

156



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis funcional preliminar de AGL19, un gen MADS-box específico de la raíz de Arabidopsis thaliana (L.) Heynh

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
AMANDA OCHOA ESPINOSA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN 2002



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Análisis funcional preliminar de AGL19, un gen MADS-box
específico de la raíz de Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.
realizado por Amanda Ochoa Espinosa

con número de cuenta 9650417-6, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces *María Elena Álvarez-Buylla Roces*

Propietario Dr. Joseph G. Dubrovsky Jankovsky *Joseph G. Dubrovsky Jankovsky*

Propietario Dra. Alicia Gamboa de Buen *Alicia Gamboa de Buen*

Suplente Dra. Caroline Nicole Laura Burgeff D'Hondt *Caroline Nicole Laura Burgeff D'Hondt*

Suplente M. en C. Aurora Zlotnik Espinosa *Aurora Zlotnik*

**FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.**

Consejo Departamental de Biología

Eberto Novelo Maldonado

Dr. Eberto Novelo Maldonado



**DEPARTAMENTO
DE BIOLÓGIA**

Índice

Introducción	1
-Desarrollo, Genética y Evolución.	1
-Desarrollo en plantas.	3
- <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.	4
-La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo para estudiar el desarrollo en plantas.	4
-Genes MADS box de plantas.	8
Antecedentes	13
Objetivos	14
Hipótesis	15
Metodología experimental	16
-Construcciones de secuencias regulatorias potenciales de <i>AGL19</i> fusionadas con el gen de la β - glucoronidasa de <i>E. coli</i> (<i>GUS</i>).	16
-Caracterización molecular del mutante <i>w19.1-3</i> .	18
-Caracterización fenotípica del mutante <i>w19.1-3</i> .	21
Resultados	26
-Construcciones de secuencias regulatorias potenciales de <i>AGL19</i> fusionadas con el gen reportero <i>GUS</i> .	26
-Caracterización molecular del mutante <i>w19.1-3</i> .	27
-Caracterización fenotípica del mutante <i>w19.1-3</i> .	29
Discusión y Conclusiones	40
Perspectivas	52
Anexo de protocolos, plásmidos y oligos	53
Referencias	65
Agradecimientos	69

Introducción

Desarrollo, Genética y Evolución.

La evolución de los mecanismos de desarrollo de plantas y animales parece haber tenido un papel determinante en la evolución de la diversidad morfológica de estos organismos. En cada nueva generación, los organismos más complejos se originan a través de procesos de desarrollo a partir de una sola célula fertilizada, de tal forma que en los organismos multicelulares la evolución de la forma resulta de la evolución de los procesos de desarrollo (Theissen *et al.*, 2001). Los análisis de genética del desarrollo han revelado que los genes reguladores del desarrollo se comparten entre distintos fila (Raff, 2000), por lo que su caracterización es central en el estudio de las bases moleculares de la diversidad morfológica (Carrol, 2000). Las vías de desarrollo se componen de módulos individuales dispuestos en un sistema semijerárquico (Doebley y Lurkens, 1998). Cada módulo está compuesto por señales, transductores, reguladores de la transcripción y genes blanco. Las señales pueden ser ambientales o internas y se dan a lo largo del desarrollo activando las distintas redes de interacción o módulos, que a lo largo del proceso de desarrollo se observan como tipos celulares, tejidos, órganos y sistemas de órganos (Doebley y Lurkens, 1998).

Se ha descubierto que muchos de los genes reguladores del desarrollo pertenecen a familias multigénicas que codifican para factores de transcripción (Theissen *et al.*, 2000). Los estudios filogenéticos de los genes reguladores del desarrollo permiten asociar cambios en los planes corporales de los organismos con la divergencia de secuencias de estos genes (Purugganan, 1998).

Debido a que el espectro de acción de los genes reguladores de la transcripción se reduce a módulos particulares, estos genes serían susceptibles a modificaciones evolutivas que alteren diferentes módulos de desarrollo sin interrumpirlo

(Doebley y Lurkens, 1998). Los cambios en los patrones de expresión de estos reguladores de la transcripción, los cambios en la función de las proteínas que codifican y la evolución de las secuencias regulatorias de sus genes blanco parecen ser responsables de los cambios que han dirigido la evolución morfológica (Levine, 2002; Doebley y Lurkens, 1998; Purugganan, 1998; Hofer y Ellis, 2002).

Para entender las interacciones moleculares que subyacen los mecanismos de desarrollo, es necesario realizar estudios funcionales detallados de los genes que intervienen en el desarrollo en sistemas experimentales. Los estudios de genética del desarrollo se han realizado desde dos aproximaciones. Desde la aproximación clásica se obtiene primero un mutante y a través de las alteraciones producidas por la mutación se deduce la función del gen. Después se ubica el locus afectado y se caracteriza molecularmente (Smyth, 2000). Por otro lado la aproximación de la genética inversa, que ha tomando ventaja de los diversos proyectos de secuenciación en varios organismos modelo, identifica una secuencia similar a genes que ya han sido caracterizados, para después obtener y caracterizar funcionalmente un mutante específico para tal secuencia (Smyth, 2000; Burgeff, 2001). En *Arabidopsis*, las fuentes de mutantes para estudios por genética inversa son poblaciones mutageneizadas por inserciones de T-DNA o transposones, los mutantes de interés pueden ser identificadas por la presencia de la secuencia de insertada, y la caracterización molecular de tales inserciones dentro de un gen son un paso previo a la caracterización funcional del gen a través del mutante (Anderson y Wilson, 2000). La genética inversa, en su primera etapa, también abarca el estudio de los patrones de expresión del gen a estudiar, así como sus relaciones filogenéticas, evidencias que servirán de guía en los análisis funcionales (Burgeff, 2001).

Desarrollo en plantas.

A diferencia de los animales, que tienen un mecanismo lineal de desarrollo, las plantas se caracterizan por tener un mecanismo iterativo de desarrollo (Cronk, 2001). El desarrollo continúa a lo largo de toda la vida de la planta debido a la iteración repetitiva, a veces indeterminada, de módulos; los órganos que añaden módulos a la planta son los meristemos (Cronk, 2001). Los meristemos son estructuras autorenovables que albergan células proliferativas indiferenciadas que al dividirse dan origen a los distintos tejidos y órganos (Scheres y Heidstra, 1999). En contraste con los animales, las plantas son sésiles; la plasticidad del desarrollo vegetal permite a la planta modificar su relación con el ambiente a través del crecimiento (Raven et al., 1999).

En plantas, después de la fecundación, el cigoto se divide y produce el embrión. Durante la embriogénesis se establece un eje ápico-basal primario y un eje radial secundario (Scheres y Heidstra, 1999). El eje ápico-basal está conformado por los cotiledones, el meristemo apical de tallo, el hipocótilo, la radícula y el meristemo apical de raíz. Mientras que el eje radial se conforma, del centro hacia afuera, por el procambiun, el meristemo fundamental y la protodermis. El embrión detiene la proliferación celular y entra en reposo hasta la germinación. Durante la germinación comienza el desarrollo postembrionario y se reactivan las divisiones celulares en los meristemos apicales de tallo y raíz (Scheres y Heidstra, 1999). La reactivación de los meristemos extiende los patrones de tejidos establecidos en el embrión (Scheres y Heidstra, 1999).

Las células vegetales poseen paredes celulares que las mantienen en el mismo sitio en relación con las demás células, de forma que no hay migración celular ni de tejidos (Cronk, 2001). Debido a estas limitaciones, el control de las divisiones celulares y su orientación, así como el control de la expansión celular, dirigen la morfogénesis en las plantas (Howell, 1998).

Arabidopsis thaliana como planta modelo

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh es una planta pequeña de la familia de las mostazas (Brassicaceae) ampliamente utilizada en el estudio de diversos aspectos de la biología de plantas, en particular los de la genética y biología molecular. Varias características biológicas y experimentales han hecho de esta planta un organismo modelo para el estudio de plantas. Su tamaño permite cultivarla en espacios reducidos en tierra o en medios de cultivo particulares, se propaga fácilmente, ya que produce cientos a miles de semillas y posee un tiempo relativamente corto de generación de alrededor de 6 semanas. *Arabidopsis* tiene una flor perfecta y tiende a autofertilizarse, lo que permite obtener líneas mutantes y transgénicas homocigas, aunque también es sencillo realizar cruza entre distintas líneas. *Arabidopsis* es una planta diploide, su genoma es pequeño, consiste de alrededor de 125 megabases de las cuales 115.4 han sido secuenciadas y se organiza en cinco cromosomas para los cuales existen mapas genéticos y físicos. *Arabidopsis* es susceptible a transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, cuyos plásmidos pueden ser recombinados con DNA externo que puede ser integrado al genoma de la planta (Meyerowitz, 1989, Raven et al., 1999, The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

En *Arabidopsis* se han identificado varios genes que controlan diversos procesos del desarrollo.

La raíz de Arabidopsis thaliana como sistema modelo para estudiar el desarrollo en plantas.

Los mecanismos moleculares que subyacen el desarrollo en las plantas son complejos, para entenderlos es necesario el estudio un organismo modelo que permita el uso de estrategias experimentales óptimas (Scheres y Wolkenfelt, 1998). La raíz de

Arabidopsis es utilizada como un modelo para el estudio de desarrollo por varias razones.

La facilidad con la que se realizan escrutinios de plántulas mutageneizadas para fenotipos de raíz, ha permitido identificar varios genes involucrados en diversos aspectos del desarrollo de este órgano. Los mutantes identificados pueden ser colocados en clases morfológicas definidas debido a la sencilla organización anatómica de la raíz de *Arabidopsis* (Dolan., 1999). La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* hace posible la caracterización molecular de los genes definidos por las mutaciones identificadas. El tamaño pequeño y la transparencia de la raíz de *Arabidopsis* han facilitado el uso de técnicas microquirúrgicas que no pueden aplicarse en otros órganos de la planta (Dolan, 1999).

