándiz *et al.*, 2000). En resumen, los genes MADS-box juegan un papel funcional importante en el desarrollo de las plantas y en general en el de los eucariontes (Riechmann y Meyerowitz, 1997; Theissen *et al.*, 2000).

A partir de análisis filogenéticos, se ha mostrado que los genes MADS-box de plantas que se expresan en estructuras reproductivas forman grupos monofiléticos (subfamilias) y comparten funciones similares (Purugganan *et al.*, 1995; Theissen *et al.*, 1996). Recientemente, se ha mostrado también que hay grupos monofiléticos de genes expresados en estructuras vegetativas (figura 2). Análisis de mapeo de patrones de expresión sobre la filogenia de la familia MADS-box de *Arabidopsis thaliana* han mostrado que los ancestros hipotéticos tenían patrones de expresión generalizados a partir de los cuales evolucionaron genes

con patrones más específicos tanto en estructuras reproductivas como vegetativas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a).

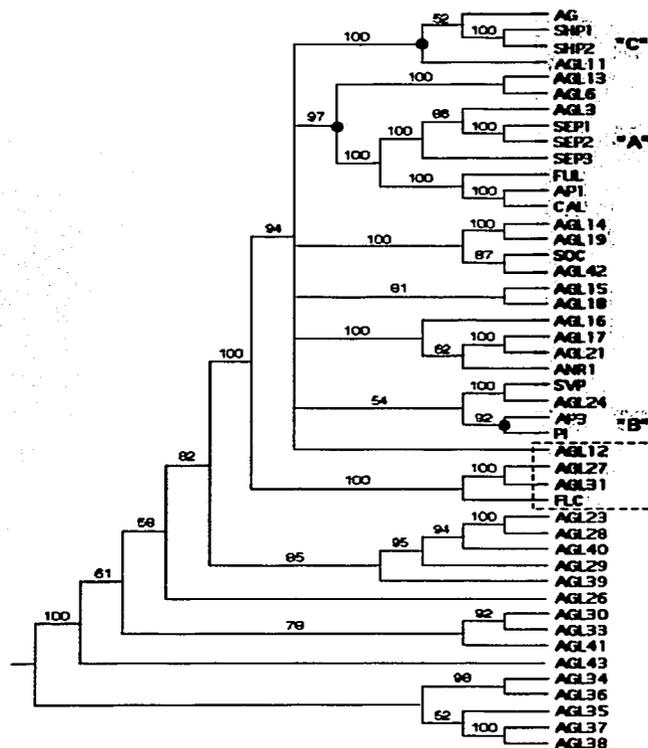


Figura 2. Filogenia de los genes MADS-box de *Arabidopsis thaliana*. El color indica la expresión de mRNA de los genes en estructuras reproductivas (rojo), vegetativas (verde) o azul (ambos). Para las proteínas codificadas por los genes enmarcados en el cuadro azul se predice un motivo *coiled-coil* en el dominio K (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b). Las proteínas codificadas por los genes enmarcados en el cuadro con líneas punteadas poseen aminoácidos conservados en el dominio K, aunque no se predicen estructuras tipo *coiled-coil*. Los clados A, B y C se indican en el árbol con puntos rojos en sus nodos y con la letra correspondiente a la derecha. (Tomada de Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a).

Actualmente se conoce muy poco acerca de la posible función de los genes MADS-box en el desarrollo de estructuras vegetativas. Los patrones de expresión, junto con los análisis filogenéticos de los genes MADS-box, pueden ser una guía para identificar genes con función redundante y para dirigir posteriormente los análisis genéticos, funcionales y evolutivos (Vergara-Silva *et al.*, 2000; Burgeff *et al.*, 2002).

Hasta la fecha, todos los genes MADS-box caracterizados funcionalmente han demostrado ser fundamentales en el desarrollo de las estructuras en las que se expresan. Por esto se ha sugerido que los patrones de expresión de los genes MADS-box son una guía para determinar el lugar en el que se lleva a cabo la función de las proteínas codificadas por ellos (Rounsley *et al.*, 1995; Burgeff *et al.*, 2002). Además, en algunos casos los patrones de expresión de los genes MADS-box han permitido predecir el tiempo, el lugar y el tipo de efecto fenotípico del mutante por pérdida de función correspondiente (Gu *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 2000).

Uno de los grupos monofiléticos de genes MADS-box que se expresan principalmente en tejidos vegetativos y algunos específicamente en raíz se conoce como tipo *TM3* (Decroocq *et al.*, 1999; Rounsley *et al.*, 1995; Shinozuka *et al.*, 1999; Walden *et al.*, 1998; Theissen *et al.*, 2000). En *Arabidopsis thaliana* a este clado se le ha llamado tipo *SOC1* y está conformado por los genes *AGAMOUS-LIKE 14 (AGL14)*, *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)*, *SUPPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* (antes llamado *AGL20*) y *AGAMOUS-LIKE 42 (AGL42)* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a). Recientemente, con el término de la secuenciación del genoma de *A. thaliana*, se han identificado dos

ORFs llamados *AGAMOUS-LIKE 71 (AGL71)* y *AGAMOUS-LIKE 72 (AGL72)* que se agrupan en este clado (Martínez-Castilla, com. pers.) La función de los genes del clado tipo TM3 permanece desconocida (Walden *et al.*, 1998) a excepción de *SOC1*, el cual se ha demostrado que es importante en la regulación del tiempo de floración (Samach *et al.*, 2000).

Actualmente se han clonado y se han caracterizado los patrones de expresión de varios genes MADS-box cuyo mRNA se localiza predominantemente o exclusivamente en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Lo anterior sugiere que estos genes están involucrados en la regulación del desarrollo de este órgano, a través de funciones diversas y contrastantes (Rounsley *et al.*, 1995; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a; Vergara-Silva *et al.*, 2000; Burgeff *et al.*, 2002). Sin embargo, no existen análisis funcionales basados en fenotipos mutantes o en líneas de sobre-expresión de estos genes MADS-box. Probablemente no se han identificado fenotipos mutantes hasta este momento debido a una posible redundancia funcional entre los miembros de esta familia (Liljegren *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2000; Jack, 2001; Smyth, 2000). Otra posibilidad es que los mutantes poseen fenotipos letales o sutiles cuando se crecen en condiciones estándares (Burgeff *et al.*, 2002).

El único gen MADS-box que se expresa en raíz y que ha sido caracterizado funcionalmente es *ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1 (ANR1)*. A través de una línea de co-supresión, se ha mostrado que este gen es importante en el crecimiento de raíces laterales en respuesta a la disponibilidad local de altas concentraciones de nitratos (NO_3^-) (Leyser y Fitter, 1998; Zhang y Forde, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Se ha sugerido que los genes MADS-box que se expresan en

tejidos vegetativos podrían participar en la regulación del desarrollo de la planta en respuesta a señales ambientales (Zhang y Forde, 2000).

1.4 La raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*

El desarrollo en las plantas, a diferencia de los animales, implica la formación de unidades estructurales que se repiten a lo largo de la vida del organismo (Dolan, 1999). La producción de nuevas células que contribuyen al crecimiento de la planta después de la germinación está restringida a regiones específicas llamadas meristemos. Durante la embriogénesis, en el cigoto se forman dos meristemos. En la planta madura, uno de estos meristemos (SAM) da origen al tallo, a las hojas y a las inflorescencias, y el otro (RAM) a la raíz primaria y a la cofia. Estos meristemos son tejidos complejos e integrados que juegan un papel muy importante en la organización estructural y funcional de los órganos que producen (Webster y MacLeod, 1996).

Las raíces son órganos axiales de los esporofitos de las plantas vasculares. Poseen un crecimiento restringido al ápice, normalmente se encuentran por debajo de la tierra, y generalmente tienen respuestas gravitrópicas y fototropismo negativo (Raven y Edwards, 2001). Tradicionalmente, se considera que las funciones de la raíz al formar un sistema radical son el anclaje de la planta al suelo, la absorción y el transporte de agua y nutrientes minerales al resto de la planta, además del almacenamiento de sustancias procesadas.

Para realizar estas funciones, es necesario que se establezca y se mantenga la estructura ordenada de la raíz. El hecho de que en el desarrollo de

las plantas no exista una migración celular ni movimientos de tejidos como en los animales, hace que la división y la expansión celular tengan un papel muy importante en la morfogénesis (Wolpert *et al.*, 1998; Wysocka-Diller y Benfey, 1997). Por lo tanto, los estudios de desarrollo en la raíz de *A. thaliana* buscan definir la base molecular de la formación de patrones morfogenéticos junto con la regulación de procesos como la división y la expansión celular (Dolan, 1999).

Para entender procesos del desarrollo es útil analizar sistemas simples (Benfey y Scheres, 2000). Además de las ventajas ya mencionadas que presentan los individuos de *A. thaliana*, su raíz presenta otros rasgos que la hacen uno de los sistemas más adecuados para el estudio de la organogénesis en plantas. El ápice de este órgano se puede dividir a lo largo de su eje longitudinal en tres zonas diferentes y sucesivas que se sobrelapan (figura 3). La zona proliferativa o meristemática se localiza en el extremo distal y se caracteriza por tener células pequeñas que se dividen activamente. Proximalmente a esta zona se encuentra la zona de elongación, en la cual las células dejan de dividirse y continúan elongándose. Por último, la región más proximal es la zona de diferenciación, en la que las células dejan de elongarse y alcanzan su estado completo de maduración.

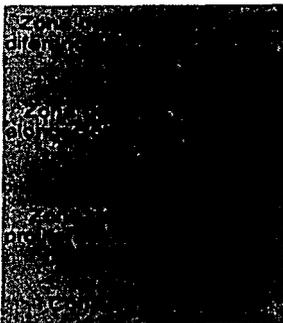


Figura 3. Zonas de desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La organización celular de la raíz de *A. thaliana* es constante, lo que permite identificar claramente a las células por su posición. En corte longitudinal, cada tejido se puede ver como una fila de células que pueden reconocerse fácilmente por sus características morfológicas. En corte transversal, la zona de proliferación de la raíz de *A. thaliana* muestra una organización radial sencilla, en la que se aprecian capas unicelulares concéntricas de tejidos (figura 4a) (Scheres *et al.*, 1998; Dolan *et al.* 1993).

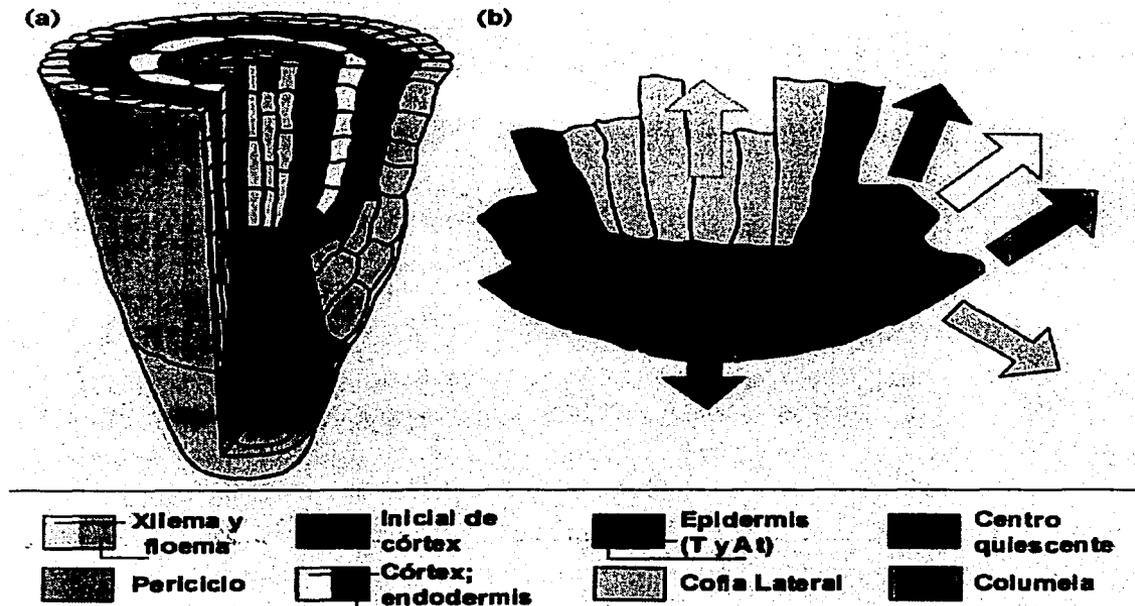


Figura 4. Estructura del ápice de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. (a) Dibujo de un corte transversal en el que se aprecia cada tejido formando filas de células que en su conjunto constituyen anillos concéntricos. (b) Dibujo de las células iniciales dan origen a todos los tipos celulares y que rodean al centro quiescente. T, tricoblastos; AT, atricoblastos. (Tomada de Benfey y Scheres, 2000)

El conjunto de tejidos más interno es el cilindro central, que consta de los tejidos vasculares y de una capa que los rodea llamada periciclo. Los haces vasculares están formados por dos elementos floemáticos y dos xilemáticos. El periciclo es un tejido cuya circunferencia está compuesta generalmente de 12 células. Cubriendo a este tejido está la endodermis, formada por ocho células. El córtex, que colinda con la parte externa de la endodermis, también posee ocho células. La epidermis posee de 16 a 23 células y está compuesta de dos tipos celulares, cuya identidad depende de su posición relativa con respecto a las células de córtex que están por debajo de ella. Las células epidérmicas que están en contacto con paredes anticlinales que dividen dos células corticales se diferencian en células que producen pelos radiculares (tricoblastos). En cambio, las células epidérmicas que son adyacentes a una sola célula de córtex generalmente no producen pelos radiculares (atricoblastos). La zona meristemática está rodeada por la cofia, que secreta una gran diversidad de moléculas. Estos compuestos permiten la protección del meristemo mientras la raíz crece en el sustrato y además pueden estar involucrados en procesos de señalización durante el desarrollo (Dolan *et al.*, 1993; Dolan, 1999).

Todos los tejidos de la raíz derivan de cuatro grupos de células iniciales (figura 4b) que rodean al centro quiescente, el cual está formado por cuatro células que rara vez se dividen en etapas tempranas del desarrollo después de la germinación. La cofia surge a partir de dos grupos de células iniciales. El primero da origen a la columela (también llamada cofia central) y el segundo da origen a la cofia lateral y a la epidermis. Un tercer grupo de iniciales da origen a las células de

córtex y de endodermis. Finalmente, el cuarto origina al periciclo y a los tejidos provasculares (Dolan *et al.*, 1993).

La secuencia de los planos de división que da origen a cada tejido se encuentra bien documentada (Dolan *et al.*, 1993; Dolan, 1999; Webster y MacLeod, 1996). El linaje celular también es constante, lo cual es poco frecuente en las plantas (Scheres y Wolkenfelt, 1998). Esto significa que las células del meristemo poseen destinos predecibles a lo largo del desarrollo, debido a que la secuencia de planos de división de las células iniciales y de sus descendientes es prácticamente invariante. Esta predictibilidad del destino celular facilita enormemente la interpretación de los mutantes y de las cruas, especialmente con marcadores celulares (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

La naturaleza de las señales que están implicadas en la especificación de la identidad celular no se conoce. Sin embargo, se sabe que existe información posicional que juega un papel fundamental en la determinación del destino celular (Dolan, 1999; van den Berg *et al.*, 1995). Los datos obtenidos indican que estas señales posicionales provienen de las células más maduras, guiando el destino de las células iniciales del mismo tejido (van den Berg *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que en *A. thaliana* el centro quiescente inhibe la diferenciación de las células que lo rodean, manteniéndolas como células iniciales (van den Berg *et al.*, 1997). Estos datos parecen indicar que la formación del patrón en el meristemo de raíz podría controlarse a partir de un balance entre señales de corto alcance que inhiben la diferenciación y señales que refuerzan las decisiones de destinos celulares (van den Berg *et al.*, 1997).

Por lo tanto, el meristemo de la raíz ofrece una combinación única de una organización celular prácticamente constante y una determinación del destino celular dependiente de la posición (Scheres, 1998). Es importante recalcar que durante todo el desarrollo de la raíz las distintas etapas de diferenciación celular se pueden apreciar para cada tipo tisular en un momento particular. Esto permite caracterizar la secuencia progresiva de diferenciación de un tejido en un solo instante.

Otro rasgo distintivo de la raíz de *A. thaliana* es su tamaño relativamente pequeño (80-100 μm de diámetro) y su semitransparencia, lo que permite una fácil manipulación y una visualización adecuada de las células. A pesar de su simplicidad estructural, la raíz de *A. thaliana* contiene características fenotípicas distintivas que han permitido la identificación de mutantes (Benfey y Schiefelbein, 1994; Scheres, 1998). Por ejemplo, la morfología y la distribución de los pelos radiculares, la elongación celular y la actividad meristemática han sido rasgos comunmente usados para su aislamiento. Sin embargo, algunos mutantes como los que poseen defectos en la determinación del patrón radicular (ya sea radial o apico-basal) se han identificado por el criterio de crecimiento de la raíz (Scheres, 1998). Esta aproximación supone que un defecto en el crecimiento es el resultado de una alteración en la proliferación y/o elongación celular.

El embrión de *A. thaliana* también presenta divisiones celulares estereotipadas, lo cual permite conocer la contribución de las células embrionarias a los diferentes primordios que forman a los órganos. Debido a lo anterior, el origen embrionario de la raíz de *A. thaliana* se ha caracterizado con precisión. Es

decir, se sabe el origen celular en cualquier estado de desarrollo de la raíz, con la excepción de la región limítrofe entre la raíz y el hipocótilo (Scheres *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que el uso de la genética inversa en el análisis de la función de miembros de la familia MADS-box ha sido exitoso y ha dado lugar a descubrimientos recientes importantes (Pelaz *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2000). Debido a que prácticamente no se conoce la función de los genes MADS-box que se expresan en estructuras vegetativas, y aprovechando las ventajas que ofrece la raíz de *A. thaliana* como sistema modelo para la organogénesis en plantas, la intención principal de este trabajo es la de explorar el papel funcional del gen MADS-box *AGL14* en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*, usando un enfoque de genética inversa.

2. ANTECEDENTES

Con la intención de identificar un número mayor de miembros de la familia MADS-box de *A. thaliana*, se clonaron nuevos genes por homología con la ayuda de oligonucleótidos degenerados para secuencias internas de la caja MADS (Rounsley *et al.*, 1995). Estos genes se designaron *AGL11* (GenBank: U20182), *AGL12* (GenBank: U2193), *AGL13* (GenBank: U20183), *AGL14* (GenBank: U20184), *AGL15* (GenBank U20185) y *AGL17* (GenBank: U20186) (*AGL* por *AGAMOUS*-like). Además, por medio de RT-PCR se comprobó que son genes que se transcriben. Con RFLP se determinó su posición en el mapa genético, el cual muestra que no se encuentran formando un *cluster*. Por medio de análisis de northern blot, se detectaron los transcritos de *AGL12*, de *AGL14* y de *AGL17* únicamente en tejido de raíz. Estos son los primeros genes MADS-box reportados cuya expresión se encuentra fuera de los tejidos florales (Rounsley *et al.*, 1995).