En el embrión en desarrollo de *Arabidopsis* se suceden divisiones celulares estereotípicas que permiten evaluar la contribución de células embrionarias a cada primordio de órgano. La conformación característica del meristemo apical de raíz puede reconocerse desde el estadio de corazón de la embriogénesis. La secuencia de divisiones durante la embriogénesis es invariable por lo que el origen de las células en determinado momento del desarrollo es conocido (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

En la organización celular de la raíz primaria de *Arabidopsis* pueden reconocerse dos ejes, uno longitudinal y uno radial. En el eje longitudinal de la región apical se aprecian tres zonas de desarrollo que se traslapan. El meristemo o zona proliferativa, que consiste de células que se dividen activamente y se localiza en el ápice la raíz. Detrás del meristemo, se encuentra la zona de elongación donde las células se expanden longitudinalmente alcanzando la madurez en la zona de diferenciación donde las células no incrementan más su longitud (Dolan, *et al.* 1993, Dolan en Russo *et al.*, 1999) (figura 1). La organización en el eje radial de la parte madura de la raíz es sencilla, ya que consiste de capas unicelulares de tejidos concéntricos con características

morfológicas particulares. La epidermis es la capa más externa de la raíz, en esta capa celular se alternan filas de tricoblastos y atricoblastos, cuyo destino celular está determinado por información posicional. Después se encuentran las capas de córtex y endodermis, ambas conformadas por ocho filas de células, que a su vez circunscriben al cilindro central en el que una capa de periciclo rodea a un sistema vascular diarco. A la altura del meristemo una capa más de células, la cofia lateral, engloba a la raíz (Scheres y Wolkenfelt, 1998) (figura 1).

Todos los tejidos de la raíz se originan en el meristemo apical de raíz, que añade de forma regular nuevas células a la zona madura de la raíz, las filas resultantes siguen y extienden el patrón previamente formado por las células maduras y establecido desde la embriogénesis. Las células más apicales de estas filas, las células iniciales, actúan como células madre. Las células iniciales producen células hijas apicales que permanecerán como células madre, y células hijas basales que se diferenciarán durante su desplazamiento por el meristemo. La relación espacial de las células dentro de una fila refleja su edad, las células más jóvenes se encuentran cerca del ápice de la raíz mientras que las células más viejas son las más basales, de tal forma que todos los estadios de desarrollo celular están presentes en toda raíz todo el tiempo (Benfey y Scheres, 2000). La secuencia de divisiones en las células iniciales y sus células hijas es esencialmente invariante por lo que las células meristemáticas contribuyen de forma fija a los distintos tejidos (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

Las células iniciales que dan origen a los tejidos de la raíz se sitúan alrededor de un grupo de cuatro células que se dividen de forma poco frecuente, denominadas células del centro quiescente (CQ). Sobre las cuatro células del centro quiescente se encuentran las células iniciales de los tejidos del cilindro central. A nivel del (CQ) y rodeándolo se encuentra un anillo de células iniciales de córtex y endodermis. Bajo el centro quiescente se encuentran las células iniciales de columela, y rodeándolas, se encuentra

un anillo de las iniciales de epidermis y cofia lateral (Scheres y Wolkenfelt, 1998; Dolan, *et al.* 1993) (figura1). Experimentos de ablación celular han permitido postular que el Centro Quiescente podría inhibir directamente, mediante señales de corto alcance de naturaleza desconocida, la diferenciación de todas las iniciales que lo rodean al estar en contacto con ellas, manteniendo su estatus de células madre. Por otro lado existen señales que promueven la diferenciación desde los tejidos maduros de la raíz (Scheres y Hiedstra, 1999).

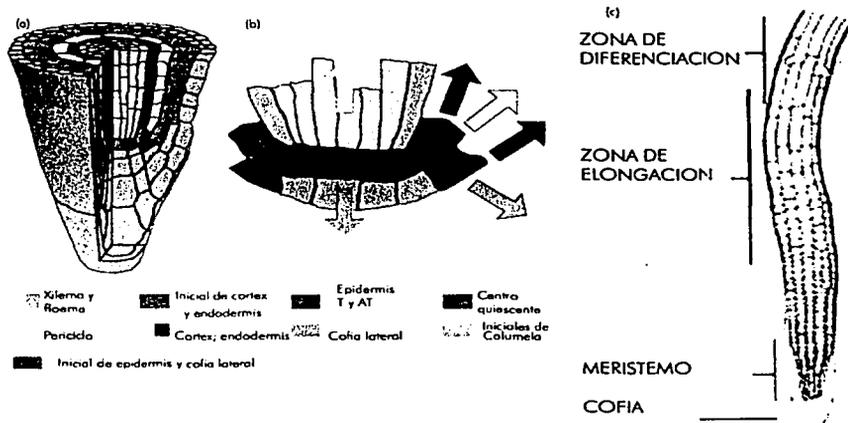


Figura1. Organización de la raíz de *Arabidopsis* (a) Esquema en el que se aprecia la organización longitudinal y transversal del meristemo de la raíz (b). Esquema de las células iniciales que dan origen a los distintos tejidos de la raíz. (c) Organización en el eje longitudinal de la raíz. T, tricoblastos, AT, atricoblastos. (a y b tomados de Benfey y Scheres, 2000).

A pesar de que la sencillez celular de la raíz de *Arabidopsis* ha permitido entender algunos mecanismos celulares que subyacen su desarrollo, aún se sabe muy poco de las bases moleculares del mismo.

Genes MADS-box de plantas

Los genes de la familia MADS-box codifican para factores de transcripción que se encuentran en plantas, animales y hongos, y están involucrados en diversos procesos biológicos (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b). Los genes de esta familia se definen por la presencia de una secuencia conservada de 180 pb denominada caja MADS, que codifica para un dominio de unión a DNA (Theissen *et al.*, 1996). El nombre MADS es un acrónimo de los primeros miembros descritos de la familia: la proteína Minichromosome Maintenance 1 de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína AGAMOUS de *Arabidopsis thaliana* y DEFICIENS de *Antirrhinum majus*, y la proteína humana SERUM RESPONSE FACTOR (Theissen *et al.*, 1996; Jack, 2001).

Existen dos tipos de genes MADS-box en plantas, animales y hongos que se distinguen por diferencias en la secuencia que codifica para el dominio MADS (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000b). El Tipo I se caracteriza por tener una secuencia de unión a DNA similar a la del tipo SRF de animales, mientras que el Tipo II comprende a los genes MADS cuya secuencia de unión a DNA es similar a la de las proteínas tipo MEF2 de animales (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000b). Al parecer la duplicación que dio origen a estos dos linajes ocurrió antes de la divergencia de animales y hongos de las plantas (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000b).

La mayoría de los genes MADS-box de plantas identificados y caracterizados pertenecen al linaje Tipo II (Vergara-Silva, *et al.* 2000; Ng y Yanofsky, 2001). Las proteínas codificadas por los genes MADS-box de plantas tipo II poseen una estructura modular tipo MIKC (figura 2) que del extremo amino terminal al carboxilo terminal es la siguiente: el dominio MADS altamente conservado de alrededor de 60 aminoácidos y que permite a la proteína unirse al DNA, un dominio I intermedio seguido por un dominio K moderadamente conservado de alrededor de 70 aminoácidos y presente solo en

plantas, que junto con la región I parece estar involucrado en interacciones proteína-proteína, y por último el carboxilo terminal poco conservado que parece ser un dominio de transactivación (Theissen *et al.*, 2001a; Vergara-Silva *et al.*, 2000; Jack, 2001).

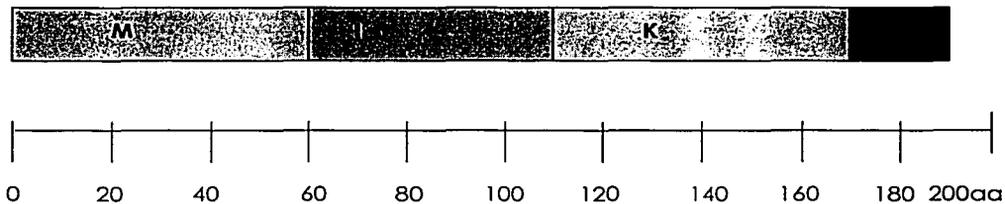


Figura 2. Dominios de las proteínas MADS de plantas.

Las proteínas MADS-box ejercen su función como factores de transcripción al unirse a una secuencia consenso en los promotores de sus genes blanco conocida como caja CarG (5'-CC(AT)₈GG-3') (Theissen *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* y *Antirrhinum* las proteínas MADS-box se unen a la caja CarG como homodímeros y heterodímeros (Jack, 2001; Theissen, 2001b), evidencias adicionales sugieren que las proteínas MADS-box que intervienen en el desarrollo floral se asocian en complejos ternarios o cuaternarios, y que estos complejos determinan la especificidad funcional de estos genes (Honma y Goto, 2001). Como parte de la caracterización funcional de los genes MADS-box que intervienen en el desarrollo se han caracterizado sus promotores y en algunos casos sus intrones, de forma que se han identificado diversos elementos y regiones que determinan sus patrones de expresión espacial y temporal (Sieburth y Meyerowitz, 1997; Hill, *et al.* 1998; Tilly, *et al.* 1998; Bomblies, *et al.* 1999; Busch, *et al.* 1999; Honma y Goto, 2000).

Los primeros genes MADS-box caracterizados en plantas especifican la identidad de los órganos florales en *Arabidopsis* y *Antirrhinum*. Estudios genéticos y moleculares de estos genes permitieron generar un modelo en el que la acción combinatoria de tres clases de genes especifica los cuatro verticilos florales y se conoce como modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991; Vergara-Silva *et al.*, 2000). Todos los genes interactores en este modelo son genes MADS-box menos uno. Los genes del modelo ABC pueden considerarse homeóticos debido a que sus fenotipos mutantes producen órganos florales en posiciones normalmente ocupadas por otros órganos (Coen y Meyerowitz 1991). Recientemente se ha demostrado que los genes de las clases B y C requieren de la acción de tres genes altamente relacionados y funcionalmente redundantes para determinar la formación de pétalos, estambres y carpelos, estos son los genes *SEPALLATA 1/2/3*. (Pelaz *et al.*, 2000). Evidencias moleculares y genéticas apoyan la conservación del modelo ABC en eudicotiledonias y monocotiledonias (Ambrose *et al.*, 2000), así como su evolución antes de la divergencia entre gimnospermas y angiospermas (Theissen *et al.*, 2000).

Existen más de 80 genes de la familia MADS-box en *Arabidopsis* (Jack, 2001). Análisis funcionales de ganancia y pérdida de función de algunos de estos genes han revelado que los genes de esta familia están involucrados en diversos aspectos del desarrollo de plantas (Vergara-Silva, *et al.* 2000). Miembros de esta familia génica han demostrado ser importantes en la determinación y tiempo de formación de los meristemos de flor e inflorescencia (Lee *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2000), en la arquitectura del meristemos de inflorescencia (Bowman *et al.*, 1993; Ferrandiz *et al.*, 2000) y en el tiempo de floración (Michaels y Amassino, 1999), así como en la especificación de tipos celulares (Gu *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 2000), y en la elongación de raíces laterales en respuesta a nitrato NO₃-(Zhang y Forde, 1998).

Los primeros estudios filogenéticos de los genes MADS-box de plantas revelaron que se agrupan en clados monofiléticos, cuyos miembros tienen patrones de expresión similares (Theissen, et al. 1996). Por otro lado la disponibilidad de secuencias de genes MADS-box de *Arabidopsis* permitió generar una filogenia de estos genes a partir de un muestreo más amplio; el mapeo de los patrones de expresión de mRNA de estos genes sobre la filogenia demuestra que tanto los genes expresados en estructuras reproductivas como los expresados en estructuras vegetativas se agrupan en clados monofiléticos (figura 3) (Álvarez-Buylla, et al. 2000a). Estos resultados sugieren que, dada la importancia demostrada por los genes MADS-box en el desarrollo de estructuras reproductivas, los genes MADS-box podrían regular el desarrollo de estructuras vegetativas (Álvarez-Buylla, et al. 2000a). A partir de la filogenia de los genes MADS-box de *Arabidopsis*, se postula que estos genes en un principio pudieron haber tenido un patrón de expresión generalizado, y que duplicaciones posteriores resultaron en genes que fueron reclutados para dirigir aspectos específicos del desarrollo reproductivo y vegetativo en plantas (Álvarez-Buylla, et al. 2000a). Estos análisis filogenéticos también revelaron nuevos grupos de secuencias altamente relacionadas, con una identidad de más del 70% en la secuencia de aminoácidos de la región MIK, que sugieren que estos genes son redundantes funcionalmente; esta información será de gran utilidad en la caracterización funcional de tales genes, ya que es posible que solo las mutantes múltiples presenten un fenotipo analizable (Álvarez-Buylla, et al. 2000a).

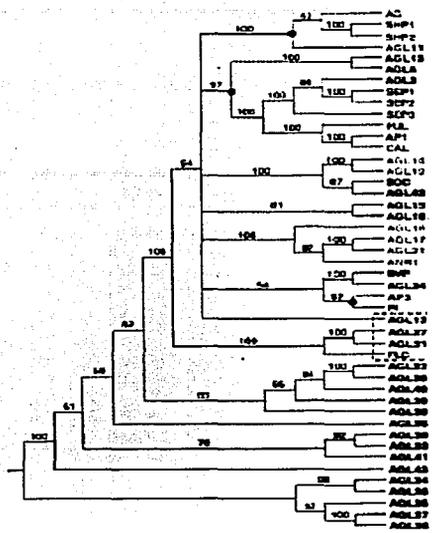


Figura 3. Filogenia de la familia de genes MADS-box de *Arabidopsis* basada en la alineación de los aminoácidos de la región MIK. Los distintos colores indican el sitio de expresión del mRNA de cada proteína, reproductivo= rojo, vegetativo= verde, o ambos= azul. En las proteínas dentro de la caja K se predijo un dominio K con coiled-coils. Los clados A, B y C se señalan con puntos rojos en sus nodos.

Se sabe muy poco de la función de genes MADS-box expresados en estructuras vegetativas de *Arabidopsis*, sin embargo la caracterización funcional de los genes MADS-box de plantas permite hipotetizar que el patrón de expresión de mRNA de estos genes es un indicativo del sitio donde ejercen su función (Burgeff, et al. 2002). Varios genes MADS-box se expresan casi exclusivamente en raíz sugiriendo que estos genes podrían estar involucrados en la morfogénesis de este órgano (Vergara-Silva, et al. 2000).

Antecedentes

Diversos esfuerzos por identificar nuevos genes MADS-box en *Arabidopsis thaliana*, han llevado al descubrimiento de genes de esta familia expresados en distintos tejidos. El cDNA de *AGAMOUS LIKE 19*, *AGL19* (número de acceso en GenBank AF312664) fue clonado a partir de tejido de la raíz de *Arabidopsis* con oligos degenerados del gen MADS-box de jitomate *TM8* (Álvarez-Buylla, et al. 2000b). *AGL19* mapea en el cromosoma 4 de *Arabidopsis* entre los marcadores g10086 y g4564a (Álvarez-Buylla, et al. 2000b). Análisis de Northern blot revelaron que este gen se expresa exclusivamente en tejido de la raíz de *Arabidopsis* (Álvarez-Buylla, et al. 2000b). Los datos preliminares de la expresión del mRNA de este gen en la raíz dirigieron análisis adicionales enfocados a determinar su patrón de expresión *in situ* de mRNA. La hibridación *in situ* de *AGL19* reveló que éste se expresa en la columela, en la cofia lateral y la epidermis de la zona meristemática. En la región diferenciada de la raíz el mRNA de *AGL19* se encuentra en todos los tipos celulares del cilindro central, desde el periciclo a los tejidos internos de los haces vasculares (Álvarez-Buylla et al., 2000b) (figura 4).

Estudios filogenéticos de la región MIK de genes MADS-box en *Arabidopsis* revelan que *AGL19* se agrupa en un clado monofilético cuyos miembros se expresan mayormente en la raíz, se trata del clado de *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS (SOC1)* (figura 3) (Álvarez-Buylla, et al. 2000b). Los miembros de este clado son, *SOC1* que se expresa en raíz, hojas y flores, *AGL19* y *AGL14* que se expresan exclusivamente en raíz, y *AGL42* expresado exclusivamente en las células del Centro Quiescente (Nawy, T com. pers). Gracias al término de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* se han identificado otros dos miembros de este clado, *AGL71* y *AGL72*, cuyos patrones de expresión de mRNA no han sido reportados (Martínez-Castilla, com.

pers.). AGL19 y AGL14 comparten más del 70% de aminoácidos en la región MIK, lo que sugiere que estos genes pueden ser funcionalmente (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000b).

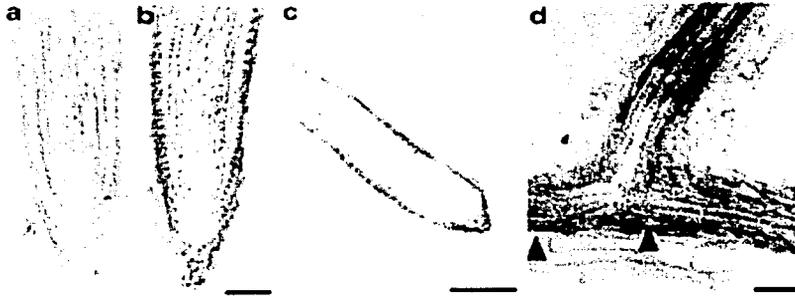


Figura 4. Expresión de AGL19 en raíces silvestres. (a) Corte longitudinal del meristemo de raíz hibridado con la sonda de RNA sentido de AGL19. (b) meristemo de raíz lateral y (c) meristemo de raíz primaria hibridados con la sonda de RNA antisentido de AGL19. (d) Zona diferenciada de la raíz hibridada con la sonda antisentido de RNA de AGL19, la flecha de la izquierda señala una célula de endodermis sin tinción (tomado de Álvarez-Buylla, *et al.* 2000a).

El patrón de expresión *in situ* de mRNA de AGL19 y la importancia demostrada por los genes MADS-box en el desarrollo de diversas estructuras en *Arabidopsis* permiten proponer que este gen podría estar involucrado en la regulación del desarrollo de la raíz y en particular de los tejidos donde se expresa (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000b). De esta forma, y dentro del marco de la caracterización funcional por genética inversa de AGL19, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general 1. Corroborar el patrón de expresión *in situ* de mRNA reportado para AGL19 (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000b) a través de la elaboración de construcciones de secuencias regulatorias potenciales de AGL19 fusionadas al gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) de *E. coli*.

Objetivo general 2. Caracterizar molecularmente al mutante w19.1-3, generada mediante la inserción del transposón *En1*. Para este objetivo se pretende corroborar por PCR e hibridación tipo Southern la presencia y estabilidad de la inserción, así como el

efecto de la mutación en la expresión transcripcional del gen a través de análisis de retrotranscripción y PCR.

Objetivo general 3. Caracterizar fenotípicamente al mutante *w19.1-3*, a través de experimentos de cinética de crecimiento y la determinación de distintos parámetros celulares.

Hipótesis

La construcción del promotor completo de *AGL19* recuperará el patrón de expresión reportado para *AGL19*. En caso negativo, las secuencias contenidas en el primer intrón contendrán sitios de regulación importantes para dirigir la expresión espacio-temporal de este gen.

AGL19 está implicado en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*, por lo tanto la raíz de la mutante *w19.1-3* se desarrollará de manera anormal con respecto a la raíz del tipo silvestre. Además, se espera que el efecto de este mutante sea aparente en las características celulares de columela, cofia lateral y epidermis en la zona meristemática.

Metodología experimental

Construcciones de secuencias regulatorias potenciales de AGL19 fusionadas con el gen de la β -glucoronidasa de *E. coli* (GUS).

A partir de la secuencia genómica de AGL19 elegimos cuatro fragmentos a fusionar con el gen reportero GUS:

1. 175 pares de bases 5' del ATG
2. 175 pb 5' del ATG + 2002 pb 3' del ATG
3. 2699 PB 5' DEL ATG
4. 2699 PB 5' DEL ATG + 2002 pb 3' del ATG

El fragmento 1 fue planeado como un minipromotor, es decir, un fragmento con el aparato básico de transcripción del gen. El fragmento 2 posee el minipromotor, así como el primer exón, el primer intrón y 28 pb del segundo exón, estas últimas para mantener la región de edición del mRNA y conservar el marco de lectura con el gen reportero. El fragmento 3 abarca 2699 pb 5' del ATG, esta región abarcaría todo el promotor del gen y se trata de la región intergénica hasta el siguiente gen. El fragmento 4 abarca 2699 pb 5' del ATG así como el primer exón, el primer intrón y 28 pb del segundo exón, estas últimas para mantener la región de edición y conservar el marco de lectura con el gen reportero (Figura 5).