Con la idea de obtener un alelo mutante para iniciar el análisis funcional de estos genes, E. Alvarez-Buylla en colaboración con S. Pelaz y G. S. Ditta, del laboratorio del Dr. M. F. Yanofsky (University of California, San Diego), realizaron una búsqueda de alelos mutantes para el gen *AGL14* en un banco de semillas del Center for Functional Genomics in *Arabidopsis*, del Max Planck Institute for Plant Breeding Research de Colonia, Alemania. Como resultado de este trabajo, se localizaron dos alelos mutantes de pérdida de función por inserción del transposón *En-1* (número de acceso de la secuencia en la librería de genes EMBL: M 25427), los cuales se denominaron W14.2-6 y W14.5-1 (figura 5). Actualmente ya se ha descrito el comportamiento de este elemento transponible autónomo de la familia

En/Spm, al igual que las técnicas utilizadas para realizar la búsqueda de mutantes en este banco y las ventajas obtenidas al utilizar este transposón en particular (Baumann *et al.*, 1998; Cardon *et al.*, 1993; Wisman *et al.*, 1998; <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/>, Septiembre 2001). Existen trabajos importantes en los que se han utilizado mutantes de este banco, tanto de genes MADS-box florales como de genes de otras familias que se expresan en raíz (ver por ejemplo Helariutta *et al.*, 1999 y Pelaz *et al.*, 2000).

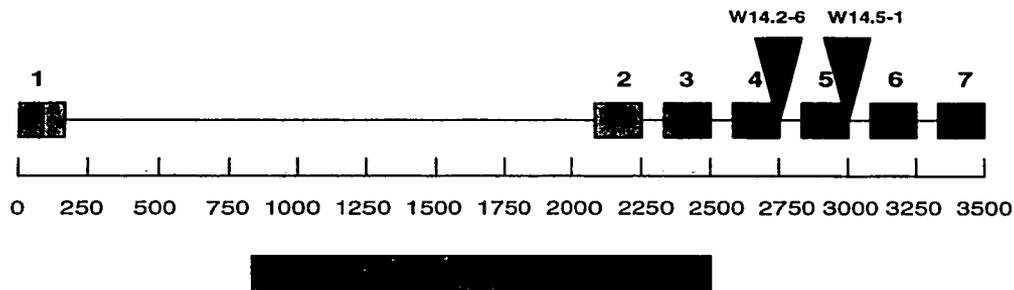


Figura 5. Esquema que muestra los 6 intrones (líneas) y los 7 exones (cuadros) del gen *AGL14* y la posición aproximada del transposón *En-1* para las líneas W14.2-6 y W14.5-1. Los colores indican la correspondencia entre los exones y los módulos de la proteína *AGL14* para los cuales codifican. El sitio exacto de inserción del transposón *En-1* para la línea W14.2-6 está en el cuarto intrón: AAATAAAATCTTC - 3'En5' - ACTCTTATCATATGGTT. Para W14.5-1 la inserción está al terminar el quinto exón: AATTTAAAGAAAAG - 5'En3' - GTAACATGTAGCTTT.

3. OBJETIVOS

General:

Explorar el papel funcional del gen MADS-box *AGL14* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, usando un enfoque de genética inversa.

Particulares:

- Determinar si los mutantes de pérdida de función (W14.2-6 y W14.5-1) son homocigos y estables para la inserción del transposón.
- Determinar si los mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) son nulos a nivel de la expresión de mRNA.
- Seleccionar un medio de cultivo sólido en el cual se aprecien diferencias en el crecimiento entre WT y los mutantes (W14.2-6, y W14.5-1).
- Analizar con parámetros celulares la dinámica de crecimiento y la diferenciación del fenotipo de los mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) en el medio seleccionado, comparándolo con el fenotipo WT.
- Proponer las causas a nivel celular de la probable diferencia en el crecimiento entre WT y los mutantes (W14.2-6 y W14.5-1).
- Buscar si existen motivos en las regiones cis-regulatorias de *AGL14* que estén ligados a procesos de señalización que intervengan en el desarrollo.

4. HIPÓTESIS

- El gen *AGL14* está implicado en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
- Existen diferencias en el crecimiento de la raíz de los mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) y la raíz de WT.
- Las diferencias en el crecimiento de la raíz de los mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) y WT se debe a una diferencia en la producción o en la elongación celular.
- El fenotipo de los mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) no será tan drástico si presentan una expresión a nivel de mRNA.
- Existen motivos en las regiones cis-regulatorias de *AGL14* que están ligados a procesos de señalización que intervienen en el desarrollo, como hormonas.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Caracterización molecular de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1

5.1.1 Comprobación por PCR de la presencia del transposón en el gen *AGL14* de las plantas W14.2-6 y W14.5-1

Se crecieron dos individuos WT de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col), 10 individuos W14.2-6 Col y 10 W14.5-1 Col en tierra Metromix 200 (Scotts-Sierra Horticultural Products Company, Marysville, OH, EUA), en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo (18 horas de luz por 6 de oscuridad) a 20°C. La generación de estas plantas se designó F₀. Las plantas WT se nombraron WT 1 y WT 2; las plantas W14.2-6 se nombraron W14.2-6 1, W14.2-6 2, y así sucesivamente hasta W14.2-6 10. Lo mismo se hizo para W14.5-1. Se hizo una extracción de DNA genómico de hoja caulina de las 10 plantas W14.2-6 y de las 10 plantas W14.5-1 con el protocolo "Extracción de DNA genómico de planta para PCR" (ver anexo A). Se diluyó cada muestra 1:10 en ddH₂O. Se hizo un PCR (termociclador Perkin Elmer 9600) con las siguientes condiciones:

	W14.2-6	W14.5-1
ddH ₂ O	13.95 µl	13.95 µl
Buffer 10X	2 µl	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.2 µl	1.2 µl
dNTPs (10 mM)	0.4 µl	0.4 µl
Oligonucleótido <i>Forward</i> (20 µM)	0.4 µl (EN205)	0.4 µl (EN8130)
Oligonucleótido <i>Reverse</i> (10 µM)	0.8 µl (EOMR2)	0.8 µl (EOMR2)
Templado (1:10)	1 µl	1 µl
Enzima Taq:Pfu (10:1)	0.25 µl	0.25 µl

Nota: Buffer 10X= 100 mM KCl, 60 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgSO₄, 1% Tritón X-100 y 1 mg/ml de BSA.

Desnaturalización inicial: 94 °C 2'. Desnaturalización, *annealing* y elongación (40 ciclos): 94 °C 40", 65 °C 1' y 72 °C 2', respectivamente. Elongación final: 72 °C 5'.

5.1.2 Comprobación por Southern blot de la homocigosis para el transposón en el gen *AGL14* de las plantas W14.2-6 Y W14.5-1

Se hicieron extracciones de DNA genómico de las mismas plantas (generación F₀) WT1, WT2, W14.2-6 6, W14.2-6 7, W14.2-6 8, W14.2-6 9, W14.2-6 10, W14.5-1 6, W14.5-1 7, W14.5-1 8, W14.5-1 9 y W14.5-1 10 con el protocolo del producto "DNeasy plant Mini Kit" (QIAGEN GmbH, Alemania, Núm. cat. 69106). La muestra WT1 se dividió en dos partes (WT1A Y WT1B), al igual que la muestra WT2 (WT2A y WT2B). Se realizó una digestión para cada muestra de DNA genómico según el protocolo "Digestión por enzimas de restricción de DNA genómico" (ver anexo A), con las siguientes cantidades:

	WT1A	WT2A	Muestras W14.2-6	Muestras W14.5-1	WT1B	WT2B
H ₂ O	X µl	X µl	X µl	X µl	X µl	X µl
Buffer 10X	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
Espermidina (0.1 M)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
BSA (10mg/ml)	-----	-----	-----	4 µl	4 µl	4 µl
DNA genómico	X µl	X µl	X µl	X µl	X µl	X µl
Hind III (10 U)	1.25 µl	1.25 µl	1.25 µl	-----	-----	-----
Bgl II (10 U)	-----	-----	-----	1.25 µl	1.25 µl	1.25 µl
EcoR V (20 U)	-----	-----	-----	0.625 µl	0.625 µl	0.625 µl
Volumen final	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

Se realizó un Southern blot (ver el protocolo en anexo A). La sonda utilizada se marcó radioactivamente utilizando [α^{32} P]dCTP según el protocolo "Marcado Radioactivo de Sonda de DNA" (ver anexo A). El fragmento de DNA utilizado para la síntesis de la sonda fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos OEAB145 y OEAB 147, usando como templado DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col. La sonda resultante corresponde a una parte del gen *AGL14* que no incluye la caja MADS. Se dejó exponiendo la placa fotográfica tipo Biomax

(Eastman Kodak Company. Rochester, New York, E.U.A. Núm. cat. 8715187) a la membrana de nylon hibridada tipo Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd. Buckinghamshire, Inglaterra. Núm cat. RPN303N) durante una semana. Posteriormente la placa se reveló y se fijó.

Se colectaron semillas de las plantas W14.2-6 6, W14.2-6 7, W14.2-6 8, W14.2-6 9, W14.2-6 10, W14.5-1 6, W14.5-1 7, W14.5-1 8, W14.5-1 9 y W14.5-1 10, producto de la autofecundación. Estas semillas (generación F₁) se mantuvieron separadas por planta progenitora en un tubo eppendorff.

5.1.3 Comprobación por northern blot y por RT-PCR del nivel de expresión de mRNA del gen *AGL14* en las plantas W14.2-6 y W14.5-1

Se lavaron, esterilizaron y vernalizaron semillas WT, W14.2-6 9 (generación F₁) y W14.5-1 7 (generación F₁) siguiendo el protocolo "Lavado y esterilización de semillas" (ver anexo A). Se sembraron en cajas de Petri en medios de cultivo sólidos MS 0.2X con 2% de sacarosa, preparado según el protocolo "Medios de cultivo para *Arabidopsis thaliana*" (ver anexo A). Las placas se colocaron en un cuarto de crecimiento de plantas con fotoperiodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad) a 20°C. Se crecieron las plantas durante 20 días. Se extrajo RNA total de raíz, según el protocolo "Extracción de RNA total con trizol" (ver anexo A). Se utilizaron 3 raíces WT para la primera muestra, una raíz W14.2-6 9 (generación F₁) para la segunda, una raíz W14.5-1 7 (generación F₁) para la tercera y tres raíces WT para la cuarta. El RNA total se solubilizó en 20 µl de ddH₂O tratada con DEPC. Se cuantificó el RNA total extraído. Se realizó un RT-

PCR de acuerdo con el protocolo "Síntesis y amplificación de cDNA" (ver anexo A) partiendo de 1 μ g de cada muestra extraída de RNA total, utilizando los oligonucleótidos EOMF1 y EOMR2 a una temperatura de annealing de 57°C. Las muestras obtenidas de corrieron en un gel de agarosa al 1%.

Se realizó un northern blot siguiendo el protocolo "Northern blot (Geles de RNA con formaldehído)" (ver anexo A). Se partió de 2.5 μ g de RNA total de cada muestra. El fragmento de DNA utilizado para la síntesis de la sonda se encuentra contenido en el plásmido pEOM6 (pGEMTeasy. Promega Corp. Madison, Wisconsin, E.U.A. Núm cat. A1360). Este fragmento, clonado utilizando los oligonucleótidos EOMF1 y EOMR2 a partir de cDNA de raíz de *Arabidopsis thaliana*, se secuenció antes de ser utilizado como sonda. Esta sonda corresponde a una parte del gen *AGL14* que no incluye la caja MADS. La sonda se marcó radioactivamente según el protocolo "Marcado Radioactivo de Sonda" (ver anexo A). Se dejó exponiendo la placa fotográfica a la membrana hibridada durante cuatro días. Posteriormente la placa se reveló y se fijó.

5.2 Caracterización fenotípica de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1

5.2.1 Análisis del crecimiento de la raíz de las plantas WT, W14.2-6 Y W14.5-1 en diferentes medios de cultivo

Se esterilizaron y se vernalizaron semillas WT, W14.2-6 9 (generación F₁) y W14.5-1 7 (generación F₁) según el protocolo "Lavado y esterilización de semillas" (ver anexo A). Posteriormente se sembraron en cajas de Petri con los siguientes medios de cultivo sólidos con mezcla de sales tipo Murashige & Skoog (MS) (Life Technologies, Inc. E.U.A. Núm cat. 11117006), preparados siguiendo el protocolo "Medios de cultivo para *Arabidopsis thaliana*" (ver anexo A): MS 0.5X sin sacarosa, MS 0.5X con 0.5% de sacarosa, MS 1X sin sacarosa, MS 1X con 1% de sacarosa y MS 1X con 4.5% de sacarosa. Se colocaron las cajas en posición vertical (día 0) dentro de una cámara de crecimiento de plantas (Lab-line Bionette) con luz continua a 22°C. Se marcó sobre la caja de petri el crecimiento de la raíz de cada planta con un plumón indeleble cada 24 horas, durante 8 días. Se midió la longitud alcanzada por la raíz diariamente, con un vernier electrónico (Mitutoyo Corp. Japón). Se midió la longitud de entre 10 y 20 raíces de cada tipo de planta (WT, W14.2-6 y W14.5-1). Esta variación se debe a que no germinaron todas las plantas que se sembraron.

Se repitió lo anterior en medio MS 0.2X con 2% de sacarosa, pero se mantuvieron las cajas en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad) a 20°C. En este medio se midió la longitud de aproximadamente 40 raíces de cada tipo de planta (WT, W14.5-1, W14.2-6). Se

calculó y se graficó el promedio de la longitud alcanzada cada día por cada tipo de raíz en cada condición.

5.2.1 Medición y cálculo de parámetros celulares en WT, W14.2-6 y W14.5-1

Se lavaron, esterilizaron y vernalizaron 20 semillas WT, 20 semillas W14.2-6 9 (generación F₁) y 20 semillas W14.5-1 7 (generación F₁) siguiendo el protocolo "Lavado y esterilización de semillas" (ver anexo A). Se sembraron en cajas de Petri en medios de cultivo sólidos MS 0.2X con 2% de sacarosa, preparado según el protocolo "Medios de cultivo para *Arabidopsis thaliana*" (ver anexo A). Se colocaron las placas (tiempo 0) en un cuarto de crecimiento de plantas con fotoperiodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad) a 20°C. Las plantas se dividieron en dos grupos: 10 raíces WT, 10 raíces W14.2-6 9 (generación F₁) y 10 raíces W14.5-1 7 (generación F₁) se nombraron grupo A y a las otras 10 raíces WT, 10 raíces W14.2-6 9 (generación F₁) y 10 raíces W14.5-1 7 (generación F₁) se nombraron grupo B. A las 144 horas (6 días) se marcó con un plumón indeleble sobre cada caja de petri la longitud alcanzada por las raíces del grupo A. Esto se realizó para asegurar que en la siguiente medición (154 horas) las raíces se encontraban creciendo. A las 154 horas (6 días y 10 horas) se marcó con un plumón indeleble en la caja de petri la longitud alcanzada por las raíces de los grupos A y B. A las 168 horas (7 días) se marcó nuevamente con un plumón indeleble la longitud alcanzada por cada raíz de los grupos A y B. Inmediatamente se aclararon las raíces del grupo B según el protocolo "Aclaramiento de raíces" (ver anexo A). Con un vernier electrónico se midió la longitud existente entre las

líneas trazadas a las 154 y a las 168 horas para cada raíz de ambos grupos, con lo que se calculó la tasa de crecimiento V ($\mu\text{m}/\text{h}$). Para cada una de las 10 raíces WT y de las 10 raíces W14.5-1 7 del grupo B, se midió con ayuda de un Microscopio con óptica Nomarski (Olympus BX60. Olympus America Inc., Melville, N.Y., E.U.A.) y se calculó lo siguiente:

a) Longitud de la zona meristemática (μm), L_m . Se mide sobre una fila de córtex desde la célula inicial de córtex/endodermis hasta la pared anticlinal más apical de la primera célula cuya longitud haya excedido el doble de la longitud de una célula meristemática recién dividida.

b) Número de células que forman la zona meristemática (células), N_m . Se cuenta el número de células incluidas en una fila de córtex de la región determinada en el punto anterior.

c) Longitud promedio de una célula meristemática ($\mu\text{m}/\text{célula}$), L_{mc} . Se calcula de la siguiente manera: $L_{mc} = \frac{L_m}{N_m}$

d) Longitud de la zona de elongación (μm), L_e . Se mide sobre córtex desde la pared anticlinal más apical de la primera célula cuya longitud haya excedido el doble de la longitud de una célula meristemática recién dividida hasta la pared anticlinal más apical de la célula de córtex que está por debajo de la primera célula de epidermis que comienza a formar una protuberancia que dará origen a un pelo radicular.

e) Número de células que forman la zona de elongación (células), N_e . Se cuenta el número de células incluidas en una fila de córtex de la región determinada en el punto anterior.

f) Longitud de la zona de crecimiento de la raíz (μm), L_{gpr} . Se calcula de la siguiente forma: $L_{gpr} = L_m + L_e$

g) Longitud promedio de las células completamente elongadas (μm), L_e . Se mide la longitud en una fila de córtex de una célula (célula 1) que se encuentre a una distancia del centro quiescente equivalente a 2 veces L_{gpr} . Posteriormente se mide la longitud de la célula inmediata (célula 2) sobre la misma fila, hacia la parte basal de la raíz. Se continúa así sucesivamente, hasta completar en total diez mediciones. Se grafica el promedio de la longitud para cada célula con base en su posición, a partir de los datos de varias raíces de un mismo tipo de planta (e.g. WT o mutantes). Si no existe un aumento en el tamaño de las células en diferentes posiciones (como es de esperarse), se puede promediar la longitud de las diez células de cada raíz y con ello sacar un promedio de varias raíces de un mismo tipo de planta (e.g. WT o mutantes). Este último promedio constituirá el parámetro llamado longitud promedio de las células completamente elongadas (L_e).

h) Duración del ciclo celular, T . Se calcula como $T = \frac{(Nm)(\ln 2)(L_e)}{V}$

i) Tasa de producción celular, CPR. Se calcula como $CPR = \frac{V}{L_e}$

j) Longitud hasta el punto de reconocimiento del protoxilema (μm), PRP. En corte óptico medio de la raíz, se mide la distancia desde el QC hasta el punto en el que se puede reconocer el inicio de la formación del protoxilema, caracterizado por la formación anillos que corresponden a los elementos de vaso.

k) Tiempo de diferenciación del protoxilema (h), Tpd. Se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Tpd} = \frac{2 \text{Le}}{V} + \frac{\text{PRP} - \text{Lqpr}}{V}$$

l) Crecimiento celular en la zona de diferenciación (μm). Se midió en epidermis la longitud de la primera célula que comienza a formar una protuberancia que dará origen a un pelo radicular. Se midió la longitud de la siguiente célula epidérmica sobre la misma fila hacia la base de la raíz, y así sucesivamente hasta completar 10 mediciones. Cuando fue posible (la mayoría de las ocasiones), se midió la longitud de las células en dos filas epidérmicas de cada raíz. Para confirmar si es adecuado el criterio que define el inicio de la zona de diferenciación con base en la aparición de protuberancias que darán origen a pelos radiculares se realizó esta medición, la cual busca verificar si existe crecimiento celular en la zona de diferenciación.