Se diseñaron cuatro oligos para amplificar por PCR cada uno de los fragmentos propuestos, los oligos al extremo 5' de cada fragmento fueron diseñados con el sitio de restricción *Pst*I, y los oligos al extremo 3' con un sitio *Nco*I. Los sitios de restricción descritos no se encuentran en los fragmentos a amplificar, de forma que fueron utilizados para la clonación direccional de los fragmentos en distintos plásmidos. Los oligos son los siguientes:

AO1F 5' GGC TGCAGT AAA GAA GAA GGT TCA CGA C 3'

AO2R 5' CTA CCC ATG GCC TTT ACT TCT AGT TTA TTC 3'

AO4F 5' GGC TGC AGT GGT CAC TTT TGT AGT TGG AG 3'

AO9R 5' CAT GCC ATG GGA TAG CGT TCA ATT GTT G 3'

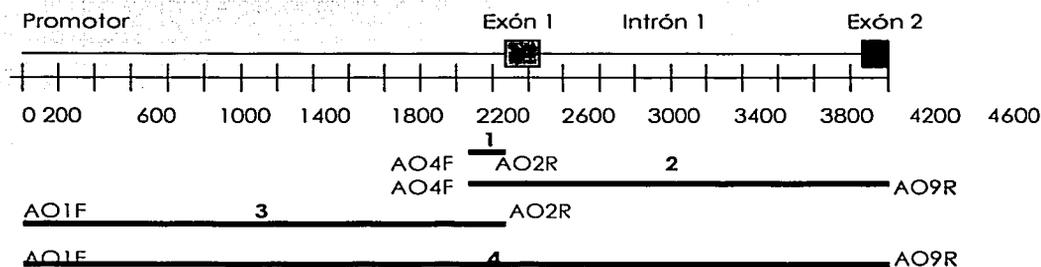


Figura 5. Ubicación en el gen *AGL19* de los fragmentos propuestos para las construcciones así como los oligos para amplificarlos. 1 Minipromotor, AO4F-AO2R. 2 Minipromotor+Exón1+Intrón1, AO4F-AO9R. 3 Promotor, AO1F-AO2R. 4 Promotor+Exón1+Intrón1, AO1F-AO9R.

Los distintos fragmentos fueron amplificados por PCR a partir de un templado de DNA genómico de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col) y clonados en el vector para productos de PCR pGEM T o pGEM Teasy (Promega). tres clonas positivas para cada construcción fueron secuenciadas. Se compararon las secuencias de las clonas con la secuencia reportada para *AGL19*, en el GenBank. Se eligió una clona positiva y sin errores en la secuencia clonada, para cada construcción. Se extrajeron los fragmentos clonados con las enzimas *Pst*I y *Nco*I, cada fragmento fue ligado entre los sitios *Pst*I y *Nco*I del plásmido pRITA que lleva al gen reportero GUS (anexo de protocolos, plásmidos y oligos). Cada fragmento fusionado a GUS fue subclonado en el sitio único *Not*I del plásmido binario pART27 para su transformación, primero en *Agrobacterium* y luego en plantas silvestres (Col) (anexo de protocolos, plásmidos y oligos).

La generación T1 de cada construcción se seleccionó en placas de medio Murashige & Skoog (MS, Sigma M5519, M5524) con kanamicina. Las plantas transformantes fueron trasplantadas a tierra. En la T2 se hizo una tinción de GUS para determinar el patrón de expresión de las construcciones (anexo de protocolos, plásmidos y oligos).

Caracterización molecular del mutante w19 1-3.

El alelo mutante w19.1-3 (Col) proviene del banco de semillas del Center for Functional Genomics in *Arabidopsis* del Max Planck Institute for Plant Breeding Research de Colonia, Alemania. El alelo mutante w19.1-3 tiene insertado el transposón *En1* proveniente de maíz (Baumann, *et al.* 1998) en el sitio 1466 de la secuencia genómica de *AGL19* (Figura 6). La búsqueda y ubicación de la inserción en este mutante fue realizada en por E. Alvarez-Buylla en colaboración con S. Pelaz y G.S. Ditta del laboratorio de M. F. Yanofsky (University of California, San Diego) Ellos llevaron a este mutante a la generación homociga. El genotipo homocigo identificado por ellos en un Southern blot presenta en todos los individuos una banda exclusiva del genotipo silvestre. El análisis realizado en este trabajo se realizó en líneas homocigas, y se corroboró, por Southern blot, el genotipo mutante previamente determinado, utilizando la misma restricción y sonda.

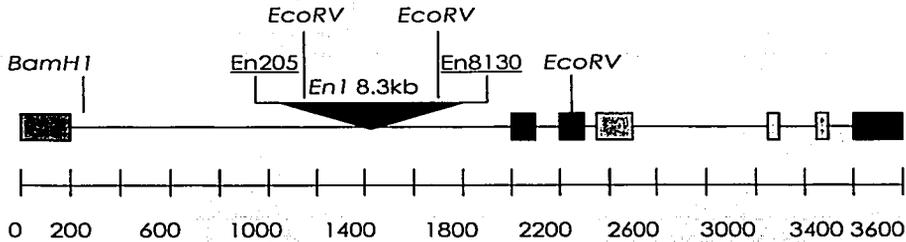


Figura 6. La inserción en el mutante *wagl19 1-3* se encuentra en la posición 1466 del DNA genómico, en el intrón 1. Las secuencias que flanquean la inserción son AAT GAT ACT CTA AAG GT 5' *En1* 3' TTA GCT TAT TAA TTT. En esta figura se muestra también la posición aproximada de los oligos (subrayados) para amplificar la inserción, En205 y En8130, así como la restricción utilizada para el experimento de Southern blot.

Análisis por PCR de la presencia y dirección del transposón *En1* en la línea mutante *w19. 1-3*.

1-3.

Se crecieron en tierra 22 semillas de plantas de la línea *w19. 1-3* y dos semillas de plantas silvestres (Col). Se extrajo DNA genómico de hojas de roseta (anexo de protocolos, plásmidos y oligos) y se realizaron dos PCR sobre el DNA con los oligos FA1F-En205 y oEAB171-En8130 que se alinean, respectivamente, en los extremos 5' y 3' de la inserción.

Análisis por Southern blot del genotipo de la línea *w19. 1-3*

Se extrajo DNA genómico adicional de 11 plantas positivas para la inserción en el análisis por PCR, y una planta silvestre. Se digirieron 5µg de DNA de cada individuo con las enzimas *EcoRV* y *BamHI* (figura 6). El DNA digerido fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y transferido a una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham). El templado para la síntesis de la sonda fue un producto de PCR sintetizado con los oligos OEAB160 y OEAB162, que abarca la región de la inserción. La sonda fue sintetizada y marcada radiactivamente con [α^{32} P] α CTP con el kit High Prime

DNA Labeling , de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Boehringer Mannheim Cat No. 1585584). Se prehibridó, hibridó y lavó la membrana, para realizar la autoradiografía durante 7 días a -80°C (anexo de protocolos, plásmidos y oligos). Se recuperaron las semillas producidas por cada planta analizada.

Se eligió la línea w19.1-3(11) para continuar con la caracterización molecular y fenotípica.

Análisis de expresión transcripcional de AGL19 en la raíz del mutante w19.1-3 (11).

Semillas de la línea w19.1-3(11) y de la línea silvestre fueron esterilizadas y vernalizadas durante 2 días a 4°C. Después de la vernalización las semillas fueron sembradas asépticamente en placas con medio MS 0.2X con 2 % sacarosa (anexo de protocolos, plásmidos y oligos). Las placas se orientaron verticalmente en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad a 20 °C). Se extrajo RNA total con Trizol de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Gibco BRL) de una raíz silvestre y una mutante crecidas durante 20 días. La síntesis de la primera cadena de cDNA se hizo con la reverso transcriptasa SuperSript de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Gibco BRL Cat. No. 18053-017) a partir de 200ng de RNA total de la raíz de un individuo silvestre y 200 ng de RNA total de la raíz de un individuo mutante w19.1-3 (11). La amplificación del cDNA de AGL19 se realizó con los oligos específicos para este gen después de la caja MADS oEAB158 y oEAB171. Como control de carga se amplificó a partir de las mismas muestras de cDNA el gen de la poliubiquitina (UBQ10), con los oligos UBIF y UBIR (Yu y Li, 2001) (anexo de protocolos, plásmidos y oligos).

Caracterización fenotípica del mutante w19.1-3 (11)

Cinética de crecimiento

Como parte de una caracterización preliminar de la línea mutante se realizaron experimentos de cinética de crecimiento en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales MS y sacarosa. Los medios utilizados fueron los siguientes:

MS 0.5X sin sacarosa

MS 1X sin sacarosa

MS 0.5X con 0.5 % de sacarosa

MS 1X con 1% de sacarosa

MS 1X con 4.5 % de sacarosa

(anexo de protocolos, plásmidos y oligos)

Alrededor de 20 semillas de la línea w19.1-3(11) y 20 silvestres fueron esterilizadas y vernalizadas durante dos días y posteriormente fueron sembradas en condiciones estériles en cada medio de cultivo (día 0), las placas de crecimiento se mantuvieron verticales en una cámara con luz continua a 22°C. Se marcó sobre la caja de petri una línea sobre el punto de crecimiento máximo cada raíz cada 24 horas durante 14 días a partir del día 3 (un día después de la germinación). Posteriormente se midió sobre la caja de petri la longitud alcanzada por cada raíz en cada día de medición, con un vernier electrónico (Mitutoyo Corp. Japón). Únicamente los datos de plantas que germinaron el día 2, fueron procesados en el programa SigmaPlot 4.1. Se obtuvieron 5 curvas de crecimiento, en las que se graficaron los promedios alcanzados por ambas líneas durante los 14 días del experimento y los límites de confianza del 95%.

Un experimento adicional de cinética de crecimiento se realizó en un medio pobre en sales, MS 0.2X con 2 % sacarosa; para este experimento se sembraron en condiciones de asepsia 30 semillas de la línea mutante y 30 de la línea silvestre (día 0).

Las cajas se orientaron verticalmente y se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad a 20°C). Se marcó sobre la caja de petri una línea sobre el punto de crecimiento máximo cada raíz a partir del día de la germinación (día 2) y durante 8 días más cada 24 horas. Con un vernier electrónico se midieron las marcas del crecimiento diario de cada raíz. Los datos de crecimiento de 21 plantas silvestres y 12 plantas mutantes (únicamente las plantas que germinaron el día 2) fueron procesados en el programa SigmaPlot 4.1 para obtener una curva de crecimiento, en la que se graficaron los promedios alcanzados por ambas líneas durante los diez días del experimento y los límites de confianza del 95%.