Para cada parámetro, se calculó con los datos anteriores el promedio y el error estándar, tanto para las muestras WT como para las W14.5-1. A cada grupo de datos se le aplicó la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney no pareada.

Para el cálculo de los parámetros anteriores se utilizó un modelo que relaciona la tasa de crecimiento de la raíz, la tasa de producción celular y el número de células meristemáticas (Ivanov y Dubrovsky, 1997; Dubrovsky *et al.*, 1998), además de otras ecuaciones (Dubrovsky *et al.*, 2000). Este método utiliza variables que pueden ser medidas de una manera relativamente sencilla: número de células meristemáticas, tasa de crecimiento de la raíz y longitud de las células completamente elongadas. Este modelo parte de supuestos están basados en el análisis de la organización meristemática y en el funcionamiento de la raíz con crecimiento estacionario (Ivanov y Dubrovsky, 1997) y asume lo siguiente:

- 1) La duración del ciclo es la misma para todas las células meristemáticas.
- 2) Todas las células meristemáticas son proliferativas.
- 3) El número de células en el meristemo (o en una fila celular dentro del meristemo) es constante para cada tejido.
- 4) El flujo de células que entra y sale de la zona de elongación no proliferativa es el mismo.
- 5) No hay desplazamiento entre diferentes filas celulares.

5.3 Búsqueda de motivos en la secuencia cis-regulatoria de *AGL14* asociados a procesos de señalización

Como ya se ha mencionado, la expresión de los genes está determinada por señales que intervienen en el desarrollo de los organismos (como hormonas y factores de transcripción). Por ello se realizó una búsqueda en la secuencia cis-regulatoria de *AGL14* de motivos asociados a procesos de señalización, a través de una base de datos localizada en la WWW. La base de datos contiene información específica de plantas, y se consultó el 6 de noviembre de 2001. La secuencia utilizada para esta búsqueda es de 2794 pb, y corresponde a la secuencia río arriba del inicio de la transcripción de *AGL14* (de -1 a -2794; número de acceso de secuencia genómica de *AGL14* en GenBank: At4G11880) hasta el siguiente ORF identificado. El sitio web de la base de datos PLACE (Plant cis-acting regulatory DNA elements) es el siguiente: <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización molecular de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1

6.1.1 Comprobación por PCR de la presencia del transposón en el gen *AGL14* de las plantas W14.2-6 y W14.5-1

En la figura 6 se observan las amplificaciones obtenidas por PCR. Las plantas W14.2-6 1, W14.2-6 2, W14.2-6 4 y W14.2-6 5 no presentan ninguna banda, lo cual puede indicar que no contienen el transposón. Sin embargo, el DNA genómico extraído para estas plantas se encuentra ligeramente degradado (datos no mostrados). Esto podría explicar también la ausencia de una amplificación en los carriles 1, 2, 4 y 5. Las muestras W14.2-6 3, W14.2-6 6, W14.2-6 7, W14.2-6 8, W14.2-6 9 y W14.2-6 10 contienen una banda del tamaño esperado (990 pb), con lo que queda confirmada la presencia, la posición y la orientación del transposón en esas plantas de la línea W14.2-6.

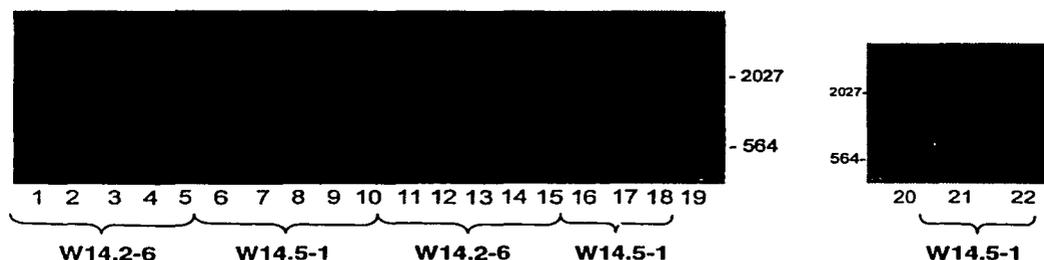


Figura 6. Amplificaciones obtenidas por PCR a partir de DNA genómico de las plantas mutantes. Carriles: 1 W14.2-6 1, 2 W14.2-6 2, 3 W14.2-6 3; 4 W14.2-6 4, 5 W14.2-6 5, 6 W14.5-1 1, 7 W14.5-1 2, 8 W14.5-1 3, 9 W14.5-1 4, 10 W14.5-1 5, 11 W14.2-6 6, W14.2-6 7, 13 W14.2-6 8, 14 W14.2-6 9, 15 W14.2-6 10, 16 W14.5-1 6, 17 W14.5-1 7, 18 W14.5-1 8, 19 λ Hind III, 20 λ Hind III, 21 W14.5-1 19, 22 W14.5-1 20.

Todas las muestras W14.5-1 presentan una banda del tamaño esperado (567 pb). Con esto se reitera la presencia, la posición y la orientación del transposón para las 10 plantas analizadas de la línea W14.5-1.

6.1.2 Comprobación por Southern blot de la homocigosis para el transposón en el gen *AGL14* de las plantas W14.2-6 Y W14.5-1

En la figura 7 se muestra el Southern blot. El patrón obtenido corresponde al esperado para todas las muestras, excepto para W14.5-1 6 (carril 8). Las bandas esperadas para WT1A y WT2A (carril 1 y 2 respectivamente) son de 2642 pb y de 982 pb. Para las muestras W14.2-6 se esperan bandas de 2642 pb y de 1801 pb. Para W14.5-1 se esperan dos bandas, una de 2750 y la otra de 1592. Para WT1B y WT2B (carril 13 y 14 respectivamente) se espera una sola banda de 1806 pb. Por lo anterior se corrobora que WT no presenta la inserción del transposón. El patrón observado en la muestra W14.5-1 6 (carril 8) puede deberse a una digestión parcial.

La muestra W14.2-6 8 (carril 5) presenta una banda muy tenue a la misma altura que WT1A y WT2A (982 pb). Las muestras W14.5-1 8 y W14.5-1 9 (carril 10 y 11 respectivamente) parecen tener también una banda muy tenue del mismo tamaño que la de WT1B y WT2B (1806 pb). A pesar de que estas muestras de W14.2-6 y W14.5-1 presentan una banda a la altura de la esperada sólo para WT, no pueden interpretarse como heterócigas para la inserción. Esto es debido a que la banda no esperada es de una intensidad mucho menor que las bandas esperadas para WT. Por lo tanto todas las muestras, excepto W14.5-1 6 (carril 8), son homócigas para la inserción. La presencia de las bandas no esperadas indica

que en algunas células de estas plantas se está produciendo la excisión del transposón, lo que puede conducir a un fenotipo WT local. A partir de estos resultados se decidió seguir trabajando en los experimentos posteriores sólo con plantas de la siguiente generación (F_1) de W14.2-6 9 y de W14.5-1 7.

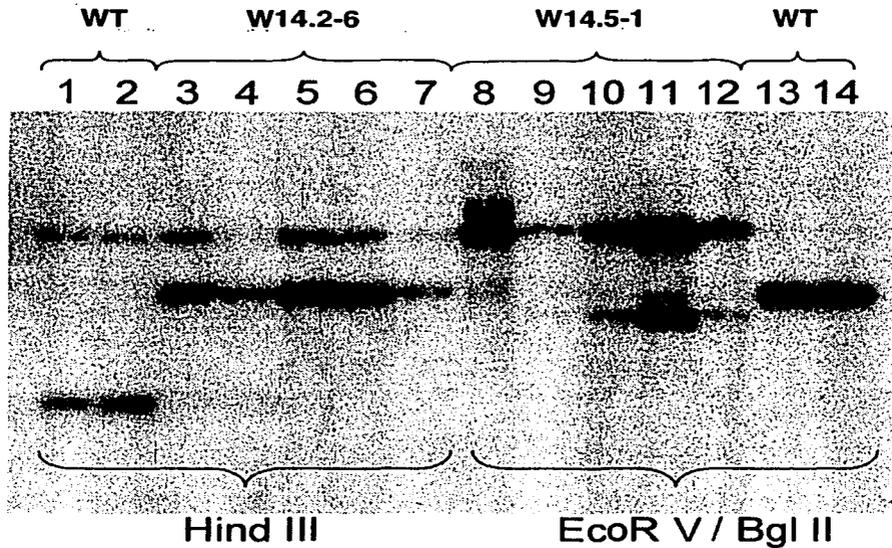


Figura 7. Southern blot en el que se muestra que las plantas mutantes analizadas son homocigas para la inserción del transposón en el gen *AGL14*. Carriles: 1 WT1A, 2 WT2A, 3 W14.2-6 6, 4 W14.2-6 7, 5 W14.2-6 8, 6 W14.2-6 9, 7 W14.2-6 10, 8 W14.5-1 6, 9 W14.5-1 7, 10 W14.5-1 8, 11 W14.5-1 9, 12 W14.5-1 10, 13 WT1B, 14 WT 2B.

6.1.3 Comprobación por northern blot y por RT-PCR del nivel de expresión de mRNA del gen *AGL14* en las plantas W14.2-6 y W14.5-1

En la figura 8(a) se observa el gel con la misma cantidad de RNA total de WT, W14.2-6 y W14.5-1 utilizado para la hibridación. En la figura 8(b) se muestra el northern blot obtenido a partir de la membrana correspondiente. En el carril 1 se

aprecia una expresión de mRNA del gen *AGL14* en tejido de raíz de WT. En los carriles 2 y 3, que corresponden a W14.2-6 y W14.5-1 respectivamente, no se detectó la expresión de mRNA de *AGL14*. Con el nivel de resolución de este experimento, no es posible asegurar que no existe una expresión de mRNA del gen *AGL14* en los mutantes W14.2-6 y W14.5-1. Sin embargo, la diferencia en la expresión entre WT y los mutantes es evidente.

En la figura 8(c) se observan las amplificaciones obtenidas después del RT-PCR. En el carril 3 (WT) se observa una amplificación del tamaño esperado. (413 pb). El carril 1 (W14.2-6) presenta una banda a la misma altura que WT, aunque es más tenue. En el carril 2 (W14.5-1) no se obtuvo ninguna amplificación. Estos resultados indican que W14.5-1 es un mutante nulo en la expresión de mRNA del gen *AGL14* mientras que W14.2-6 es un mutante parcial.

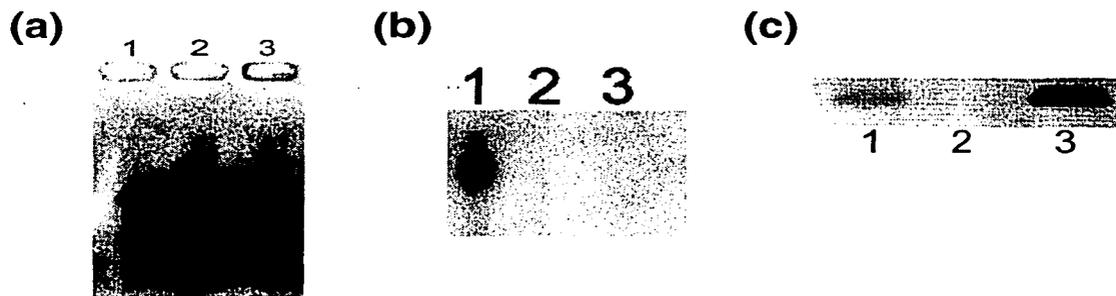


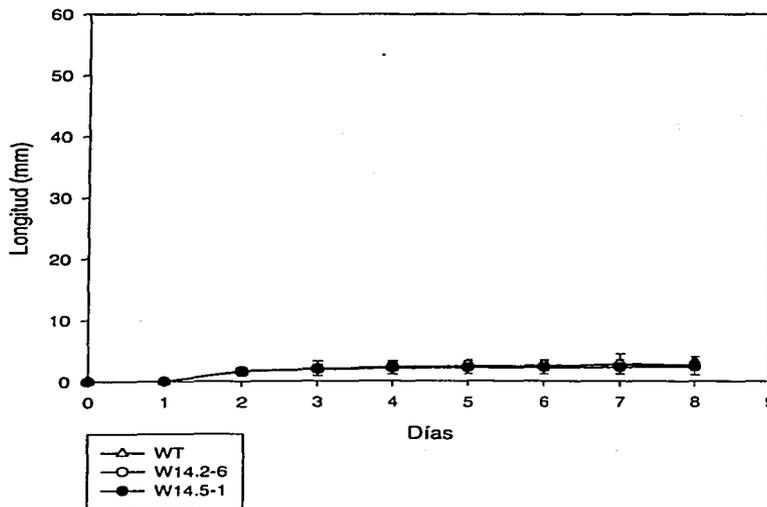
Figura 8. Expresión de mRNA del gen *AGL14* en WT, W14.2-6 y W14.5-1. (a) Extracción de RNA, en la que se muestra que la cantidad utilizada de cada muestra para el Northern blot es aproximadamente la misma. Carriles: 1 WT, 2 W14.2-6, 3 W14.5-1. (b) Análisis de la expresión del gen *AGL14* por medio de Northern blot. Carriles: 1 WT, 2 W14.2-6, 3 W14.5-1. (c) Análisis de la expresión del gen *AGL14* por medio de RT-PCR, en el que se muestra que WT y W14.2-6 lo expresan en raíz. Carriles: 1, W14.2-6, 2 W14.5-1, 3 WT.

6.2 Caracterización fenotípica de los mutantes W14.2-6 y W14.5-1

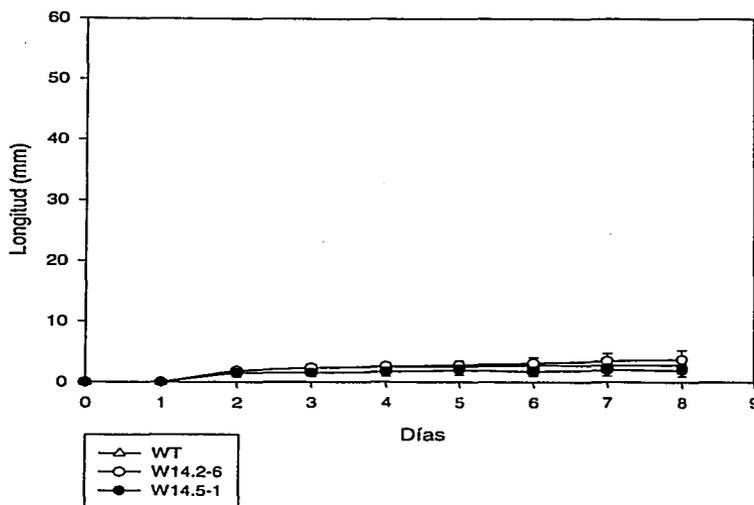
6.2.1 Análisis del crecimiento de la raíz de las plantas WT, W14.2-6 Y W14.5-1 en diferentes medios de cultivo

Se graficó la longitud promedio alcanzada por cada tipo de raíz (WT, W14.2-6 y W14.5-1) en los diferentes medios de crecimiento. Las barras indican un límite del 95% de confianza para el promedio de cada punto. En todas las gráficas se muestra que las plantas analizadas germinaron entre el día 1 y el día 2 después de haber sido sembradas. En la gráfica 1 (MS0.5X sin sacarosa) y en la gráfica 2 (MS1X sin sacarosa) se observa que a partir del segundo día las plantas WT, W14.2-6 y W14.5-1 no continúan creciendo. En estos dos medios no se aprecia una diferencia en el crecimiento entre las plantas mutantes y WT.

Gráfica 1. Crecimiento de la raíz de W14.2-6, W14.5-1 y WT en medio MS 0.5X sin Sacarosa

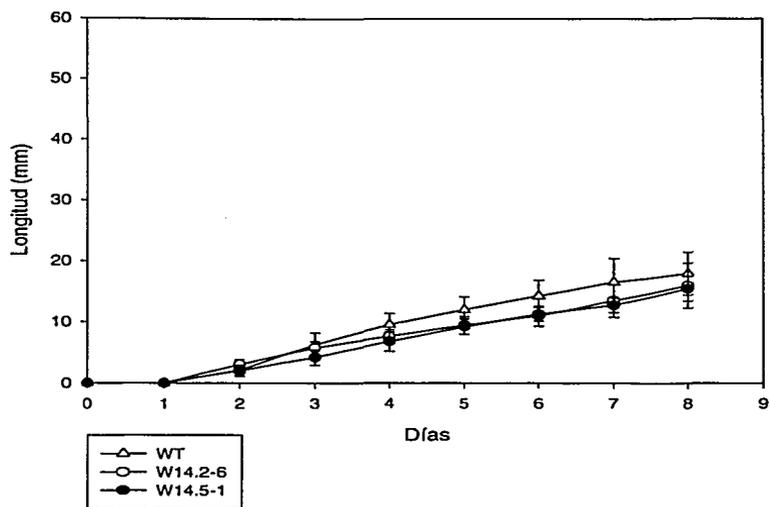


Gráfica 2. Crecimiento de la raíz de W14.2-6, W14.5-1 y WT en medio MS 1X sin sacarosa

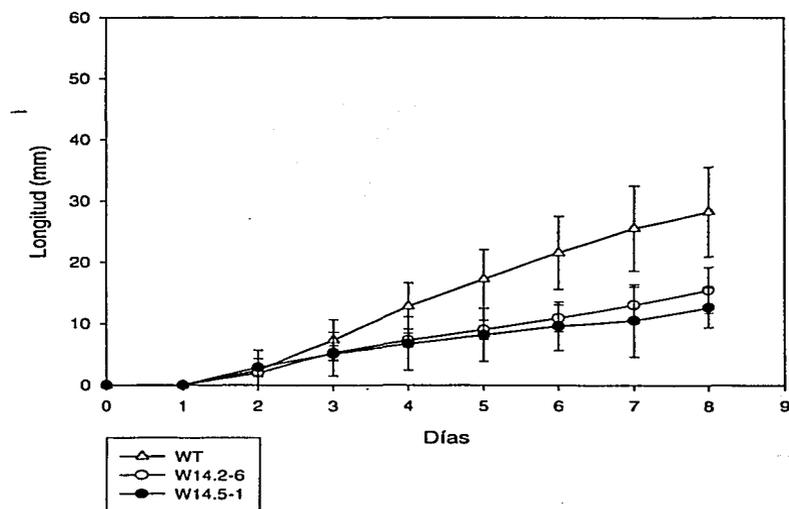


En la gráfica 3 (MS 0.5X con 0.5% de sacarosa) el crecimiento diario promedio de WT es ligeramente mayor que el de W14.2-6 y W14.5-1, aunque no es posible asegurar que son diferentes con un 95% de confianza en ningún día. En la gráfica 4 (MS1X con 1% de sacarosa) el crecimiento de WT es mayor que el de las mutantes. En el día 8 el promedio de la longitud alcanzada por las raíces WT es de 28.2 mm, mientras que para W14.2-6 y W14.5-1 es de 15.5 mm y 12.7 mm respectivamente. En la gráfica 5 (MS 1X con 4.5% de sacarosa) también se observa una diferencia en el crecimiento entre WT y las plantas mutantes. En el día 8, la longitud promedio alcanzada por WT, W14.2-6 y W14.5-1 es de 35mm, 23.3 mm y 24.2 mm respectivamente.

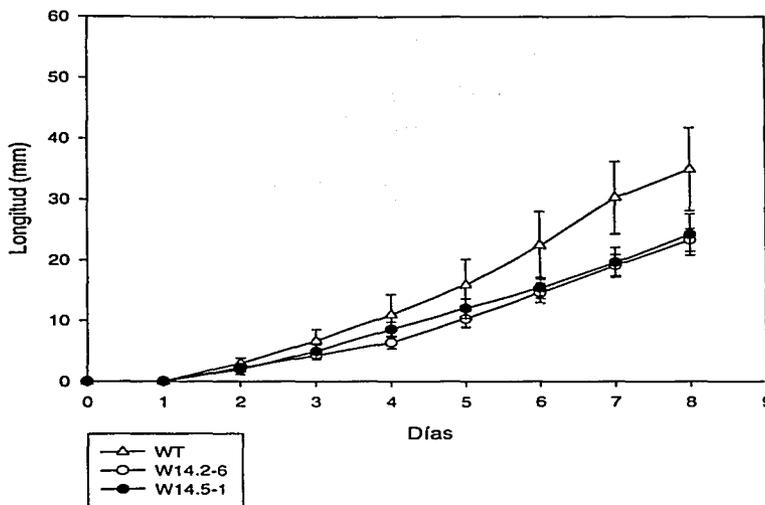
Gráfica 3. Crecimiento de la raíz de W14.2-6, W14.5-1 y WT en medio MS 0.5X con 0.5% de sacarosa



Gráfica 4. Crecimiento de la raíz de W14.2-6, W14.5-1 y WT en medio MS 1X con 1% de sacarosa.



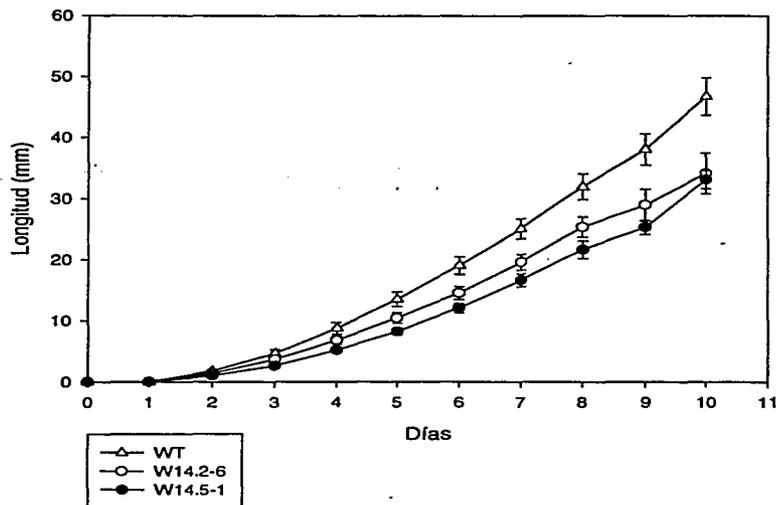
Gráfica 5. Crecimiento de la raíz de W14.2-6, W14.5-1 y WT en medio MS 1X con 4.5% de sacarosa.



Debido a que WT presenta una diferencia en el crecimiento entre los medios MS 0.5X con 0.5% de sacarosa y MS1X con 1% de sacarosa y los mutantes no la exhiben, se decidió repetir el crecimiento en un medio rico en sacarosa. Ya que esta condición no había sido probada con una cantidad baja de sales, se decidió crecer WT, W14.2-6 y W14.5-1 en un medio MS 0.2X con 2% de sacarosa. En la gráfica 6, se muestra el crecimiento de las raíces de las plantas WT, W14.2-6 y W14.5-1 en el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa. Desde el quinto día existe una diferencia en el crecimiento entre WT, W14.2-6 y W14.5-1. En el octavo día, el promedio del tamaño de la raíz para WT, W14.2-6 y W14.5-1 es de 32 mm, 25.4 mm y 21.6 mm respectivamente. En el décimo día, la diferencia entre WT y los mutantes sigue siendo clara; aunque la diferencia entre W14.2-6 y W14.5-1 ya no se aprecia. En este día, el promedio para WT, W14.2-6 y W14.5-1

es de 46.8 mm, 34.1 mm y 33.1 mm respectivamente. En todos los medios en los que se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de la raíz de WT y de los mutantes, el primero creció más que W14.2-6 y que W14.5-1.

Gráfica 6. Crecimiento de la raíz de W14.2-6, W14.5-1 y WT en medio MS 0.2X con 2% de sacarosa



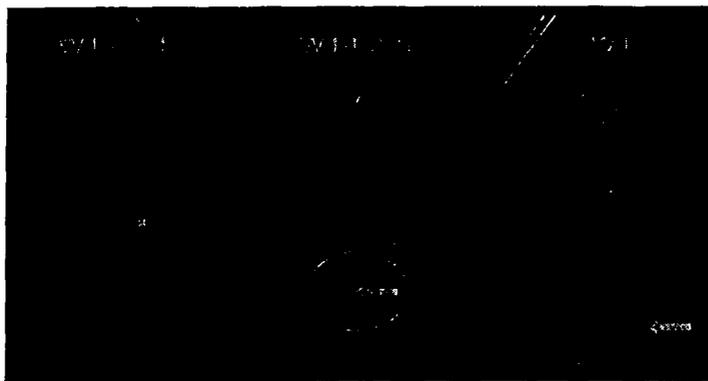
6.2.3 Medición y cálculo de parámetros celulares en WT, W14.2-6 y W14.5-1

La tabla 1 contiene los valores de los parámetros celulares calculados para WT y W14.5-1. En todos los parámetros analizados se encontraron diferencias significativas con la prueba estadística Wilcoxon-Mann-Whitney con una $\alpha < 0.05$, a excepción de la longitud del meristemo (L_m), de la longitud promedio de una célula meristemática (L_{cm}) y de la duración del ciclo celular (T).

	Tasa de crecimiento ($\mu\text{m}/\text{h}$) V	Longitud del meristemo (μm) Lm	Longitud del meristemo (células) Nm	Longitud promedio de una célula meristemática (μm) Lmc	Longitud de la zona de elongación (μm) Le	Longitud de la zona de elongación (células) Ne
	*****	*	***		**	**
WT	265.15 ± 10.57 (20)	173.05 ± 11.53 (10)	33.3 ± 2.14 (10)	5.2 ± 0.14 (10)	509.75 ± 32.15 (10)	20.1 ± 0.99 (10)
W14.5-1	163.25 ± 3.33 (20)	142.60 ± 5.49 (10)	26.5 ± 1.43 (10)	5.4 ± 0.18 (10)	385.35 ± 21.67 (10)	16.5 ± 1.12 (10)

	Longitud de la zona de crecimiento de la raíz (μm) Lcpr	Longitud de las células completamente elongadas (μm) Le	Duración del ciclo celular (h) T	Tasa de producción celular (1/h) CPR	Punto reconocible del protoxilema (μm) PRP	Tiempo de diferenciación del protoxilema (h) Tpd
	****	*****		****	****	*****
WT	682.85 ± 31.88 (10)	156.15 ± 5.92 (10)	12.27 ± 0.74 (10)	1.89 ± 0.08 (10)	773.6 ± 19.67 (10)	3.81 ± 0.13 (9)
W14.5-1	527.95 ± 22.02 (10)	113.45 ± 4.16 (10)	12.69 ± 1.03 (10)	1.48 ± 0.6 (10)	641.4 ± 29.32 (10)	5.35 ± 0.28 (8)

Tabla 1. Parámetros celulares calculados para WT y para W14.5-1 en raíces del día 7 crecidas en medio MS 0.2X con 2% de sacarosa. Promedio \pm ES. Número de réplicas en paréntesis. Diferencia estadística con una $\alpha < 0.1$, $\alpha < 0.05$, $\alpha < 0.02$, $\alpha < 0.005$, $\alpha < 0.002$, $\alpha < 0.001$ se indica como *, **, ***, ****, ***** y ***** respectivamente.



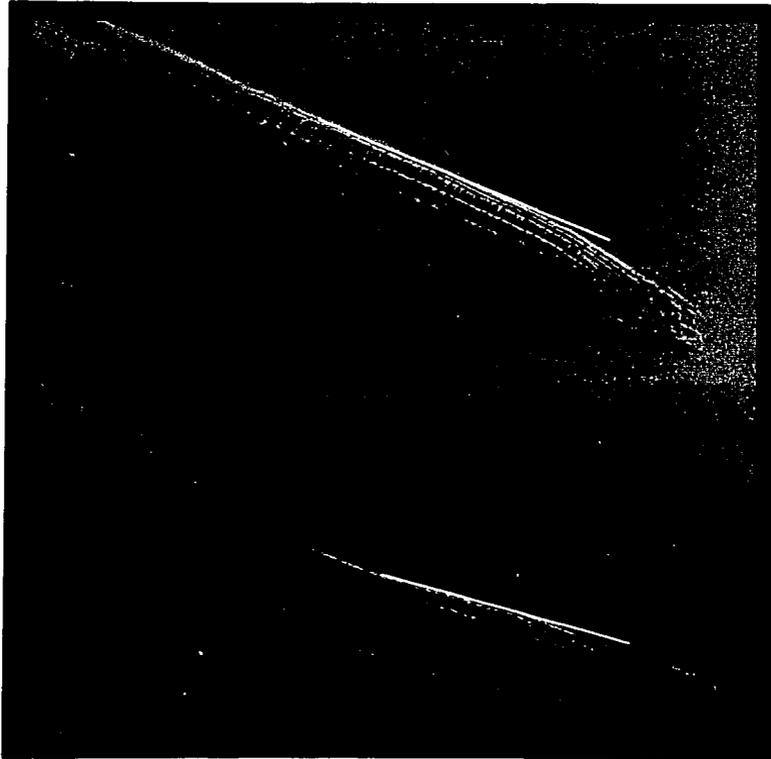
Fotografía 1. Longitud alcanzada por las raíces de W14.5-1, W14.2-6 y WT en el día 7, crecidas en medio MS 0.2X con 2% de sacarosa.

La tasa de crecimiento de WT, de W14.2-6 y de W14.5-1 es de 265.15 $\mu\text{m/h}$, 207.5 $\mu\text{m/h}$ y 163.25 $\mu\text{m/h}$ respectivamente. Estas diferencias quedan manifiestas al observar la longitud alcanzada por cada raíz en el día 7 después de haber sido sembradas (fotografía 1).

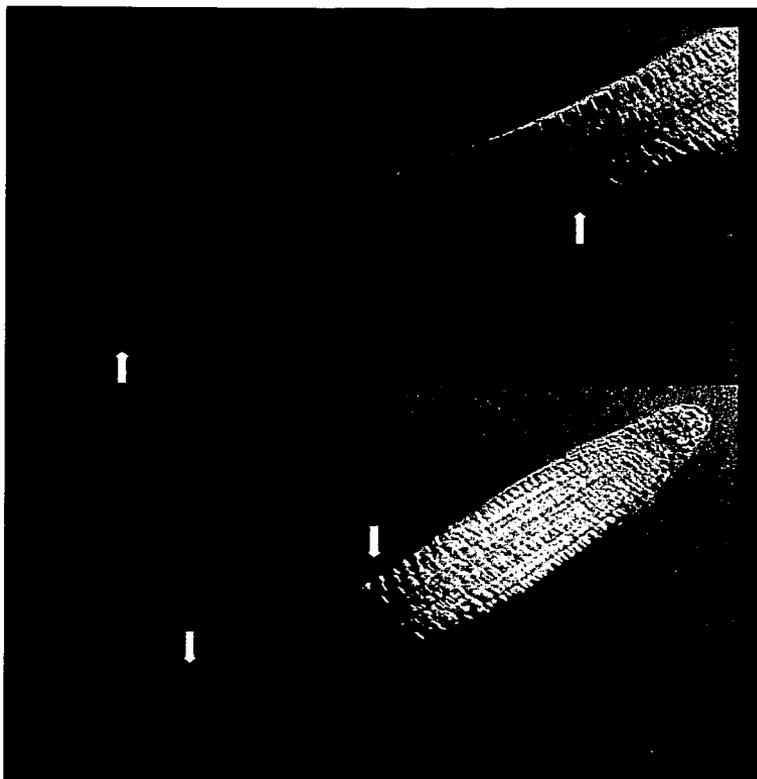
Con la prueba estadística utilizada no se detecta una diferencia significativa entre la longitud del meristemo (L_m) de WT y W14.5-1, ya que el valor calculado de U se encuentra entre una α de 0.1 y 0.05. Sin embargo, de manera contundente no se ven diferencias significativas en la longitud promedio de una célula meristemática (L_{cm}), mientras que el número de células meristemáticas (N_m) es claramente diferente entre WT y W14.5-1 (fotografía 2). Lo anterior sugiere que la prueba estadística no es lo suficientemente sensible para detectar la diferencia entre las longitudes de los meristemos (L_m). Además de lo anterior, sí se encuentran diferencias significativas entre L_m de WT y de W14.5-1 utilizando la prueba estadística paramétrica de T .

La zona de elongación (L_e) de W14.5-1 es más pequeña que en WT, al igual que el número de células que la conforman (N_e) (fotografía 3). La longitud de la zona que contribuye al crecimiento de la raíz (L_{gpr}) es claramente mayor en WT que en W14.5-1 (ver fotografía 4). Las células de córtex en la zona de diferenciación no presentan un crecimiento (ver gráfica 7), por lo que se pudo calcular la longitud promedio de las células completamente elongadas (L_e), la cual es mayor en WT que en W14.5-1 (fotografía 5). El punto de reconocimiento del protoxilema (PRP) es mayor en WT que en W14.5-1, mientras que el tiempo de diferenciación del mismo (T_{pd}) es menor en W14.5-1. Es importante recalcar que

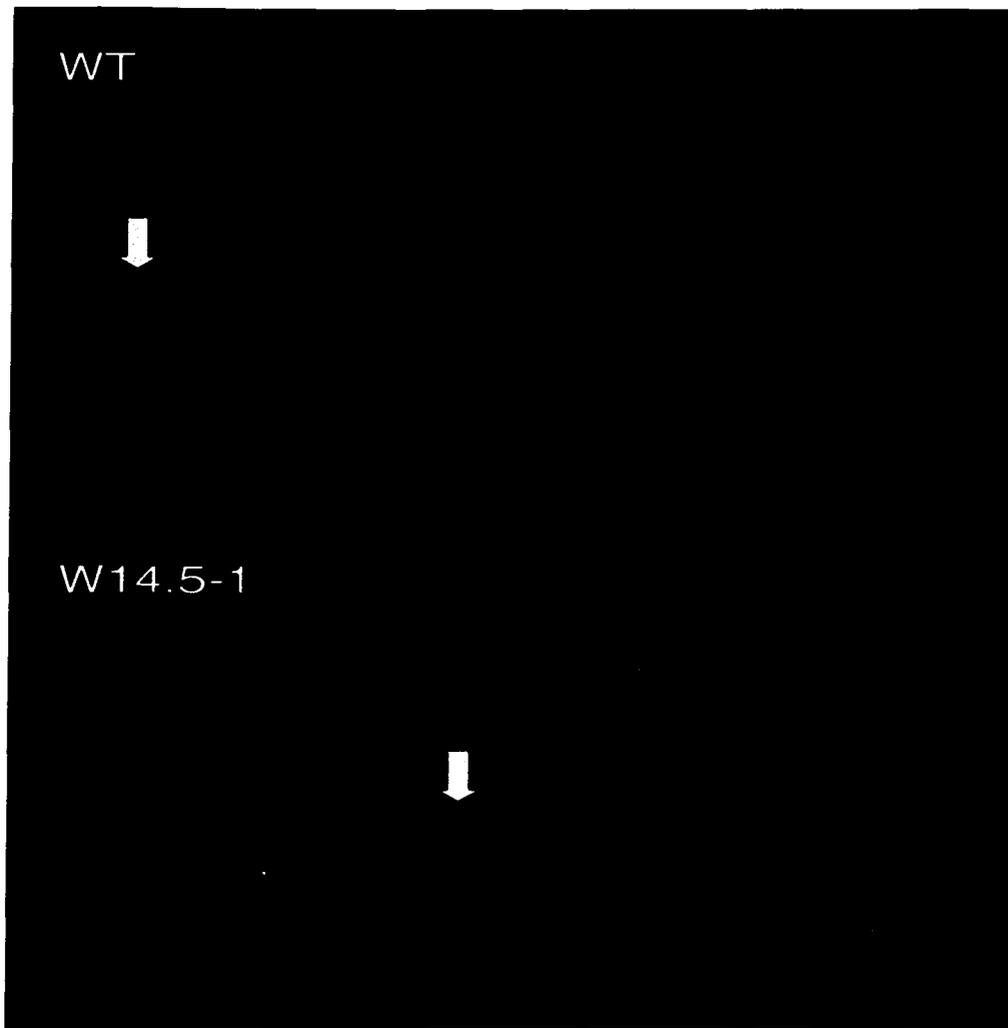
la duración del ciclo celular (T) es la misma para WT que para W14.5-1. Finalmente, la tasa de producción celular (CPR) es claramente menor en W14.5-1 que en WT.