Medición y cálculo de parámetros celulares en la línea silvestre y línea w19. 1-3 (11).

La estimación de los distintos parámetros celulares analizados en este trabajo se realizó bajo el método de Tasa de Producción Celular (RCP) (Ivanov y Dubrovsky, 1997). Este modelo asocia la tasa de crecimiento de la raíz, la tasa de producción celular y la duración del ciclo celular. Con este método es posible estimar la duración del ciclo celular contando el número de células meristemáticas, calculando la tasa de crecimiento y midiendo la longitud de las células completamente elongadas (Ivanov y Dubrovsky, 1997). El modelo se basa en los siguientes supuestos:

- La duración del ciclo celular es la misma en todas las células meristemáticas.
- Todas las células meristemáticas proliferan.
- El número de células meristemáticas es constante para cada tejido.
- El flujo de células hacia dentro y hacia fuera de la zona de elongación es el mismo.
- No hay deslizamiento entre distintas filas celulares.

Se esterilizaron y vernalizaron durante dos días 40 semillas de la línea mutante y 40 semillas de la línea silvestre, y fueron sembradas (día 0) en 4 cajas de petri con medio MS

0.2X con 2 % sacarosa. Las cajas se orientaron verticalmente y se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad a 20 °C). Cabe señalar que este experimento se realizó en paralelo con el de cinética de crecimiento en este medio, los individuos de ambos experimentos fueron tratados de igual manera y crecieron en las mismas condiciones. En el día 4, 104 horas después de sembrar, se aclararon 10 individuos de cada línea y estos dos grupos constituyen al grupo control. En el día 4 (96 horas después de sembrar) se marcó sobre la caja de petri una línea sobre el punto de crecimiento máximo de la raíz, 24 horas después se hizo una segunda marca de la misma manera, e inmediatamente después comenzó el proceso de aclaramiento de las raíces mutantes y silvestres cuya longitud era la más común dentro de cada línea (anexo de protocolos, plásmidos y oligos). Con un vernier electrónico se midieron las marcas del crecimiento de cada raíz a las 96 horas y a las 120 horas, con los datos anteriores se calculó la tasa de crecimiento V ($\mu\text{m}/\text{h}$).

Se calcularon y midieron los parámetros celulares descritos a continuación en 9 plantas silvestres y 10 plantas mutantes aclaradas y montadas para su observación con un microscopio con óptica Nomarski (Olympus BX60). Este tipo de microscopía permite evaluar diversos parámetros celulares con una alteración mínima en los tejidos debida a la manipulación experimental.

- Longitud de la zona meristemática (μm), Lm. Se midió la longitud a partir de la pared anticlinal más apical de la primera célula de córtex, adyacente a la célula inicial de córtex y endodermis, hasta la pared anticlinal más apical de la primera célula de córtex cuya longitud excediera el doble de la longitud de una célula meristemática de córtex recién dividida.
- Número de células meristemáticas, Nm. Se contó el número de células meristemáticas de córtex comprendidas dentro la longitud de la zona meristemática. Debido a que el crecimiento de la raíz en esta etapa del

desarrollo no es estacionario, el número de células meristemáticas se estimó para cada individuo calculando el promedio del número de células meristemáticas de córtex en los grupos control, y haciendo un nuevo promedio del número de células meristemáticas obtenidas para cada individuo con el promedio control de la línea correspondiente.

- Longitud promedio de una célula meristemática (μm), $L_{mc} = L_m/N_m$.
- Longitud de la zona de elongación (μm), L_e . Se midió la distancia a partir de la pared anticlinal más apical de la primera célula de córtex cuya longitud excediera el doble de la longitud de una célula meristemática de córtex recién dividida, hasta la pared más apical de la célula de córtex por debajo de la primera célula de epidermis que presentara una protuberancia de pelo radicular.
- Número de células que conforman la zona de elongación, N_e . Se contó el número de células comprendidas dentro de la distancia determinada para la longitud de la zona de elongación.
- Longitud de la zona de crecimiento de la raíz (μm), L_{gpr} . $L_{gpr} = L_m + L_e$.
- Longitud promedio de las células completamente elongadas (μm), l_e . Sobre 2 filas de córtex a una distancia de dos veces L_{gpr} a partir del centro quiescente, se midió la longitud de una célula de córtex (célula 1). Posteriormente se midió la longitud de la célula basal de córtex adyacente a la célula 1, y así sucesivamente hasta completar 10 células en cada fila. El promedio de las mediciones de la longitud de las células completamente elongadas para cada raíz constituye al parámetro l_e .
- Duración del ciclo celular (h), $T = (N_m) (\ln 2) (l_e)/V$.
- Tasa de producción celular ($1/h$), $CPR = V/l_e$.

- Punto reconocible del protoxilema (μm), PRP. Esta distancia se mide desde el centro quiescente hasta el primer punto donde se observa el engrosamiento de la pared secundaria del protoxilema.
- Tiempo de diferenciación del protoxilema (h), $\text{TPD} = (2L_e/V) + (\text{PRP}-L_{gpr})/V$ (Dubrovsky *et al.*, 2000)
- Crecimiento celular en la zona de diferenciación (μm). Sobre las dos primeras filas de tricoblastos que presentaban protuberancias de pelos, se midió la longitud de la primera célula con protuberancia (célula 1). Posteriormente se midió la longitud de la célula basal de epidermis adyacente a la célula 1, y así sucesivamente hasta completar diez células para ambas filas de epidermis.

Los parámetros L_m , N_m , L_e , N_e y L_{gpr} , se midieron en cada una de las dos filas de córtex visibles en el plano medio de la raíz primaria, por lo que el valor reportado para cada parámetro es un promedio de los dos valores obtenidos para cada individuo en cada parámetro.

Todos los parámetros obtenidos fueron analizados estadísticamente con la prueba no-paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney (Zar, 1974), con el fin de identificar diferencias significativas entre los parámetros obtenidos para la línea silvestre y la línea mutante.

Resultados

Construcciones de secuencias regulatorias potenciales de AGL19 fusionadas con el gen reportero GUS.

En la tabla 1 se presentan los avances en el desarrollo de las distintas construcciones. Las distintas zonas regulatorias de AGL19 fueron amplificadas por PCR y dieron lugar a fragmentos de 175pb la zona 1, 2177pb la zona 2 y 2699pb la zona 3. La zona 4 de 4701pb no pudo ser amplificada después de diversos intentos en los que se modificaron las condiciones y oligos para el PCR. Se identificaron en el plásmido pGEMT/T easy, al menos tres clonas positivas para cada zona regulatoria (1, 2 y 3) por análisis de restricción. Después de secuenciar se eligió solo una clona para cada zona regulatoria que no presentara modificaciones en la secuencia debidas a la amplificación por PCR, la corroboración de las secuencias se realizó con respecto a la secuencia reportada en el GenBank. Cada fragmento corroborado por secuenciación se clonó en los vectores primero en el plásmido pRITA, y posteriormente en el plásmido pART27. La clonación de los fragmentos se corroboró por restricción con las enzimas *Pst*I y *Nco*I, cuyos sitios de restricción flanquean los fragmentos clonados. En los plásmidos pRITA y pART27 se corroboró también la fusión de cada fragmento (1, 2 y 3) a GUS, mediante la restricción con la enzima *Nof*I. Una vez en el vector pART27, se transformó *Agrobacterium* y luego se transformaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia. En ambos casos se seleccionó a los transformantes en presencia de kanamicina, el gen de resistencia a este antibiótico es un marcador del plásmido pART27 (anexo de protocolos, plásmidos y soluciones). A partir de la transformación de las 3 distintas construcciones en plantas se obtuvieron plantas transgénicas.

De la construcción 1, existen ya 5 líneas en T3. Se realizó un experimento preliminar de tinción con GUS (gen reportero de las distintas construcciones) en la

generación T2 y no se obtuvo ninguna expresión. Las construcciones 3 y 4 están en T1 y su patrón de expresión no ha sido probado.

Tabla 1. Avances en el desarrollo de las distintas construcciones de las zonas regulatorias de AGL19.

#Construcción y longitud (pb)	Amplificación por PCR	Clonación en pGEM1/pGEM1Easy	Clonación en pRITA	Clonación en pART27	Generación de transformantes (kana ^R)			Análisis de expresión de GUS
					T1	T2	T3	
1 175	X	X pAO1	X pAO4	X pAO7	X	X	X	No recupera
2 2177	X	X pAO2	X pAO5	X pAO8	X			
3 2699	X	X pAO3	X pAO6	X pAO9	X			
4 4701								

Caracterización molecular la mutante w19.1-3.

El análisis por PCR de la presencia del transposón *En1* en las 22 plantas w19.1-3 y en dos individuos silvestres demostró que todas las plantas mutantes probadas, presentan la inserción y los individuos silvestres no. En el caso de la amplificación con los oligos FA1F y En205 la banda esperada es de 1666 pb (figura 7a), en tanto que para la amplificación con los oligos oEAB171-En8130 se espera una banda de 2017pb (figura 7b). Con este análisis también se corroboró la dirección de inserción del transposón, que en este caso es 5'-3'. En algunos casos algunos individuos mutantes no amplificaron la banda esperada con un juego de oligos, sin embargo con el otro par de oligos sí amplificaron.

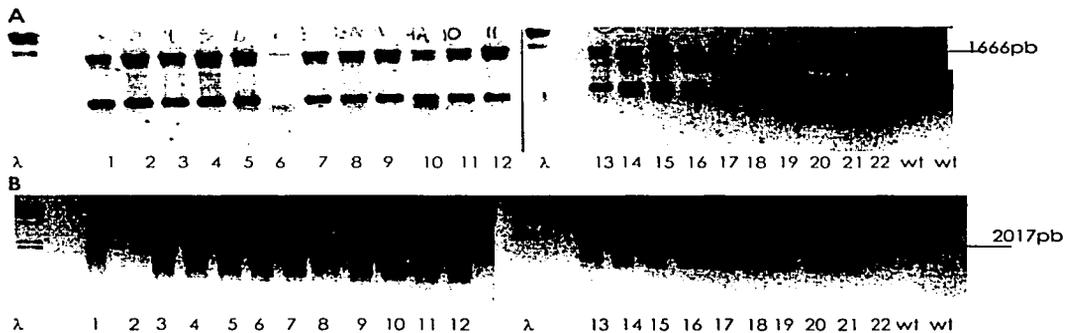


Figura 7. Análisis de la presencia del transposón *En1* en el mutante *w19.1-3* mediante amplificación por PCR. A. Amplificación con los oligos FA1F y En205, carriles 1 a 22 individuos 1-22 *wag119 1-3* y silvestres en los dos últimos carriles. B. Amplificación con los oligos oEAB171-En8130 carriles 1 a 22 individuos 1-22 *wag119 1-3* y silvestres en los dos últimos carriles.