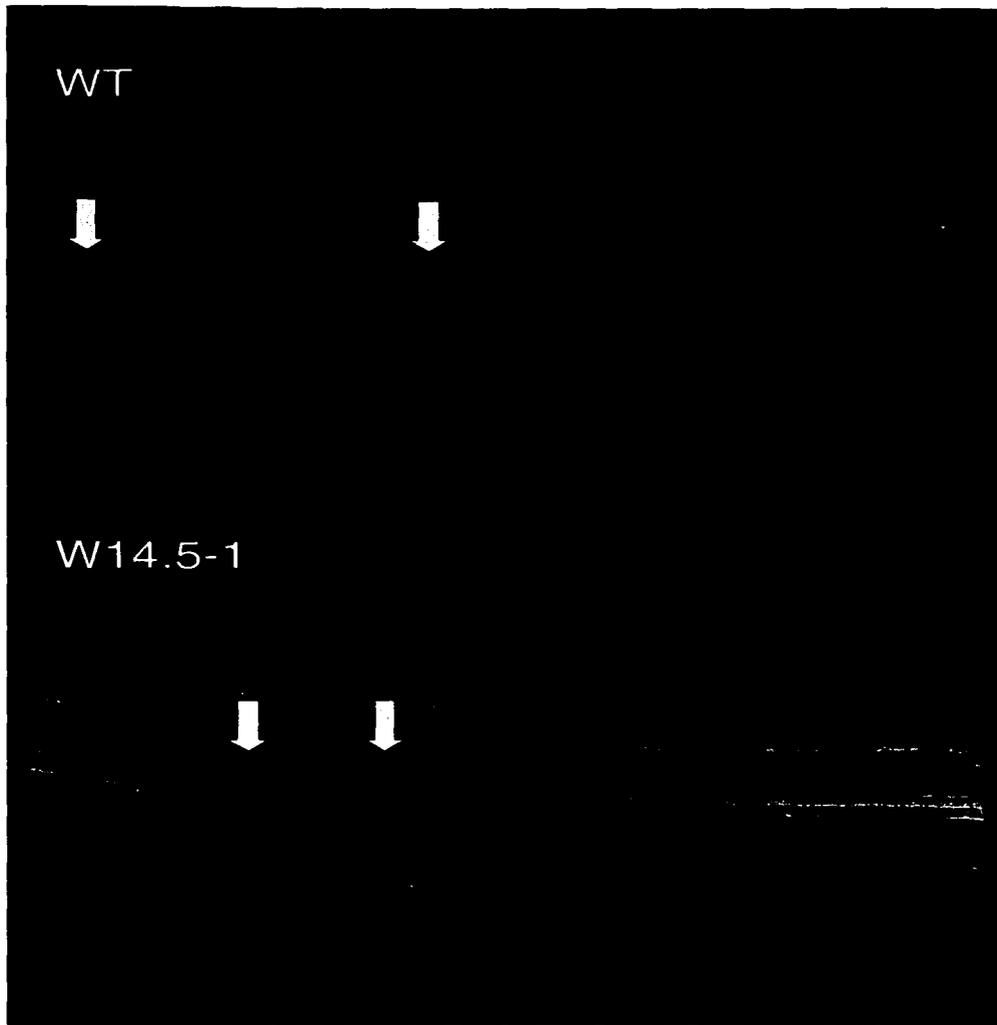
Fotografía 2. Meristemos de raíz primaria de WT y de W14.5-1 en el día 7. Las barras muestran que los meristemos son claramente diferentes en longitud (L_m) y en número de células meristemáticas (N_m), aunque la longitud promedio de una célula meristemática (L_{mc}) es la misma.



Fotografía 3. Zona de elongación en raíces WT y W14.5-1 en el día 7. Las flechas indican aproximadamente los límites de esta zona.

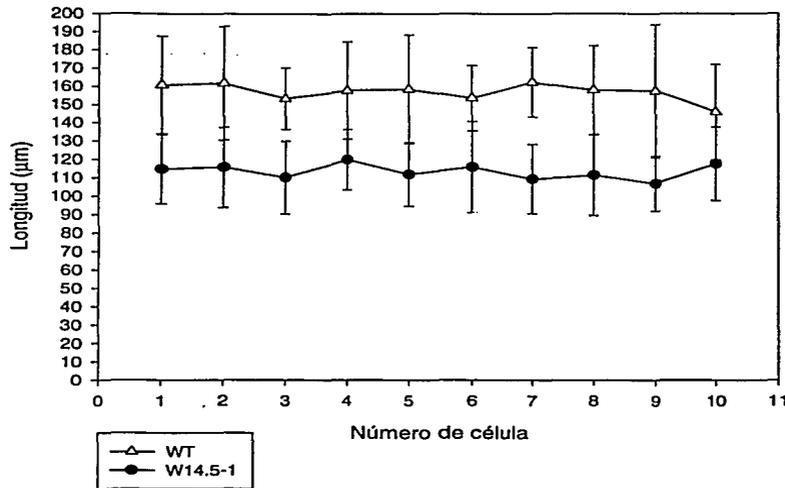


Fotografía 4. Longitud aproximada de la zona que contribuye al crecimiento de la raíz (Lgpr) en WT y en W14.5-1 en el día 7, indicada con una línea. Esta zona está delimitada en la región proximal por el inicio de la formación de un pelo radicular (flecha).



Fotografía 5. Longitud de las células completamente elongadas (Le) de WT y de W14.5-1 en el día 7. Las flechas muestran los límites aproximados de una célula en córtex.

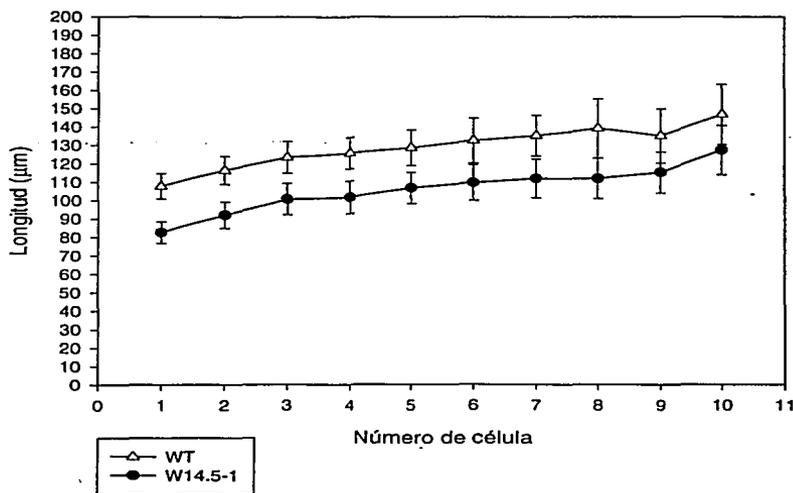
Gráfica 7. Longitud de células completamente elongadas



Se graficó la longitud de las células epidérmicas de WT y de W14.5-1 que inician su diferenciación. En la gráfica 8 se puede observar que la célula epidérmica de W14.5-1 que inicia su diferenciación al formar una protuberancia para dar origen a un tricoblasto (célula 1) es claramente menor que la célula 1 de de WT. En ambos casos las células de epidermis continúan creciendo aún cuando hayan iniciado su diferenciación. Lo anterior se puede apreciar debido a que hay diferencias significativas entre la célula 1 (e incluso la 2) y la 10 de WT por un lado, y la célula 1 (e incluso la 2) y la 10 de W14.5-1 por el otro. Las células de este tejido continúan creciendo, aunque en la posición 10 ya no son significativamente diferentes entre WT y W14.5-1. Sin embargo, dada la dificultad de medir las longitudes en las células más basales (por ejemplo en las células 10),

se obtuvo para ellas un número menor de datos en comparación con las células más apicales (por ejemplo la célula 1). Es probable que con un número mayor de datos se obtengan diferencias significativas entre las células que se encuentran en la posición 10 de WT y de W14.5-1.

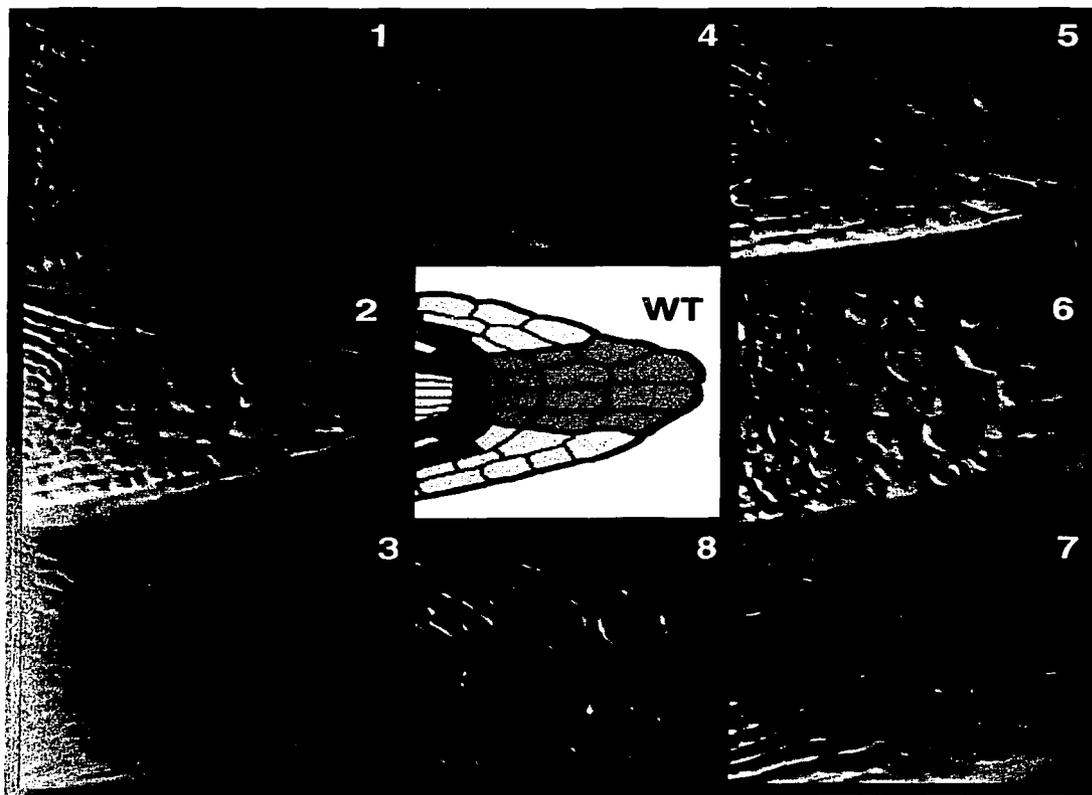
Gráfica 8. Longitud de células que ya iniciaron su diferenciación



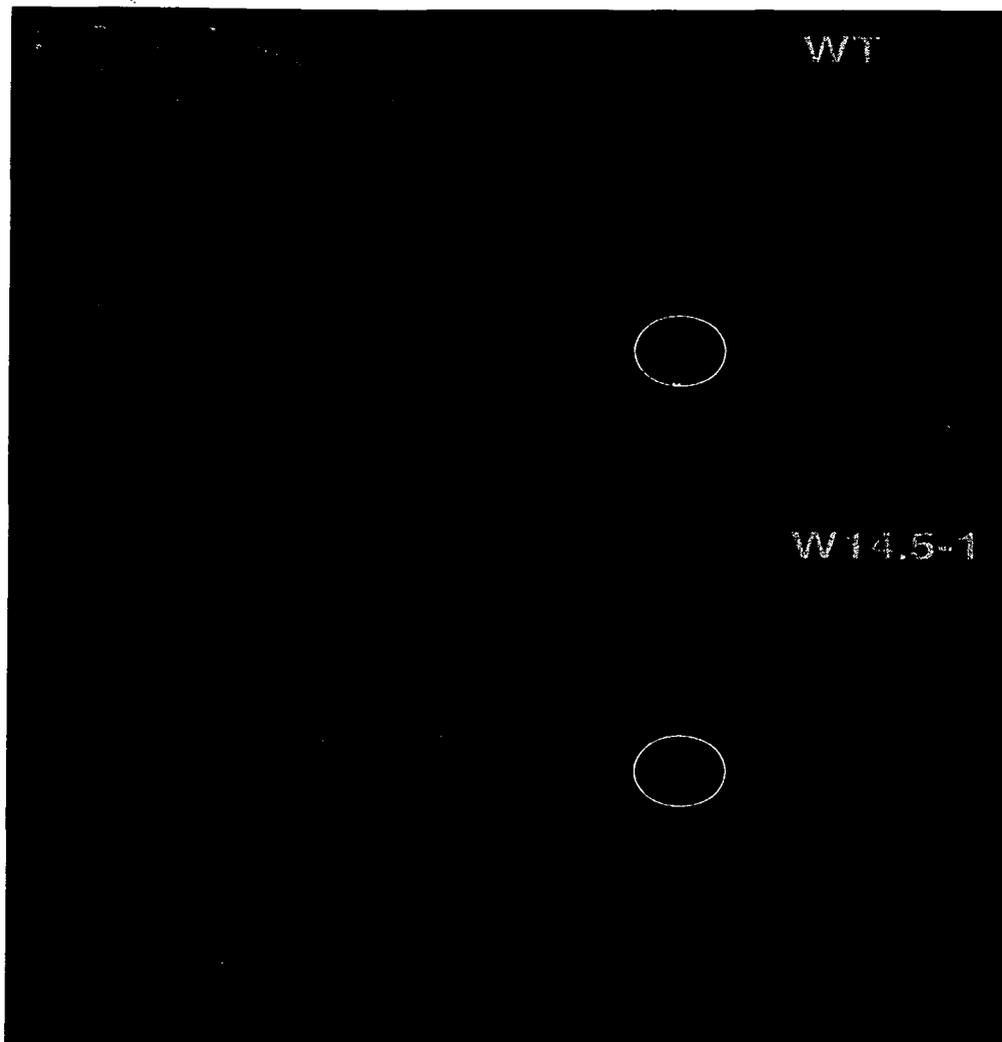
6.2.4 Datos cualitativos del fenotipo de W14.5-1 y W14.2-6

De manera cualitativa, se observa en el mutante W14.5-1 una desorganización en general de la cofia de la raíz. Esto es especialmente notorio en la columela. En este tejido, se aprecia que algunos planos de división son atípicos (ver fotografía 6 y 8), y parece ser que la elongación de algunas células también está alterada ya que su morfología es anormal (fotografías 6). Aparentemente, las células resultantes de la división periclinal de las iniciales de

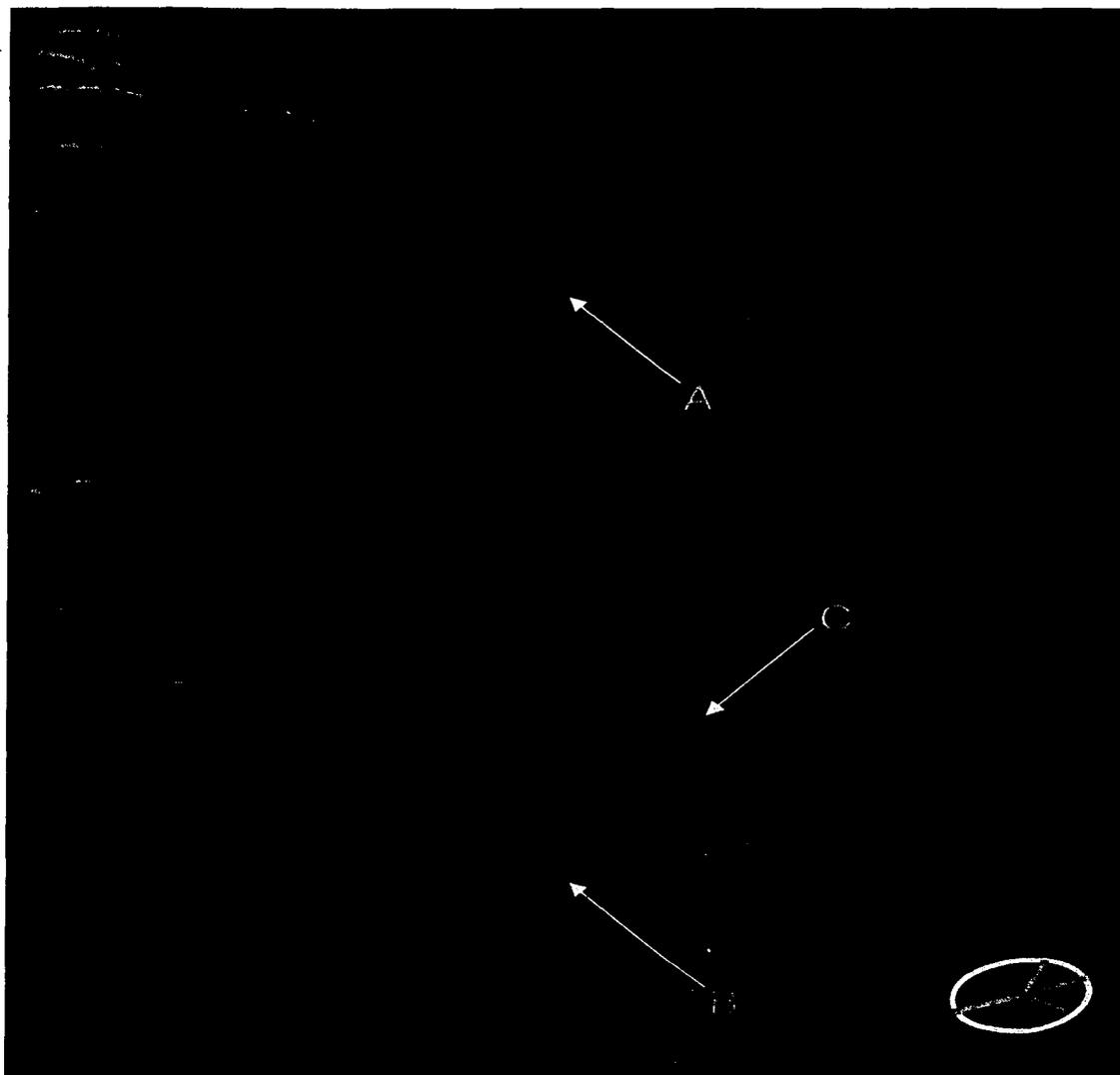
columela se están elongando lentamente o se están dividiendo rápidamente (fotografía 7). Además, los gránulos de almidón característicos de este tejido no se aprecian en las raíces analizadas (fotografía 8). Por lo tanto, es probable que existan alteraciones en la división y en la diferenciación celular de la columela.



Fotografía 6. Cofia de la raíz de WT (1, 2 y 3) y de W14.5-1 (4, 5, 6, 7 y 8) en el día 7.



Fotografía 7. Zona proliferativa y cofia de WT y de W14.5-1. Los círculos señalan la zona que rodea al centro quiescente. Al parecer en W14.5-1 hay en al menos una fila extra de células por debajo del centro quiescente, lo que sugiere que las células iniciales de la columela no se están elongando apropiadamente o se están dividiendo rápidamente.



Fotografía 8. Cofia de WT y de W14.5-1. En WT se muestran células con gránulos de almidón (A), mientras que en W14.5-1 no se encuentran (B). Algunas células de la columela de W14.5-1 presentan planos de división incorrectos (C), representados como líneas amarillas en el recuadro inferior.