Para el análisis por Southern blot se escogieron los individuos de la línea *w19.1-3*, 1 a 11 que fueron positivos en el análisis por PCR. El análisis demostró que todos los individuos mutantes presentan la banda exclusiva del genotipo silvestre de 1982 pb, así como las bandas exclusivas para el genotipo mutante de 3165pb y 1543 pb respectivamente (figura 8). El patrón de bandas obtenido, podría interpretarse como heterócigo, sin embargo las semillas utilizadas para este experimento eran homócigas (ver Material y Metodología), por lo que este patrón se interpretó como homócigo con un alto grado de reversión.

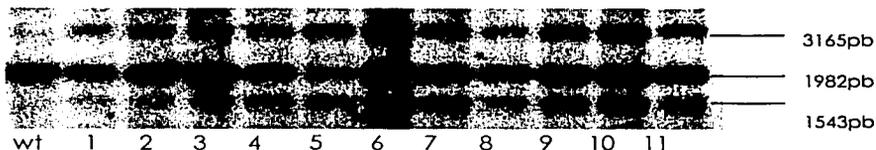


Figura 8. Southern blot de DNA genómico con las enzimas *EcoRV* y *BamHI* de individuos 1-11 *w19.1-3* y wt Col. La banda exclusiva para el genotipo silvestre corresponde a un peso de 1982 pb, las bandas exclusivas para el genotipo mutante tienen un peso de 3165pb y 1543 pb respectivamente.

El análisis por RT-PCR de la abundancia del transcrito del gen *AGL19* en la línea *w19.1-3(11)* que se muestra en la figura 9, demostró que la línea mutante no es nula a nivel de mensajero, sin embargo la amplificación del mensajero fue menos abundante que la producida en la línea silvestre.



Figura 9. Análisis de expresión transcricional en la línea *w19.1-3(11)*. En los carriles superiores se muestra la amplificación del cDNA de *AGL19* en la línea silvestre y la línea mutante, carriles 1 y 2 respectivamente. En los carriles inferiores se muestra la amplificación control de carga del cDNA de la *UBQ10*, carril 1 wt y carril 2 *w19.1-3*.

Caracterización fenotípica de el mutante *w19.1-3(11)*.

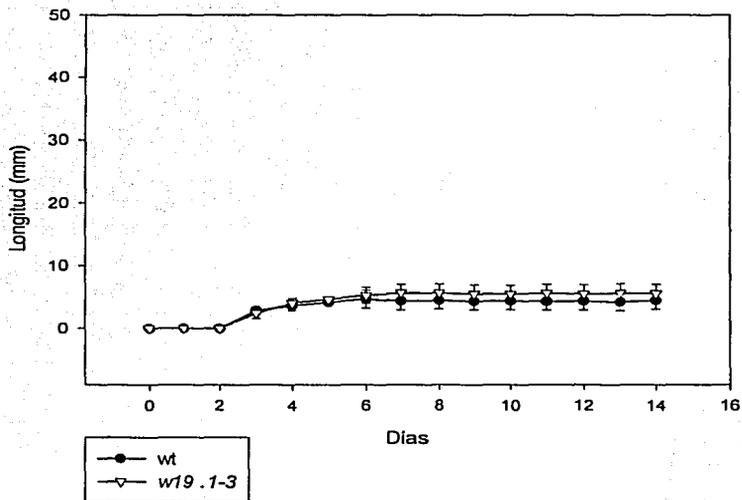
Cinética de crecimiento en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales MS y sacarosa en luz continua a 22 °C.

En las gráficas 1 a 5 se muestran las longitudes promedio alcanzadas por raíces silvestres y *w19.1-3* en medios con distintas concentraciones de sales MS y sacarosa. En este análisis se incluyeron únicamente a los individuos que germinaron en el día 2 del experimento. En el día 2 no se midió la longitud de las raíces por lo que en este día la longitud aparece como cero. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

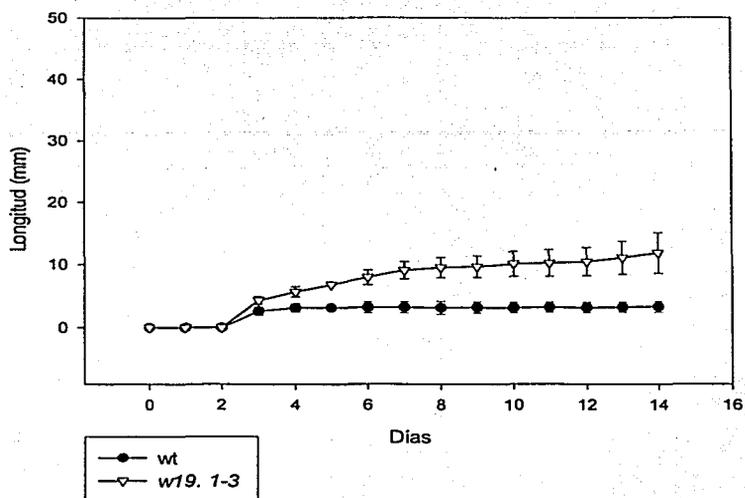
La dinámica de crecimiento en los medios sin sacarosa, MS 1X sin sacarosa y MS 0.5X sin sacarosa se muestra en las gráficas 1 y 2 respectivamente. En estos medios las raíces tienen un crecimiento reducido, en el caso del medio MS 1X sin sacarosa (gráfica 1) las raíces de ambos grupos alcanzan una longitud de alrededor de 5 mm en el día 4 y detienen su crecimiento. En el medio MS 0.5X sin sacarosa (gráfica 2), la línea silvestre tiene un comportamiento similar al que tiene en el medio MS completo sin sacarosa, es

decir, las raíces alcanzan una longitud de alrededor de 3mm en el día 4 y detienen su crecimiento. Por el contrario las raíces de la línea w19.1-3 continúan creciendo a una tasa baja y alcanzan al día 14 una longitud de 11mm, las diferencias en el crecimiento entre ambas líneas son significativas a partir del día 4.

Gráfica 1. Crecimiento en medio MS 1X sin sacarosa.

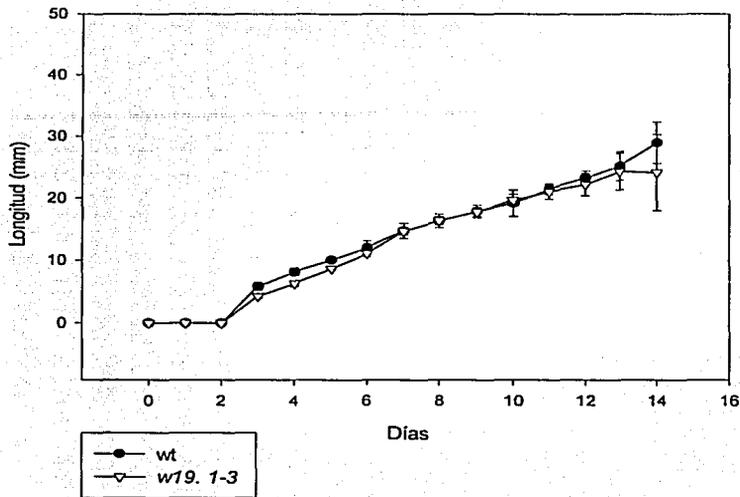


Gráfica 2. Crecimiento en medio MS0.5X sin sacarosa.

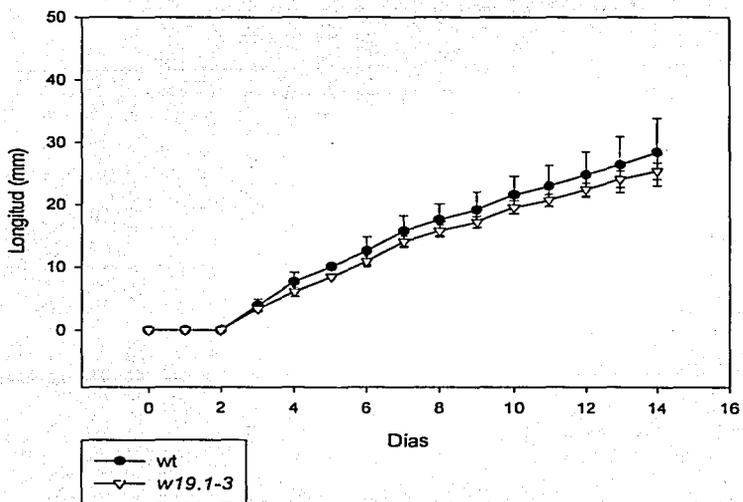


En los medios MS 0.5X con 0.5% de sacarosa, MS 1X con 1% de sacarosa y MS 1X con 4.5% de sacarosa que se muestran en las gráficas 3, 4 y 5 respectivamente, no se aprecian diferencias significativas en el crecimiento de las raíces de las líneas silvestre y w19.1-3. La tasa de crecimiento es similar en los medios MS 0.5X con 0.5% de sacarosa, MS 1X con 1% de sacarosa para ambas líneas, mientras que en el medio MS 1X con 4.5% de sacarosa la curva de crecimiento tiene una pendiente más marcada.

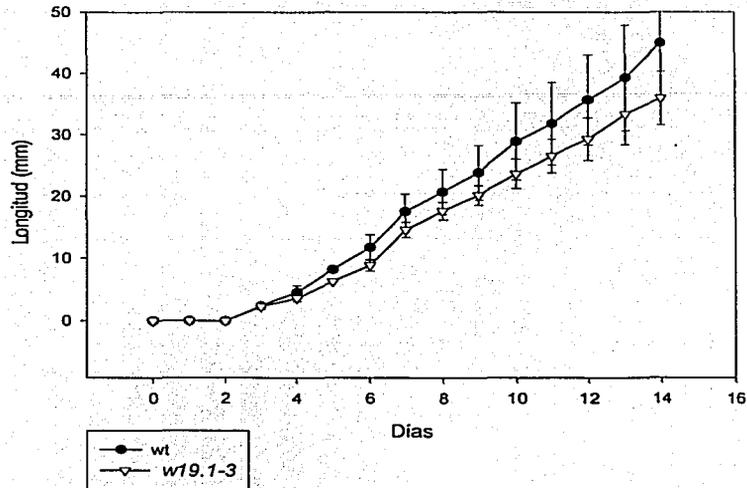
Gráfica 3. Crecimiento en medio MS0.5X con 0.5% de sacarosa.



Gráfica 4. Crecimiento en medio MS1X con 1% de sacarosa.

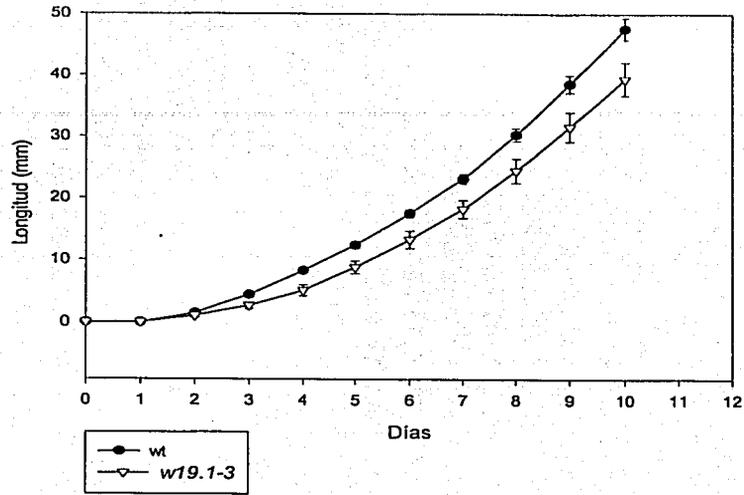


Gráfica 5. Crecimiento en medio MS 1X con 4.5% de sacarosa.



En la gráfica 6 se muestra el la longitud promedio alcanzada por cada grupo de raíces, silvestre y w19.1-3, durante 10 días en medio MS0.2X con 2% de sacarosa y fotoperíodo a 20°C. Las barras sobre cada punto representan un límite de confianza del 95%. Las líneas silvestre y mutante, germinaron el día 2 después de la siembra. Las raíces de la línea silvestre alcanzan una longitud significativamente mayor que las de la línea w19.1-3 a partir del día 3 del experimento y hasta el final de éste. En el día 10 del experimento las raíces silvestres tienen una longitud promedio de 47.5 mm mientras que la longitud promedio para la línea w19.1-3 es de 39.4 mm.

Gráfica 6. Crecimiento MS0.2X con 2% de sacarosa.



Medición y cálculo de parámetros celulares en la línea silvestre y línea w19.1-3 (11).

En la tabla 2 se reportan los valores de los parámetros celulares calculados para la línea silvestre y la línea w19.1-3. Los únicos parámetros para los que se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) son la longitud de la zona de elongación (Le) y la longitud de la zona de crecimiento (Lgpr).

Tabla 2. Valores promedio obtenidos para los diversos parámetros celulares calculados en la línea silvestre y en la línea mutante w19.1-3(11). \pm Error estándar. Las diferencias estadísticas con la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney con un $\alpha = 0.01$ se representan sobre los resultados con un asterisco, diferencias con un $\alpha = 0.005$ con dos asteriscos. n es igual al número de replicas.

	Tasa de crecimiento (μm) 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	151.0 ± 7.04 n=8	175.0 ± 4.4 n=8	24.8 ± 0.3 n=8	7.0 ± 0.1 n=8	594.4 ± 19.8 n=8	13.0 ± 1.1 n=8
w19	149.6 ± 6 n=10	177.0000 ± 4 n=10	24.5000 ± 0.4 n=10	7.2 ± 0.1 n=10	492.2 ± 23.9 n=10	12.5000 ± 0.4 n=10

	Longitud de la zona de crecimiento de la raíz (μm) Lgpr	Longitud promedio 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	769.4 ± 20.6 n=8	152.6 ± 3.5 n=138	17.6 ± 1.0 n=8	0.9 ± 0.05 n=8	693.8 ± 18.9 n=8	7.5 ± 0.4 n=8
w19	669.2 ± 26.6 n=10	146 ± 2.3 n=178	16.7 ± 0.9 n=10	1.0 ± 0.04 n=10	667.0 ± 20.7 n=10	6.6 ± 0.4 n=10

En la figura 10 observamos que los meristemos de la línea silvestre (a) y la línea w19.1-3 (b) tuvieron la misma longitud.

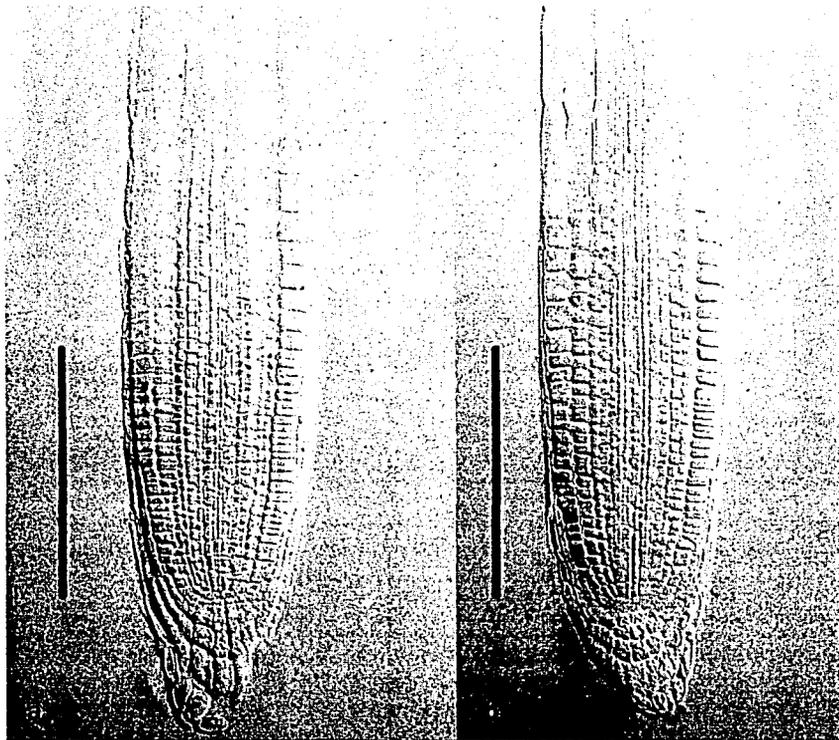


Figura 10. Meristemos de la raíz primaria de la línea silvestre (a) y w19.1-3 (b). La barra en cada fotografía señala la longitud del meristemo.

En figura 11 observamos que la longitud de la zona de crecimiento (Lgpr) en la línea silvestre (a) fue mayor que la de la línea w19.1-3 (b), además se distingue que esta diferencia se originó debido a que la longitud de la zona de elongación fue mayor en la línea silvestre. La zona de elongación está definida en su parte apical por el término del meristemo y en su parte basal por la presencia de protuberancias de pelos radiculares.

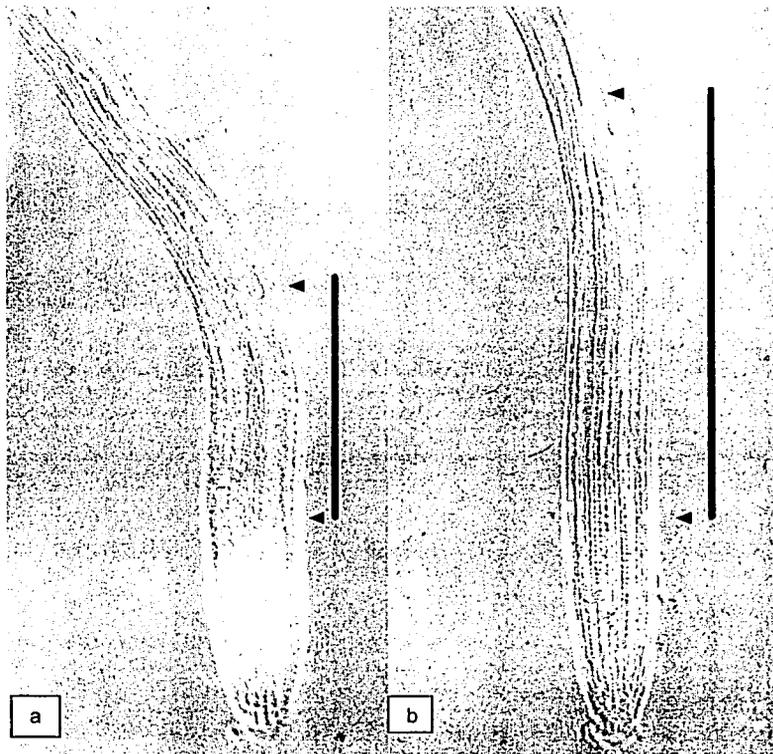
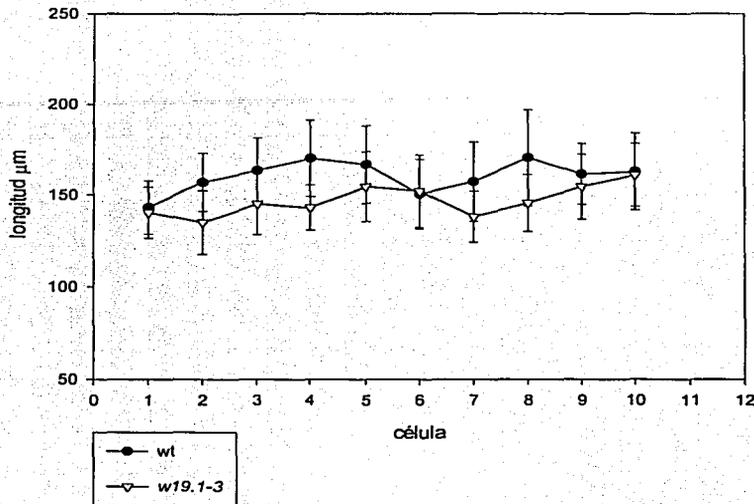


Figura 11. Longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria (Lgpr) de la línea w19.1-3 (a) y silvestrew (b). La barra negra en cada fotografía señala la longitud de la zona de crecimiento. Las flechas señalan los límites de la zona de elongación en ambas líneas.

Gráfica 7. Crecimiento celular de tricoblastos en la zona de diferenciación.