También de manera cualitativa, se notó un retraso comparado con WT en el crecimiento de la parte aérea de las plantas mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) crecidas en tierra y en condiciones de fotoperiodo. Este retraso en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva fue más drástico en W14.5-1 que en W14.2-6. Las plantas mutantes (W14.2-6 y W14.5-1) tardan más tiempo en producir el eje que dará origen al tallo y a las inflorescencias. Sin embargo, las hojas de roseta continúan creciendo en número y en tamaño, sobrepasando la cantidad y la longitud de las de WT. En algunos casos el tallo prácticamente no se elonga, por lo que las flores se producen en una posición muy cercana a las hojas de roseta. En ciertos casos, el retraso implicó varios meses de diferencia entre la aparición de flores en WT y en los mutantes. A pesar de eso, el desarrollo de los primordios florales producidos es normal. Este comportamiento de floración tardía no se observa en plantas que en un principio fueron crecidas en medio MS 0.2X con 2% de sacarosa y que posteriormente (a los 15 días) fueron trasplantadas a tierra, también en condiciones de fotoperiodo.

6.3 Búsqueda de motivos en la secuencia cis-regulatoria de *AGL14* asociados a procesos de señalización

En la base de datos PLACE se encontraron motivos en la secuencia cis-regulatoria de *AGL14* asociados a procesos de señalización. Estos motivos han sido reportados en las secuencias cis-regulatorias de otros genes. Se ha demostrado que algunos de los motivos encontrados intervienen en la expresión de genes en respuesta a hormonas específicas. Se localizaron elementos relacionados con respuesta a auxinas, ABA y giberelinas. La descripción reportada en el sitio web para cada motivo se presenta en la siguiente tabla:

Posición (cadena)	Secuencia	Descripción
2460 (-)	TGTCTC	Sitio de unión a factores de respuesta a auxinas encontrado en los promotores de los genes que responden a auxinas de manera temprana en <i>Arabidopsis thaliana</i> .
1884 (+)	TGACGTAA	TGA-box #1, encontrado en el elemento de respuesta a auxinas putativo del promotor GH3 de <i>Glycine max</i> (soya)
169 (+)	CATATG	Sitio encontrado en el elemento NDE de <i>Glycine max</i> (soya) del promotor del gen SAUR (Small Auxin-Up RNA) 15A implicado en la respuesta a auxinas
466 (+) 1992 (+) 2182 (+) 2701 (+) 239 (-) 671 (-)	ACTTTA	Se requiere para la expresión tejido-específica y para la inducción por auxinas
1739 (+) 1884 (+)	TGACG	Motivo encontrado en muchos promotores implicados en la activación transcripcional de genes por medio de auxinas o ácido salicílico
518 (+) 1745 (+) 1040 (-) 1777 (-)	ACACNNG	Motivo encontrado en promotores cuya activación es inducida por ABA y ácido salicílico
1014 (+) 1692 (+) 2405 (+) 1763 (-)	CCGAC	Implicado en la respuesta a ABA
764 (-)	CACATG	Implicado en la respuesta a ABA
292 (+) 2050 (+) 833 (-) 2343 (-)	TAACAAA	Elemento central del complejo de respuesta a giberelinas (GARC)

7. DISCUSIÓN

Entender cómo regulan las plantas su crecimiento es una de las preguntas centrales de la fisiología vegetal. El crecimiento de la raíz, al igual que el de otros órganos, está determinado por señales del ambiente externas y por señales del desarrollo internas (Mizukami, 2001). Para comenzar a determinar la naturaleza y la relación entre estas señales, es útil desarrollar herramientas que permitan el estudio funcional de genes que pertenezcan a familias multigénicas cuya importancia en el desarrollo haya sido demostrada.

Los resultados de este estudio permiten determinar líneas homocigas de mutantes de pérdida de función por inserción de transposón en *AGL14*, un gen de la familia MADS-box que se expresa en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se analizaron diferentes líneas de los dos alelos mutantes W14.2-6 y W14.5-1. Por medio de análisis de Southern blot, se detectó en algunos casos para ambos alelos cierto grado de excisión del transposón en tejido de hoja. Sin embargo, los análisis de expresión de mRNA indican que el gen *AGL14* no se está expresando en la raíz de una línea homociga del alelo W14.5-1 (W14.5-1 7). En una línea homociga del alelo W14.2-6 (específicamente W14.2-6 9) se detectó una expresión muy baja de *AGL14* en tejido de raíz en comparación con WT, lo cual indica que ésta no es una línea mutante nula. Estos resultados sugieren que contamos con una línea mutante homociga con una expresión nula a nivel de mRNA del gen *AGL14* en *Arabidopsis thaliana* (W14.5-1 7) y con otra línea mutante homociga débil del mismo gen con bajos niveles de expresión de mRNA.

Ambas mutantes constituirán herramientas útiles para el estudio funcional de este gen.

El tipo de diferencias morfológicas que se observan en ambos mutantes es el mismo, aunque el impacto de la mutación en el fenotipo de W14.2-6 no es tan drástico como en W14.5-1. Debido a que se observa un fenotipo similar en los dos alelos mutantes, se puede afirmar que las diferencias morfológicas con respecto a WT son causadas por la inactivación de *AGL14*. Sin embargo, las diferencias que se encontraron entre los dos alelos pueden deberse a que W14.2-6 posee una expresión parcial de mRNA de *AGL14*, lo cual puede estar produciendo una proteína funcional. Adicionalmente, se encontró cierto nivel de excisión del transposón en los mutantes. Esta excisión podría provocar que algunas células de la raíz de W14.2-6 tuvieran un genotipo WT, provocando una detección de mRNA funcional de *AGL14*. Para disminuir la posibilidad de la excisión del transposón, es necesario realizar en un futuro retrocruzadas para eliminar la transposasa. Por otro lado, para verificar si el mRNA de *AGL14* producido en W14.2-6 es funcional se requiere realizar su transcripción reversa y posteriormente clonarlo y secuenciarlo.

Como primer paso en la caracterización funcional de *AGL14*, se identificaron tres medios en los cuales se observan diferencias significativas en el crecimiento de la raíz de WT, W14.2-6 y W14.5-1 (MS 1X con 1% de sacarosa, MS 1X con 1% de sacarosa y MS 0.2X con 2% de sacarosa). En estos medios la raíz de W14.5-1 crece más lento que la de W14.2-6, y la de esta última crece a su vez más lento que la de WT. En estos tres medios es claro que ambos alelos mutantes crecen más lentamente que WT. Debido a que esta diferencia en el crecimiento se detectó en diversos medios, se refuerza la relación que existe entre

la mutación y el efecto observado en el crecimiento. Por lo tanto, se puede afirmar que *AGL14* interviene en el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana*. Lo anterior apoya la idea de que, al igual que para las estructuras reproductivas, el sitio de expresión de los genes MADS-box en estructuras vegetativas es predictivo del lugar en el cual actúa la proteína para la cual codifican, regulando el desarrollo de ese órgano o tejido. El fenotipo de retraso en el tiempo de floración que se observó en el mutante de manera cualitativa podría indicar que la acción de *AGL14* no está restringida a la raíz. Debido a esto, no se descarta la posibilidad de que se exprese en tejidos aéreos.

Los parámetros celulares se midieron únicamente en el medio en el que se encontró la mayor diferencia en el crecimiento (MS 0.2X con 2% de sacarosa) entre las raíces de ambos alelos mutantes y WT. A pesar de que no se midieron estos parámetros en los medios en los que no se encontraron diferencias en el crecimiento, es probable que el fenotipo mutante pueda ser visto más claramente al crecer la planta en medios que aceleren su tasa de crecimiento (por ejemplo en medios con altas concentraciones de sacarosa). Lo anterior sucede con los mutantes no alélicos *cobra*, *lion's tail* y *pom-pom*, que poseen una expansión celular anormal que provoca cambios radiales cuando crecen en medios con alta sacarosa. Esta situación puede indicar que las mutaciones afectan algún factor que limita la expansión celular apropiada cuando las raíces crecen rápidamente, pero que procesos redundantes pueden sustituir al producto génico faltante cuando las raíces crecen más lentamente (Benfey *et al.*, 1993; Benfey y Schiefelbein, 1994).

Al controlar la variación de los factores ambientales externos, se puede iniciar el análisis de las señales del desarrollo internas que determinan el crecimiento de un órgano. Los cambios en el número y en la forma de las células pueden estar relacionados con el tamaño y la forma de los órganos y del organismo en su conjunto. A pesar de que el crecimiento de un órgano está relacionado directamente con la expansión celular, la tasa de crecimiento también tiene una correspondencia con la producción celular, ya que determina cuántas células se están expandiendo en cierto momento (Beemster y Baskin, 1998). Los estudios sobre la regulación de la tasa de crecimiento y sobre la tasa de división celular rara vez han medido la expansión (Beemster y Baskin, 1998). Sin embargo, para entender cómo regulan las plantas el crecimiento de sus órganos es necesario cuantificar la expansión y la tasa de producción celular distinguiendo sus componentes.

En este trabajo se estudió la división y la expansión celular solamente en el eje longitudinal de la raíz, simplificándola como una fila sencilla de córtex. Este supuesto es razonable debido a que la expansión radial de la raíz en *A. thaliana* y las divisiones formativas se encuentran restringidas a la parte más apical de la zona de crecimiento (Dolan *et al.*, 1993; Beemster y Baskin, 1998). En cada raíz se midió la longitud de la zona meristemática (L_m) y de elongación de la raíz (L_e), el número de células en cada una (N_m , N_e), la longitud de las células completamente elongadas (L_e) y la tasa de crecimiento (V). Con estos datos se calcularon el resto de los parámetros celulares (L_{mc} , L_{grp} , T , CPR , PRP y Tpd). A partir de los datos obtenidos se puede comenzar a entender la dinámica celular de

la raíz de W14.5-1, cuya tasa de crecimiento (V) en comparación con WT está reducida.

La tasa de producción celular de un meristemo tiene dos componentes: el número de células en división (N_m) y su tasa de división. Se ha planteado que el número de células en división está determinado por el tamaño celular (L_{mc}) y por el tamaño del meristemo (L_m), mientras que la tasa de división celular está determinada por la regulación del ciclo celular. Por lo tanto, diferentes mecanismos pueden causar un cambio equivalente en la tasa de producción celular (Beemster y Baskin, 1998). En el caso de W14.5-1, la disminución en la tasa de producción celular (CPR) es consecuencia de un cambio en el número de células en división (N_m), ya que la duración del ciclo celular (T) no está alterada. Lo anterior se puede asegurar aún cuando no se haya medido la tasa de división celular, ya que este parámetro es inversamente proporcional a la duración del ciclo celular (T) (Baskin, 2000). En W14.5-1, parece ser que el cambio en el número de células en división (N_m) es debido a una transición más rápida de las células desde la zona meristemática hacia la zona de elongación. Esto podría ser por un proceso que disminuya la longitud de la zona meristemática (L_m), ya que el tamaño de las células meristemáticas es el mismo que en WT (L_{cm}).

La zona de elongación (L_e) también se encuentra disminuida en W14.5-1 comparada con WT y además contiene un número menor de células (N_e). Después de pasar por la zona de elongación, la longitud de las células epidérmicas que comienzan a formar una protuberancia es significativamente menor en W14.5-1 que en WT: Se observó que las células epidérmicas de WT y de W14.5-1 continúan creciendo ligeramente. En el córtex, la longitud final de las

células completamente elongadas (Le) es significativamente más pequeña en W14.5-1 que en WT. Estos resultados indican que en W14.5-1 la diferenciación puede iniciarse en células más cortas que en WT. Además, estas células que ya iniciaron su diferenciación nunca consiguen el tamaño normal (el que se observa en WT) en etapas posteriores de su desarrollo.

Tradicionalmente, la regulación del crecimiento y la morfogénesis en las plantas se ha visto desde dos perspectivas distintas (Beemster y Baskin, 1998). La teoría organísmica o espacial propone que el crecimiento y la morfogénesis son guiados por la expansión de órganos cuyas células simplemente reparten los volúmenes resultantes. En lugar de que la división y la expansión celular sean la causa del crecimiento y de la morfogénesis, ellos representan la marca o el indicio de estos últimos. Bajo esta visión, la división y la expansión celular se especifican por señales posicionales globales que pueden ser el resultado de comunicaciones celulares. Esta señalización global podría ser una propiedad emergente de la red de comunicación celular de corto alcance. En particular se ha considerado que en la raíz, el establecimiento de la transición entre la zona meristemática y la zona de elongación está especificada por controles posicionales que actúan sobre el proceso de expansión (Beemster y Baskin, 1998; Scheres y Heidstra, 1999).

La perspectiva celular sostiene que la división y la expansión autónoma de las células dirigen el crecimiento y la morfogénesis. Las células son consideradas entidades individuales que en su conjunto forman al organismo. Esto implica que la duración y el número de divisiones celulares y el tiempo y la extensión de la expansión celular determinan directamente el tamaño del órgano y se especifican en las células (Scheres y Heidstra, 1999). En el caso de la raíz, esta perspectiva

reconoce que la existencia de la zona de elongación está determinada por la trayectoria de las células que se desplazan elongándose sin dividirse y sin iniciar su diferenciación desde el límite basal de la zona meristemática (Beemster y Baskin, 1998; Scheres y Heidstra, 1999). Es interesante notar que la teoría organísmica tiene una correspondencia mayor con la especificación del destino celular por información posicional. Por el otro lado, podría existir una relación entre la teoría celular y la determinación del destino celular con base en el linaje.

Desde la visión espacial, cambios únicamente en la producción celular modificarían el tamaño final de las células diferenciadas, pero no el tamaño de la zona de elongación. Por el contrario, desde la visión celular, alteraciones en la producción celular cambiarían el tamaño de la zona de elongación, pero no el tamaño final de las células diferenciadas (Scheres y Heidstra, 1999). Las visión organísmica y la celular no son incompatibles para explicar la regulación del crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los estudios sobre la tasa de crecimiento de un órgano no se han distinguido estas dos perspectivas, debido a que en general se encuentran efectos tanto en la producción como en la elongación celular (Beemster y Baskin, 1998), como ocurre en W14.5-1.

Como ya se mencionó, en el mutante W14.5-1 está alterada la tasa de producción celular (CPR) debido a una disminución en el número de células meristemáticas (Nm). Además, la longitud final de las células maduras (Le) está reducida. Desde la visión espacial, la disminución en la tasa de producción celular (CPR) podría explicar por sí sola la reducción de la longitud final de las células maduras (Le); pero no de la zona de elongación (EZ). Un desplazamiento hacia la zona apical de las señales que promueven la diferenciación e inhiben la

elongación podría disminuir la longitud de la zona de elongación (EZ). La disminución de la zona de elongación podría a su vez disminuir aún más la longitud final de las células maduras (L_e). Desde la perspectiva celular, la disminución en la tasa de producción celular (CPR) podría explicar por sí sola la reducción de la zona de elongación (EZ), pero no las alteraciones en la longitud final de las células maduras (L_e). Un acortamiento del tiempo durante el cual una célula debe elongarse sin dividirse para posteriormente dar inicio a su diferenciación podría disminuir la longitud final de las células maduras (L_e). Esta reducción podría a su vez acortar aún más la longitud de la zona de elongación (EZ). Es importante hacer notar que bajo cualquiera de las dos visiones es necesario que exista una relación inhibitoria entre los procesos de elongación y diferenciación, la cual no estaría sido modificada en el mutante W14.5-1. Esta relación ya ha sido planteada (Scheres y Heidstra, 1999), aunque no se ha demostrado.

A través de un método cinemático y utilizando imágenes de video grabadas cada cierto lapso de tiempo, trabajos previos han cuantificado la expansión celular y la tasa de producción celular en el córtex de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Beemster y Baskin, 1998). Se ha demostrado que la aceleración del crecimiento de la raíz con el tiempo (Baskin *et al.*, 1995) es debida a un aumento en el número de células en el meristemo y no a una modificación de la tasa de expansión celular, de la longitud celular o de la tasa de división celular (Beemster y Baskin, 1998). Esto se refleja en el incremento de la longitud de la zona meristemática y de elongación, y en el aumento estable del número de células en estas zonas. La zona de elongación se debe ir alargando con el tiempo para permitir que las

células alcancen su tamaño normal al madurar. Es decir, los tamaños de la zona de división y de la zona de elongación están acoplados (Scheres y Heidstra, 1999).

Existen experimentos en donde se ha mostrado que la tasa de crecimiento de una raíz no se altera al modificar la tasa de división celular (Scheres y Heidstra, 1999). Un incremento en la tasa de división celular resulta en una disminución del tamaño de una célula madura, y viceversa. Alteraciones en la tasa de división celular pueden producir más células cortas o menos células más largas en la zona meristemática. Sin embargo, en una zona de elongación inalterada ellas no alcanzarían su tamaño normal. En experimentos en los cuales se modifica la tasa de división celular las células sí alcanzan su tamaño final normal (Scheres y Heidstra, 1999). Estos resultados refuerzan la idea de que existe un acoplamiento entre el tamaño de las zonas de división y de elongación a través de señales del desarrollo. Debido a que los tamaños de la zona de división y de la zona de elongación están acoplados, se cree que constituyen una sola zona de desarrollo. Esta idea sugiere a su vez que las señales que regulan los tamaños de estas zonas también deben estar acopladas (Scheres y Heidstra, 1999).

El trabajo que hemos presentado aquí, muestra que en W14.5-1 los tamaños de la zona meristemática y la zona de elongación se encuentran desacoplados. Esto se debe a que en W14.5-1 la disminución de la zona meristemática no produce un aumento de la zona de elongación tal que asegure que las células maduras alcancen una longitud final normal (como en WT). Si estuvieran acopladas, la longitud de la zona de elongación de W14.5-1 debería ser más grande, para permitir que las células alcancen un tamaño final normal al

iniciar su diferenciación. Por lo tanto, se puede plantear que *AGL14* es necesario para el acoplamiento entre la zona meristemática y la zona de elongación que conlleve a la producción de un número adecuado de células maduras con un tamaño final normal.

En estudios previos, se ha demostrado que en WT los atricoblastos son más largos que los tricoblastos al diferenciarse (Beemster y Baskin, 1998). Lo anterior indica que las filas de atricoblastos producen menos células que las de tricoblastos. Esta diferencia en el número de células es debida a que ambas filas deben tener la misma velocidad longitudinal en cualquier posición (Beemster y Baskin, 1998), ya que no existe en la raíz un desplazamiento entre las filas. Además, se ha visto que la longitud de los tricoblastos es prácticamente igual que la de las células corticales en la parte apical de la zona de crecimiento (Beemster y Baskin, 1998). Debido a lo anterior, los tricoblastos y las células corticales también se producen a tasas similares de producción celular. Sin embargo, al medir la tasa de división celular no se han observado diferencias entre los tricoblastos, atricoblastos y las células corticales. Esto sugiere que la regulación del crecimiento de las filas de atricoblastos está dado por un cambio en el número de células en división y no por un cambio en la duración del ciclo celular (Beemster y Baskin, 1998). Esto podría ser posible regulando el tamaño de la célula inicial de epidermis (Beemster y Baskin, 1998)

A pesar de que en este trabajo no se midieron los parámetros celulares en epidermis, lo anterior muestra un proceso de regulación del desarrollo de la raíz WT de *Arabidopsis thaliana* en el cual se modifica la longitud final de las células (Le) en filas que poseen una tasa de producción celular diferente (CPR) y una

misma duración del ciclo celular (T). Es decir, podría existir una relación entre el número de células en división (Nm) y el tamaño final de las células (Le). Sin embargo, hacen falta más estudios para probar esto. Por otro lado, el hecho de que los tricoblastos y los atricoblastos tengan un origen común durante el desarrollo de la raíz y que detengan su elongación al mismo tiempo habiendo alcanzado una longitud diferente, podría apoyar la idea de que la elongación está determinada por información posicional.

Se ha visto que existen señales de corto alcance mediadas por el contacto entre células que provienen del centro quiescente, y que mantienen a las células iniciales relativamente indiferenciadas (van den Berg *et al.*, 1997). Se sabe que las células maduras de la columela contienen gránulos de almidón característicos que no se encuentran en las células iniciales. La ablación de una célula del QC provoca que la célula inicial de columela adyacente deje de dividirse y comience a elongarse, acumulando gránulos de almidón. Es decir, promueve su diferenciación. Por lo tanto, en condiciones normales las células del QC inducen la división celular de las células iniciales de columela dentro de un rango celular corto y también regulan negativamente su diferenciación. Se ha demostrado que las células del centro quiescente controlan el estado de diferenciación de las células iniciales de la columela en ausencia de división celular. Esto quiere decir que la división celular no es un prerequisite para que el centro quiescente inhiba la diferenciación (van den Berg *et al.*, 1997).

En la mayoría de las células de la columela de varias raíces W14.5-1 no se observan gránulos de almidón como en WT. Sin embargo, es necesario probar que existen alteraciones en la formación de gránulos de almidón. Esto podría

hacerse por medio de tinciones (por ejemplo con lugol). Parece ser que en este mutante las células iniciales de columela se están dividiendo más activamente o se están elongando más lentamente, ya que en muchos casos se encuentran una o dos filas de células con tamaños reducidos, es decir, del mismo tamaño que las iniciales de columela. Esta situación podría indicar que la diferenciación de la columela está parcialmente inhibida, aunque su proliferación no. La ausencia de gránulos de almidón en algunos individuos de W14.5-1 podría estar asociado a un alcance mayor de las señales que inhiben la diferenciación. Sin embargo, otra posibilidad es que *AGL14* participe directamente en la elongación de las células de la columela.

En este trabajo se encontraron motivos en la secuencia cis-regulatoria de *AGL14* que se han encontrado previamente en promotores de otros genes que responden a auxinas. Se ha demostrado que algunos de estos motivos son determinantes en la respuesta que tienen los genes a la hormona. Es probable que *AGL14* esté regulado por auxinas, posiblemente a través de genes que responden a su vez a esta hormona. Se encontraron otros motivos relacionados con una respuesta a ABA y a giberelinas. Sin embargo el número de motivos encontrados para estas hormonas es menor.

Se ha planteado que genes integrados en múltiples módulos pueden tener un efecto pleiotrópico más amplio. Por el contrario, genes cuya acción está restringida a un solo módulo podrían tener un impacto limitado en el organismo en su conjunto (Doebley y Lukens, 1998). Las zonas de la raíz podrían considerarse como módulos del desarrollo. Es probable que *AGL14* esté interviniendo en diferentes procesos. *AGL14* podría intervenir en la determinación del número de

células meristemáticas, en ciertos planos de división (por ejemplo de algunas células de la columela) y en la elongación celular (e.g. longitud de una célula que inicia su diferenciación, tamaño final de una célula diferenciada y elongación de células de la columela), probablemente respondiendo a auxinas a través de otros genes cuya respuesta a esta hormona ya ha sido demostrada.

Para identificar si hay una determinación errónea de la identidad de las células de la columela en W14.5-1, será necesario obtener cruza con plantas transgénicas que poseen marcadores celulares específicos de ese tejido. La generación y el análisis de líneas de sobre-expresión del gen *AGL14* serán fundamentales para proseguir con la caracterización funcional de este gen, ya que permitirán confrontar lo que se ha planteado en este trabajo.

Existen patrones de expresión de mRNA reportados para genes MADS-box que se expresan en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Burgeff *et al.*, 2002). Estos genes se expresan en diferentes regiones de la raíz, sugiriendo que poseen funciones diversas. Estos patrones de expresión son indispensables para formular hipótesis acerca de la relación a nivel transcripcional de genes MADS-box específicos de raíz y para guiar las caracterizaciones funcionales de estos genes (por ejemplo al establecer posibles relaciones de redundancia funcional). Como hipótesis se podría plantear que *AGL14* activa transcripcionalmente algunos de estos genes MADS-box, los cuales podrían tener funciones diversas. Esta es otra posibilidad para explicar la participación de *AGL14* en diversos procesos.

Una parte fundamental en el análisis de la función de *AGL14* será la obtención del patrón de expresión espacio-temporal de mRNA en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Ya que de manera cualitativa se observa un fenotipo de

floración tardía en W14.5-1, es necesario realizar experimentos de expresión de mRNA de *AGL14* también en tejido aéreo. De la misma manera, los análisis de la secuencia cis-regulatoria de *AGL14* serán muy útiles para determinar los sitios necesarios y suficientes para recuperar la expresión de mRNA y para mantener la posible relación con hormonas, como las auxinas, ABA y giberelinas.

Como ya se ha mencionado, existen ejemplos de redundancia funcional entre genes de la familia MADS-box. Actualmente se han reportado datos sobre la posible redundancia funcional de *AGL14* con otros genes de la familia MADS-box (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a). Para continuar con la caracterización funcional de *AGL14*, será necesario realizar cruzas dobles y triples con mutantes de aquellos genes, por ejemplo *AGL19*, *AGL20*, *AGL42* y otros genes del clado tipo SOC1. Además, será necesario realizar cruzas con plantas mutantes de genes que compartan el patrón de expresión de *AGL14*, ya sean o no de la familia MADS-box.

Por otro lado, se ha sugerido que la función de los genes MADS-box pertenecientes a la función B del modelo ABC de desarrollo floral está conservada en las angiospermas (Ambrose *et al.*, 2000). Se ha planteado que las raíces pudieron haber aparecido en dos eventos independientes (en licopodios y en otras pteridofitas). Por lo tanto, se puede esperar que la base genética del desarrollo de este órgano sea diferente en estos grupos (Cronk, 2001). Para probar esta hipótesis es necesario conocer más acerca de la genética molecular del desarrollo de la raíz en general, y particularmente en estos grupos. Específicamente, son necesarios estudios funcionales de genes MADS-box órtólogos a aquellos que participan en el desarrollo de la raíz, como *AGL14*, en otras pteridofitas.

El estudio del desarrollo de la raíz involucra un gran número de parámetros celulares. Por ello, es necesario que con ayuda de la biomatemática se generen modelos dinámicos, que predigan el crecimiento de una raíz a partir de las variables celulares involucradas.

8. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que los genes de la familia MADS-box codifican para factores de transcripción que son importantes en la determinación de la identidad de los órganos florales. Por otro lado, existen genes de esta familia que se expresan específicamente en la raíz de *Arabidopsis thaliana* y que forman clados monofiléticos. *AGL14* es uno de estos genes, cuya función no se conoce. En este trabajo se identificó una línea mutante homóciga por inserción de transposón para el gen MADS-box *AGL14*, denominada W14.5-1. Se comprobó que esta línea es nula en la expresión de mRNA. Con esta herramienta, se inició la caracterización funcional de este gen. La línea W14.5-1 posee una tasa de crecimiento menor que WT. A partir de análisis celulares, se determinó que en la raíz la zona meristemática y la de elongación son más pequeñas y que el tamaño de las células diferenciadas es menor que el de WT. Es decir, en W14.5-1 no se produce un número normal (como el de WT) de células diferenciadas con un tamaño correcto (como el de WT). El meristemo posee una tasa de producción celular más baja que WT, ya que está formado por un número menor de células meristemáticas. El tamaño de estas células y la tasa de división celular son iguales que en WT. Posteriormente en el desarrollo, estas células se elongan y comienzan su diferenciación cuando tienen una longitud menor que las células de WT. El resultado es una raíz con un número menor de células maduras con tamaños reducidos. En su conjunto, estos procesos son los responsables de la disminución de la tasa de crecimiento de la raíz de W14.5-1. Adicionalmente, en las células de

la columela se observan probablemente defectos en los planos de división, en la elongación y en la diferenciación celular.

En la región cis-regulatoria de *AGL14* se encontraron motivos que están asociados a respuestas por acción de las auxinas y otras hormonas. *AGL14* podría participar en respuesta a auxinas en la determinación del número de células meristemáticas, en el mantenimiento de los planos de división correctos de la columela y en la elongación adecuada de las células diferenciadas.

Es necesario seguir realizando estudios funcionales en *AGL14* y en otros genes MADS-box que se expresan en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Además, sería importante comenzar a hacer estudios en otras especies, en donde se aprecien de manera natural efectos fenotípicos como los mostrados en el mutante de *AGL14*, para ver si la función de los posibles ortólogos de este gen está conservada.

Parte de la diversidad fenotípica de las plantas vasculares es resultado de la variación en los patrones de crecimiento, en los que intervienen los meristemas. Estos patrones son regulados genética y hormonalmente. Una parte de esta regulación la llevan a cabo los factores de transcripción, al intervenir en procesos de proliferación, elongación y diferenciación celular. La comprensión de la base genética del desarrollo que contribuye a las innovaciones evolutivas permitirá comenzar a entender una parte de las causas próximas y últimas que originan la diversidad de formas en la naturaleza.

ANEXO A. PROTOCOLOS

Extracción de DNA genómico de planta para PCR

1. Cortar dos hojas pequeñas de la planta y molerlas con un pistilo en un tubo eppendorf de 1.5 ml a temperatura ambiente durante 15 segundos.
2. Agregar 400 µl de buffer de extracción. Agitar en vórtex durante 5 segundos. Se puede mantener la muestra en este paso durante más de una hora, para procesar el resto de las muestras.
3. Centrifugar un minuto a 13,000 rpm. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
4. Agregar 300 µl de isopropanol, mezclar con vórtex e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm. Secar en vacío.
6. Resuspender la pastilla en 100 µl de ddH₂O y agregar 1 de RNAsa. Mantener durante toda la noche a 4 °C o durante 1 hora a 37 °C.
7. Utilizar 2.5 µl para un volumen de reacción de 50 µl.

Digestión por enzimas de restricción de DNA genómico

1) Para cada extracción de DNA genómico, cuantificar su concentración y determinar el volumen necesario para alcanzar la cantidad de DNA genómico que se desea digerir.

- Volumen de DNA genómico (µl) = (DNA genómico, µg) / (Concentración de DNA genómico, µg/µl)

2) Determinar las unidades y el volumen de enzima necesario para digerir cada muestra de DNA genómico.

- Unidades de enzima (U) = (DNA genómico, µg) x 2.5

- Volumen de enzima (µl) = (unidades de enzima, U) / (Concentración de enzima, U/µl)

Para una reacción de un volumen final de 400 µl, digerir 5 µg de DNA genómico y utilizar 10 µl de espermidina (0.1 M). Agregar la cantidad necesaria del buffer de la enzima y adicionar la cantidad necesaria de ddH₂O para alcanzar un volumen final de 400 µl. Dejar la digestión durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, realizar la precipitación del DNA digerido de la siguiente manera:

- Parar la reacción adicionando NaCl 5M hasta alcanzar una concentración final de NaCl 0.25 M (20 µl para una reacción de un volumen final de 400 µl).
- Agregar 2.5 volúmenes de EtOH (1000, µl para una reacción de un volumen final de 400µl) mezclar bien y mantener a -80°C durante 30 minutos o a -20°C toda la noche. El DNA precipitado se puede mantener a -20°C por tiempo indefinido.
- Centrifugar en una microcentrífuga a máxima velocidad (~ 12,000 rpm) de 10 a 15 minutos.
- Eliminar sobrenadante y dejar que seque la pastilla formada durante toda la noche a temperatura ambiente, o en un desecador con vacío de 10 a 15 minutos a bajo vacío.

- Disolver la pastilla en 16 μ l de buffer TE durante 3 horas con vórtex a mínima velocidad.

Southern blot

Agregar 4 μ l de Buffer de carga a cada muestra digerida con enzimas de restricción y precipitada. Cargarlas en un gel de agarosa al 1%. Correr el gel a 50 mA por 4 horas aproximadamente. Sacar una fotografía. Colocar el gel en un recipiente "pirex" y desnaturalizarlo por 30 minutos con una solución NaOH 0.4 N y NaCl 0.6 M. Eliminar la solución desnaturalizante y neutralizar el gel durante 30 minutos con una solución 0.5 M Tris pH 7.5 NaCl 1.5 M. Transferir el DNA contenido en el gel a una membrana de nylon durante toda la noche con SSC 10X pH 7.4. Desmontar la transferencia y marcar con lápiz la cara de la membrana que estuvo en contacto con el gel. Fijar el DNA a la membrana con el aparato de *crosslinking* UV Stratalinker 2400 (Stratagene Corp. La Joya, Cal. E.U.A.) dos veces a 1200 μ Joules X 100. Prehibridar la membrana con 10 ml de buffer de hibridación durante 2 horas a 65°C. Eliminar el buffer de hibridación. Adicionar nuevamente 10 ml de buffer de hibridación y agregar la sonda marcada radioactivamente. Hibridar a 65°C toda la noche y posteriormente eliminar o guardar la sonda radioactiva. Lavar la membrana durante 1 minuto con SSC 2X a temperatura ambiente. Repetir el mismo lavado. Lavar durante 20 minutos a 65°C con una solución SSC 2X y con SDS al 10% (1 ml de SDS al 10% por cada 200 ml de SSC 2X). Si se detecta marca específica después de este lavado, poner la membrana en una bolsa de plástico y sellarla. Si existe marca inespecífica, repetir el lavado anterior. Si aún así la marca sigue siendo inespecífica, realizar un último lavado con la solución anterior diluida 1:10 en agua, durante 20 minutos a 65°C. Colocar la membrana en una bolsa de plástico y sellarla. Exponer la membrana a una placa fotográfica dentro de un cassette durante el tiempo que se considere necesario. Revelar y fijar la placa.

Marcado Radioactivo de Sonda de DNA

El marcado radioactivo de DNA se realiza con las soluciones del kit High Prime DNA labeling kit (Cat. No. 1585584, Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA). Tomar 8 μ l de DNA y desnaturalizarlo durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo. Inmediatamente pasarlo a hielo. Agregar 4 μ l de la mezcla High Prime Reaction 5X (que contiene la polimerasa Klenow, una mezcla de random primers y un buffer), 3 μ l de la mezcla de desoxiribonucleósidos trifosfatados (dATP, dGTP, dTTP) y 5 μ l de [α -³²P]dCTP 10 μ Ci/ μ l. Incubar a temperatura ambiente durante toda la noche o de una a dos horas a 37°C. Precipitar la sonda añadiendo 1.5 μ l de EDTA (Research Organics, Inc. Cleavelan, Ohio, U.S.A. Núm cat. 9572E) 0.5 M pH 8 o 2 μ l de EDTA 0.2 M pH 8. Además, agregar 0.75 μ l de DNA espermático de salmón 10 mg/ml, 30 μ l de acetato de amonio 3M y 100 μ l de EtOH al 100%. Centrifugar durante 10 minutos a ~14,000 rpm. Eliminar el sobrenadante con pipeta y resuspender la sonda en 100 μ l de Buffer TE. Hervir la sonda a 95°C

durante 5 minutos. Pasar inmediatamente la sonda a hielo y agregarla completamente al tubo de hibridación que contiene la membrana y 10 ml de buffer de hibridación.

Extracción de RNA total con Trizol

Este protocolo utiliza el producto "TRI REAGENT" (Molecular Research Center, Inc., E.U.A. Núm cat. TR118) y fue modificado a partir del manual contenido en él.

Trabajar en condiciones de manipulación de RNA (usar guantes, H₂O estéril y libre de RNAsas, tubos estériles, puntas con filtro estériles y de uso exclusivo para RNA)

1. Homogenización

Colocar la muestra (50-100 mg de tejido, nunca más del 10% del volumen usado de TRI REAGENT para homogenizar la muestra) en un tubo estéril. Congelar con nitrógeno líquido. Repetir lo mismo para todas las muestras. Agregar nitrógeno líquido directamente a la muestra, empujar la muestra al fondo del tubo, esperar a que se evapore el nitrógeno líquido y con una varilla de vidrio (previamente limpiada con EtOH al 96%) moler la muestra hasta que se forme un polvo fino homogéneo. No dejar que se hidrate (en este caso, agregar más nitrógeno líquido). Agregar 1 ml de TRI REAGENT a la muestra. Homogenizar con la pipeta. Repetir lo mismo para todas las muestras.

2. Separación de Fase

Mantener la muestra homogenizada por 5 minutos a temperatura ambiente (eventualmente puede mantenerse mayor tiempo). Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRI REAGENT. Tapar las muestras y agitar con fuerza por 15 segundos. Mantener la mezcla a temperatura ambiente de 2 a 15 minutos (10 minutos son adecuados). Centrifugar a máxima velocidad (12,000 g) por 15 minutos a 4°C (puede hacerse a temperatura ambiente). Después de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa incolora superior. El RNA permanece en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas se encuentran en la interfase y en la fase orgánica. El volumen de la fase acuosa es alrededor del 60% del volumen de TRI REAGENT usado para la homogenización.

3. Precipitación de RNA

Transferir la fase acuosa (alrededor de 600 µl) a un nuevo tubo. Guardar la fase orgánica y la interfase a 4°C para un posterior aislamiento de DNA y de proteínas. Agregar 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRI REAGENT usado para la homogenización. Esto se hace para precipitar el RNA de la fase acuosa. Mantener las muestras a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos (7 minutos son adecuados). Centrifugar a máxima velocidad (12,000 g) por 8 minutos de 4 °C a 25 °C. El RNA precipitado forma un pellet blanco.

4. Lavado de RNA

Remover el sobrenadante (directamente sobre un frasco o vaso de desechos y eliminando sobre un papel absorbente). Agregar 1 ml de EtOH 75% por cada ml de TRI REAGENT usado para

la homogenización y mezclar con vortex. Centrifugar a -9000 rpm (7,500 g) por 5 minutos de 4°C a 25°C.

5. Solubilización de RNA

Eliminar el EtOH (directamente sobre un frasco o vaso de desechos y eliminando sobre un papel absorbente) y dejar que se seque el pellet de RNA de 3 a 5 minutos. No dejar que se seque completamente. Disolver el RNA en 30 µl de agua o de SDS 0.5% tratadas con DEPC, pipeteando. Incubar de 10 a 15 minutos a 55°C - 60°C. Guardar a - 80°C.

Síntesis y amplificación de cDNA

Este protocolo utiliza el producto "3' RACE SYSTEM FOR RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS" (Life Technologies, Inc., E.U.A. Núm cat. 18373019) y fue modificado a partir del manual contenido en él.

Trabajar en condiciones de manipulación de RNA (usar guantes, H₂O estéril y libre de RNAsas, tubos estériles, puntas con filtro estériles y de uso exclusivo para RNA)

1. Síntesis de la primera cadena de cDNA

Descongelar los componentes del kit para la reacción y poner en hielo. (RNA, AP, 10X PCR Buffer, MgCl₂, dNTP mix, DTT). Mezclarlos y darles un spin antes de usar. Agregar un volumen de muestra correspondiente a 1µg o hasta 5µg de RNA total, o 50 ng de mRNA en un tubo eppendorff estéril de 0.5 ml y llevarlo a un volumen final de 11 µl con agua tratada con DEPC. Añadir 1 µl de la solución de Adapter Primer (AP) 10 µM. Mezclar y dar un spin. Calentar la muestra a 70°C durante 10 minutos y poner inmediatamente en hielo por lo menos durante 1 minuto. Dar un spin.

Agregar a cada muestra:

PCR Buffer 10X	2µl
MgCl ₂ 25 mM	2µl
DNTO mix	1µl
0.1M DTT	2µl

Mezclar, dar un spin. Incubar a 42°C de 2 a 5 minutos. Añadir 1 µl de la enzima SUPERScript II RT. Incubar a 42°C durante 50 minutos. Incubar a 70°C durante 15 minutos para terminar la reacción. Poner inmediatamente en hielo. Dar un spin. Agregar 1 µl de RNasa H. Mezclar e incubar a 37°C durante 20 minutos. Guardar la muestra de cDNA a -20°C hasta realizar el PCR.

2. Amplificación del fragmento específico (target) de cDNA

A un tubo nuevo de 0.5 ml agregar:

Buffer PCR 10X		5µl
MgCl ₂ 25 mM	3µl	
H ₂ O destilada y estéril	36.5µl	
dNTP mix 10 mM	1µl	

Gen Specific Primer (10 μ M)	1 μ l
Gen Specific Primer (10 μ M)	1 μ l
Taq DNA polimerasa	1 μ l

Agregar 2 μ l de la síntesis de cDNA. Mezclar y dar un spin. Hacer PCR con las siguientes condiciones:

94°C	3'	} 35 X
94°C	1'	
55°C	1'	
72°C	2'30"	
72°C	5'	
4°C	∞	

Northern blot (Geles de RNA con formaldehído)

Tomar 3.6 μ l de mRNA (la misma cantidad en μ g de mRNA para cada muestra). Agregar 0.6 μ l de MOPS (Sigma Chemical Co. St Louis Missouri, E.U.A. Núm. cat. M8899) 10X, 6.0 μ l de formamida desionizada y 1.8 μ l de formaldehído 37%. Calentar a 65°C por 2 minutos y después adicionar 1.2 μ l de colorante para RNA y 1 μ l de Bromuro de etidio al 10% en H₂O. En el caso de RNA total, tomar para cada muestra la misma cantidad en μ g (1 μ g-5 μ g) de RNA. Agregar a cada muestra la cantidad de H₂O necesaria para alcanzar la misma cantidad final en μ l en todas las muestras. Calcular los volúmenes de MOPS, formamida y formaldehído a partir de esa cantidad, guardando la proporción indicada anteriormente. Correr las muestras en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5 X a 40 o a 60 V. Sacar una foto. Marcar las bandas ribosomales con tinta India. Lavar el gel con SSC 10 X durante 10 minutos con agitación. Lavar el gel con SSC 20 X durante 20 minutos con agitación. Transferir toda la noche en en 20X SSC. Enjuagar la membrana en 2X SSC brevemente. Realizar crosslinking con UV. Secar durante 30 minutos en un horno a 65°C. Guardar en seco (dentro de una bolsa) a -20°C hasta que se use. Continuar con la prehibridación y la hibridación según el protocolo "Southern blot".

Lavado y esterilización de semillas

- 1) Colocar las semillas en un tubo eppendorf y agregar 1 ml de agua estéril. Dejar embebiendo durante 10 minutos con agitación ocasional.
- 2) Eliminar el agua, agregar EtOH al 70% y dejar agitar ocasionalmente durante cinco minutos.
- 3) Eliminar el EtOH, agregar solución para lavado (Cloro 5%, SDS 1%) y agitar ocasionalmente de 15 a 20 minutos.
- 4) Lavar al menos en cinco ocasiones con ddH₂O.
- 5) Eliminar perfectamente el ddH₂O y añadir 1 ml de T.C. Agar (Carolina Biological Supply Company. Burlington, North Carolina, E.U.A.) al 0.1% estéril. Guardar a 4°C durante 2 días antes de sembrar.

Medios de Cultivo para *Arabidopsis thaliana*

Para 1 litro:

- 1) Pesar las sales MS
- 2) Disolver en 800 ml de H₂O
- 3) Pesar la sacarosa y agregarla a la solución anterior
- 4) Pesar 0.5g de MES y agregarlo a la solución anterior
- 5) Agregar 100 µl de vitaminas MS a la solución anterior
- 6) Ajustar el pH a 5.7 con KOH
- 7) Aforar a un litro
- 8) Dividir la solución en dos matraces de un litro cada uno
- 9) Agregar 4 gramos de agar a cada matraz (no mezclarlo)
- 10) Esterilizar en autoclave
- 11) Dejar que se enfríe hasta unos 50°C y vaciar en cajas de petri

Nota: Para preparar un litro de medio de cultivo la cantidad de MES (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, E.U.A. Núm cat. ;3023), de vitaminas MS (Tiamina 1mg/ml, Piridoxina 5mg/ml y Nicotinamida 5mg/ml) y de agar (Research Organics, Inc. Cleavelan, Ohio, U.S.A. Núm cat. 10020) es la misma, independientemente de la concentración de sales MS o de sacarosa (Research Organics, Inc. Cleavelan, Ohio, U.S.A. Núm cat. 9640S).

Para un litro:

	MS 0.2X con 2% de sacarosa	MS 0.5X sin sacarosa	MS 0.5X con 0.5% de sacarosa	MS 1X sin sacarosa	MS 1X sacarosa	MS 2X sacarosa
Sales MS	0.88 g	2.2 g	2.2 g	4.4 g	4.4 g	4.4 g
Sacarosa	20 g	-	5 g	-	10 g	45 g
MES	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Vitaminas MS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Agar	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g

Soluciones

SSC 20X pH 7.4 (1 litro)

NaCl 175.2 g

Citrato de Sodio 88.25 g

Acido clorhídrico concentrado 3.6 ml

Buffer de hibridación

0.3 volúmenes de Buffer de fosfatos 1M ph 7.2

0.7 volúmenes de SDS al 10%

1/500 volúmenes de EDTA 0.5 M

Buffer de fosfatos

0.684 volúmenes de Na₂HPO₄ 1M (para 1 litro agregar 92 g)

0.316 volúmenes de NaH_2PO_4 1M (para 1 litro agregar 90 g)

Ajustar con NaOH a pH 6.5

Esterilizar en autoclave

Buffer TE

100 mM Tris (pH 7.4)

1mM EDTA (pH 8.0)

MOPS 10X

1 litro

MOPS 0.2 M

41.8 g

Acetato de sodio 0.05 M

6.8 g

EDTA 0.01 M

20 ml de EDTA 0.5 M

Ajustar pH a 7.0, filtrar, esterilizar o autoclavar. La solución puede hacerse amarillenta, pero se puede seguir usando

RNA dye (colorante)

1 ml

50% glicerol

500 μl

0.1% de azul de bromofenol

1 mg

dH_2O

499 μl

ANEXO B. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

EN205 5' - AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA - 3'
EN8130 5' - GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC - 3'
EOMF1 5' - GGT CTA ACC ATA AGA GAA ATG - 3'
EOMR2 5' - TTT GAA GTG TCG AGT CTC AG - 3'
OEAB145 5' - CAG TAG AAA GAT ATC AAA AGC GAA TAC AAG ATC TCG GGT - 3'
OEAB147 5' - GGA GGA AAC TTT TTG AAG TGT CGA GTC TCA GGA GGT - 3'

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

1. Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. y Yanofsky, M.F. (2000a). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant Journal*. 24:4. 457-466.
2. Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.L., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Ribas de Pouplana, L., Martínez-Castilla, L. y Yanofsky, M.F. (2000b). An ancestral MADS-box genes duplication occurred prior to the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5328-5333.
3. Ambrose, B A., Lerner, D. R. Ciceri, P., Padilla, C. M., Yanofsky, M. F. y Schmidt, R. J. (2000) Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Mol. Cell*. 5, 569-579.
4. Baskin, T.I. (2000) On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Mol. Biol.* 43, 545-554.
4. Baskin, T.I., Cork, A., Williamson, R.E. y Gorst, J.R. (1995) STUNTED PLANT 1, a gene required for expansion in rapidly elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. *Plant Physiol.* 113, 493-502.
5. Beemster, G T.S. y Baskin, T.I. (1998) Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116, 1515-1526.
6. Benfey, P. N. y Scheres, B. (2000) Root development. *Curr. Biol.* 12, 22: R813-R815
7. Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T. y Aeschbacher, R.A. (1993) Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*. 119:57-70.
8. Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R. y Weigel, D. (1998) Gibberelins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LFY* promoter. *Plant Cell*. 10, 791-800.
9. Bauman, E., Lewald, J., Saedler, H., Schulz, B. y Wisman, E. (1998). Successful PCR-based reverse genetic screens using an En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theor. Appl. Genet.* 97, 729-734.
10. Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. y Smyth, D.R. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*. 119, 721-743.

11. Burgeff, C., Liljegren, S. J., Tapia-López, R., Yanofsky, M. F. y Alvarez-Buylla, E. R. (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. 214, 365-372.
12. Cardon, G., Frey, M., Saedler H. y Gierl A. (1993) Mobility of the maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 3, 773-784.
13. Coen, E. S. y Meyerowitz, E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. 353, 31-37.
14. Cronk, Q. C. B. (2001) Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nat. Rev. Gen.* 2, 607-619.
15. Decroocq, V., Zhu, X., Kauffman, M., Kyoizuka, J., Peacock, W.J., Dennis, E.S. y Llewellyn, D.J. (1999). A *TM3*-like MADS-box gene from *Eucalyptus* expressed in both vegetative and reproductive tissues. *Gene*. 228, 155-160.
16. Dolan, L. (1999). Root development in *Arabidopsis*. En Russo, V. E. A., Cove, D. J., Edgar, L. G., Jaenisch, R. y Salamini, F. (eds.) *Development. Genetics, epigenetics and environmental regulation*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
17. Dolan, L. y Okada, K. (1999) Signalling in cell type specification. *Sem. Cell & Dev. Biol.* 10, 149-156
18. Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., y Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119, 71-84.
19. Dubrovsky, J. G., Contreras-Burciaga y Ivanov, V. B. (1998) Cell cycle duration in the root meristem of sonoran desert cactaceae as estimated by cell-flow and rate-of-cell-production methods. *Annals of Botany*. 81, 619-624.
20. Dubrovsky, J. G., Doerner, P. W., Colón-Carmona, A. y Rost, T. L. (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 124, 1648-1657.
21. Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:6, 1349.
22. Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. y Yanofsky, M.F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*. 127:725-734.

23. Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F. y Martienssen, R. (1998). The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. 125:1509-1517.
24. Helariutta, T., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T. y Benfey, P. N. (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*. 101, 555-567
25. Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Res.* 27:1, 297-300.
26. Hoisington, D., Khairallah, M. y González-de-Léon, D. (1994) *Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. CIMMYT. 2da ed. México.
27. Howell, S.H. (1998) *Molecular Genetics of Plant Development*. Cambridge University Press, U.S.A. 365 pp.
28. Ivanov, V. B. y Dubrovsky, J.G. (1997). Estimation of the cell-cycle duration in the root meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *Int. J. Plant Sci.* 158:757-763.
29. Jack, T. (2001) Plant development going MADS. *Plant Mol. Biol.* 46: 515-520.
30. Jones, A. M. (1998) Auxin transport:down and out and up again. *Science*. 282, 2201-2203.
31. Lee, H., Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.A., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M. y Lee, I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes and Dev.* 14:2366-2376.
32. Leyser, O. y Fitter, A. (1998) Roots are branching out in patches. *Trends in Plant Sci.* 3:6. 203-204.
33. Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L. y Yanofsky, M.F. (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*. 404:766-770.
34. Lomax, T. I., Muday, G. K. y Rubery, P. H. (1995). *Auxin transport*. En: Davies, P. J. (ed.). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. 509-529. Kluwer Academic Publishers, Holanda.
35. Meyerowitz, E. M. (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*. 56, 263-269.

36. Meyerowitz, E. M. (1994) Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. 21-36. *En: Meyerowitz, E.M. y Somerville, C.R. (eds.). Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, E. U. A.
37. Michaels, S.D. y Amasino, R.M. (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*. 11, 949-956.
38. Mizukami, Y. (2001) A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Curr. Op. Plant Biol.* 4, 533-539.
39. Muday, G. K. y DeLong, A. (2001) Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Sci.* 6:11, 535-541.
40. Ng, M. y Yanofsky, M. F. (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Rev. Gen.* 2:186-195.
41. Onouchi, H., Igeño, M.I., Périlleux, C., Graves, K. y Coupland, G. (2000) Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell*. 12, 885-900.
42. Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. y Yanofsky, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*. 405:200-203.
43. Potter, C. J. y Xu, T. Mechanisms of size control. *Curr. Op. Gen. Dev.* 11, 279-286.
44. Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schmidt, R.J. y Yanofsky, M.F. (1995). Molecular evolution of flower development: Diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics*. 140:345-356.
45. Raff, R.A. (1996) *The Shape of Life: Genes, Development and the Evolution of Animal Form*. Chicago: University of Chicago Press.
46. Raven, J. A. y Edwards, D. (2001) Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Exp. Bot.* 52, 381-401.
47. Riechmann, J.L. y Meyerowitz, E.M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378, 1079-1101.
48. Rounsley, S.D., Ditta, G.S. y Yanofsky, M.F. (1995). Diverse roles for MADS-box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*. 7:1259-1269.

49. Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. y Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*. 99:463-472.
50. Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. y Coupland, G. (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*. 288:1613-1616.
51. Scheres, B. (1999). Introduction. *Sem. Cell & Dev. Biol.* 10, 117-119.
52. Scheres, B. (2001) Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol.* 125, 112-114.
53. Scheres, B. y Benfey, P.N. (1999) Asymmetric cell division in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:505-537.
54. Scheres, B. y Berleth, T. (1998) Root development: new meanings for root canals? *Curr. Op. Plant Biol.* 1, 32-36.
55. Scheres, B., Di Lorenzo, L., Willemsen, V., Hauser, M. T., Janmaat, K., Weisbeek, P. y Benfey, P. (1994a) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the radial axis. *Development*. 121, 53-62.
56. Scheres, B. y Heidstra, R. (1999) Digging out roots: pattern formation, cell division, and morphogenesis in plants. *Curr. Topics Dev. Biol.* 45, 207-245.
57. Scheres, B., McKhann, H., van den Berg, C., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G. y Weisbeek, P. (1996) Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*. 187:97-105.
58. Scheres, B. y Wolkenfelt, H. (1998) The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36 (1-2), 21-32.
59. Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C. y Weisbeek, P. (1994b). Embryonic origin of the *Arabidopsis* root and root meristem initials. *Development*. 120, 2475-2487.
60. Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. y Sommer, H. (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*. 250:931-936.
61. Shinozuka, Y., Kojima, S., Shomura, A., Ichimura, H., Yano, M., Yamamoto, K. y Sasaki, T. (1999) Isolation and characterization of RICE MADS box gene homologues and their RFLP mapping. *DNA Res.* 6, 123-129.

62. Smyth, D. (2000) A reverse trend – MADS functions revealed. *Trends. Plant. Sci.* 5, 315-317.
63. Tautz, D. y Schmid, K. J. (1998) From genes to individuals: developmental genes and the generation of the phenotype. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, 231-240.
64. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408, 796-815.
65. Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Munster, T., Winter, K.U. y Saedler, H. (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant. Molec. Biol.* 42:115-149.
66. Theissen, G., Kim, J.T. y Saedler, H. (1996) Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defines roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43:484-516.
67. Theissen, G. y Saedler, H. (2001) Floral quartets. *Nature*. 409, 469-471.
68. van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. y Scheres, B. (1995). Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature*. 378:62-65.
69. van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. y Scheres, B. (1997). Short range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*. 390:287-289.
70. Vergara-Silva, F., Martínez-Castilla, L., y Alvarez-Buylla, E. R. (2000) MADS-box genes: development and evolution of plant body plans. *J. Phycol.* 36, 803-812.
71. Vergara-Silva, F. y Alvarez-Buylla, E. R. (2001) *Descubrimiento de los genes homeóticos en la era molecular y la construcción de una biología evolutiva del desarrollo*. 84-113. En: Rudomin, P. y Blazquez-Graf, N. (coord.). *Ciencias de la vida*. 1era ed. Siglo XXI editores, México.
72. Walden, A.R., Wang, D.Y., Walter, C. y Gardner, R.C. (1998) A large family of TM3 MADS-box cDNAs in *Pinus radiata* includes two members with deletions of the conserved K domain. *Plant Science*. 138:167-176.
73. Wang, R.L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L. y Doebley, J. (1998) The limits of selection during maize domestication. *Nature*. 398, 236-239.
74. Webster, P.L. y MacLeod, R.D. (1996) The root apical meristem and its margins. Págs. 51-76. en Waisel, Y., Eshel, A. y Kafkafi, U., (eds.) *Plant roots: the hidden half*. 2da ed. Marcel Dekker, New York.

75. Wisman, E., Cardon, G. H., Fransz, P. y Saedler, H. (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* 37, 989-999.
76. Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. y E. Meyerowitz. (1998) *Principles of development*. Current Biology / Oxford University Press. Reino Unido. 484 pp.
77. Wysocka-Diller, J.W. y Benfey. P.N. (1997). Root development: signaling down and around. *Bioessays*. 19:11. 959-965.
78. Zhang, H y Forde, B.G. (1998) An *Arabidopsis* MADS-box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*. 279:407-409.
79. Zhang, H y Forde, B.G. (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51:342. 51-59.
80. Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W. y Forde, B.G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:6529-6534.
81. Zhu, L. y Skoultchi, A. I. (2001) Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr. Op. Gen. Dev.* 10, 91-97.