En la gráfica 7 se observa la longitud promedio alcanzada por las 10 primeras células de tricoblastos diferenciadas para las líneas silvestre y mutante. Los tricoblastos diferenciados se caracterizan por la presencia de protuberancias de pelos radiculares o pelos completamente formados, las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%. No hubo un crecimiento celular significativo a lo largo de la raíz de los tricoblastos en las líneas silvestre y mutante al comienzo de la zona de diferenciación. Además, no se encontraron diferencias significativas entre la longitud de los 10 primeros tricoblastos diferenciados en las líneas silvestre y mutante.

Defectos cualitativos observados en el meristemo de la línea w19.1-3 (11).

De forma cualitativa se observó una desorganización en la columela (figura 12, *agl19 b*) y divisiones periclinales en la endodermis (figura 12, *agl19 a*).



Figura 12. Meristemos de la línea silvestre (hileras superior, wt) y de la línea w19.1-3 (hileras media e inferior, *agl19 a*, *agl19 b*) en plano medio. En este plano se observan las células del CQ, las iniciales de córtex/endodermis, las iniciales de epidermis/cofia lateral, y las iniciales de columela, así como las filas celulares que originan. La flecha en *agl19 a* señala una división periclinal en endodermis. En *agl19 b*, se observa la desorganización de la columela.

Discusion y Conclusiones

Construcciones de secuencias regulatorias potenciales de AGL19 fusionadas con el gen de la β - glucoronidasa de *E. coli* (GUS).

Se analizó la expresión de la construcción 1 en plantas, las construcciones 2 y 3 se encuentran en la T1 y su patrón de expresión no ha sido analizado.

Como era de esperarse no se obtuvo ninguna expresión del gen reportero en las plantas transgénicas con la construcción 1, que está constituida por un minipromotor de 180pb fusionado a GUS. Un promotor eucarionte típico consiste de un promotor mínimo o genérico y otros elementos regulatorios en *cis* (Lewin, 2000; Xie y He, 2001. Alberts *et al.*, 1994). El promotor mínimo o genérico está conformado por la región de DNA antes del inicio de la transcripción donde se unen los factores de transcripción generales y la RNA polimerasa II para iniciar la transcripción (Lewin, 2000).

Un promotor genérico puede, en principio, ser expresado en cualquier célula, ya que no depende de otras secuencias regulatorias cuyo uso está controlado por factores específicos para ciertos tejidos. Los factores de transcripción generales son las proteínas accesorias que son requeridas por la RNA polimerasa II para iniciar la transcripción en un promotor dado. Un promotor genérico funciona de forma poco eficiente, y son los factores de transcripción que se unen a secuencias *cis* regulatorias los que regulan la transcripción de un gen en el nivel adecuado (Lewin, 2000).

En el sitio de iniciación de la transcripción no existe una homología estricta de las secuencias presentes en diversos genes, sin embargo existe la tendencia a que la primera base del mRNA sea una adenina flanqueada en cualquier lado por pirimidinas. Esta región denominada el iniciador (Inr) se encuentra entre las posiciones -3 a +5 del sitio de inicio de la transcripción. En teoría, un promotor que consista únicamente del Inr posee la secuencia más sencilla posible que puede ser reconocida por la RNA

polimerasa II. La caja TATA, que es el sitio de reconocimiento en el DNA para la unión inicial del aparato basal de transcripción se encuentra generalmente 25pb antes del sitio de inicio de ésta; las cajas CAAT y GC se encuentran a -75 y -90 arriba del inicio de la transcripción respectivamente, estos motivos en los promotores eucariontes están asociados con la eficiencia de la transcripción y no poseen un papel importante en la especificidad de los promotores (Lewin, 2000).

Es necesario caracterizar los patrones de expresión de las construcciones 2 y 3. Como se planteó en las hipótesis de esta tesis la construcción del promotor completo (construcción 2) de *AGL19* recuperaría el patrón de expresión reportado ya que en esta región se encontrarían los motivos *cis* regulatorios necesarios y suficientes para su transcripción normal. En dado caso de no obtener ninguna expresión en las construcciones 2 y 3, se debe elaborar una estrategia para clonar el fragmento 4.

Debido a que la construcción 1 no da ninguna señal al hacer la reacción de tinción de GUS, esta construcción servirá de control interno negativo de tinción, ya que nos muestra que el gen reportero solo dentro de la planta no es activo.

Las plantas transgénicas que reporten la expresión de *AGL19* con el gen la β -glucoronidasa serán una herramienta más que permita elucidar la función de *AGL19* en el desarrollo de la raíz, a través de cruza de estas plantas con otras mutantes y líneas de sobreexpresión de genes MADS-box, así como con cruza con líneas de ganancia o pérdida de función de otros genes pertinentes y líneas de marcadores celulares. Estas plantas permitirán caracterizar con más detalle el patrón de expresión de *AGL19*. En particular permitirán definir el patrón de expresión en las zonas de la raíz donde los experimentos de hibridación *in situ* no tienen suficiente resolución. Tal es el caso de la zona de elongación celular, que en el caso del mutante *w19.1-3* es menor en longitud que la zona de elongación de la línea silvestre.

Una vez identificada la región regulatoria que recupera el patrón de expresión espaciotemporal transcripcional de *AGL19* será importante reconocer y caracterizar dentro de esta región los distintos módulos de regulación que incrementan o reducen su transcripción en dominios específicos.

Caracterización molecular la mutante w19.1-3.

Los individuos de la línea mutante w19.1-3 son revertantes por lo que tienen un genotipo aparentemente heterocigótico en el análisis por Southern blot.

La línea w19.1-3 con la que se comenzó este trabajo fue interpretada como homociga a partir de un Southern blot en el que se observa el mismo patrón de bandas que se obtuvo en esta tesis. Todos los individuos w19.1-3 presentan las bandas exclusivas para el genotipo mutante y la banda exclusiva del genotipo silvestre, por lo tanto este genotipo se interpreta como homocigo con un alto grado de reversión (figura 8).

La transposasa codificada por el elemento *En1*, con el que se interrumpió al gen *AGL19* en la línea mutante, produce inserciones que son inestables a nivel somático y germinal, sin embargo la excisión germinal, que resultaría en la pérdida total de la inserción, es poco común, mientras que la excisión en regiones somáticas es frecuente (Meissner et al., 1999). Debido a que el elemento *En1* puede excidir durante el desarrollo existen poblaciones de células en las que *AGL19* no está afectado dando lugar al patrón de bandas heterocigótico del análisis por Southern blot.

El mutante w19. 1-3 no es nulo a nivel de mensajero.

En la línea w19.1-3 se producen mRNAs de *AGL19*, sin embargo el nivel de expresión del mensajero es menor en la línea w19.1-3 que en la línea silvestre (figura 9).

Como se observó en el experimento de Southern blot existen regiones en los individuos de la línea w19.1-3 en las que AGL19 no está interrumpido. en estas regiones de la planta se están produciendo mensajeros del gen. Por otro lado, el transposón que interrumpe la secuencia de AGL19 en esta mutante se encuentra a la mitad del primer intrón y no altera las secuencias de edición del mRNA, por lo que es posible que aún las secuencias interrumpidas por el elemento *En1* estén produciendo un mensajero funcional. Es necesario clonar el cDNA producido en la línea mutante para secuenciarlo y el mensajero producido es funcional. Es posible que la expresión del mensajero de AGL19 esté desregulada en el mutante, por lo que sería interesante determinar su patrón de expresión in situ de mRNA. Se recomienda también la búsqueda de otro alelo mutante de AGL19, de preferencia un alelo nulo.

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* ha permitido identificar varios genes cuya pertenencia a familias génicas con miembros que han sido caracterizados funcionalmente los hace buenos candidatos a estudios por genética inversa. En *Arabidopsis* se han generado varias estrategias para producir y aislar mutantes de genes conocidos a través de la inserción de transposones o T-DNA. Los análisis de varios mutantes generados por las estrategias antes mencionadas, y en particular un estudio a gran escala realizado en genes MYB de la clase R2R3 que codifican para factores de transcripción, pusieron de manifiesto algunas deficiencias de tales estrategias de mutagénesis. En ese estudio se hizo una búsqueda de varios mutantes de la familia MYB en distintos bancos de mutantes y se evaluaron, tanto la eficacia de cada tipo de mutación, como su efecto en el fenotipo. Los resultados obtenidos revelaron que la inserción en genes particulares puede no ser encontrada y si se llega a encontrar los alelos generados pueden no ser nulos. Todo lo antes mencionado aunado a la redundancia funcional debido a duplicaciones, así como la poco frecuente ocurrencia

de fenotipos evidentes añaden un grado de dificultad a los análisis funcionales por genética inversa (Meissner *et al.*, 1999; Reichmann y Ratcliffe, 2000).

Los análisis de los patrones de expresión de mRNA *in situ* de los genes a caracterizar, así como sus relaciones filogenéticas permiten hacer una búsqueda más dirigida de fenotipos mutantes de dichos genes.

La línea w19 1-3 no es nula a nivel de mensajero, sin embargo presenta un fenotipo que la distingue de la línea silvestre.

Los experimentos de cinética de crecimiento realizados con la línea w19.1-3 muestran dos condiciones en las que se distinguen diferencias en el crecimiento de la raíz de la línea mutante con respecto a la silvestre, el medio MS 0.5X sin sacarosa y el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa (gráficas 2 y 6).

En las distintas condiciones probadas para el crecimiento de las raíces, se observa que las concentraciones altas de sacarosa producen un crecimiento de la raíz más acelerado independientemente de los cambios en la concentración de sales MS. Lo anterior se cumple también en los medios sin sacarosa para la línea silvestre, ya que en estas condiciones el crecimiento de la raíz se detiene en los primeros días después de la germinación (gráficas 1 y 2). El comportamiento en el que la concentración de sacarosa parece ser el determinante para la dinámica de crecimiento de la raíz no se cumple para la línea w19.1-3 en los medios sin sacarosa, ya que éstas raíces responden al cambio en la concentración de sales MS, y a una concentración menor de éstas, las raíces mutantes alcanzan una mayor longitud que las raíces de la línea silvestre (gráfica 2). La diferencia significativa en el crecimiento de la raíz de la línea w19.1-3 con respecto a la línea silvestre en el medio MS 0.5X sin sacarosa, nos permite afirmar que sí existe un efecto en el desarrollo de la raíz provocado por la mutación de

AGL19 en esta línea, por lo que es necesario identificar los parámetros celulares que dan origen a las diferencias en el crecimiento de las raíces.

En el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa existen diferencias significativas en el crecimiento de la raíz de los individuos de la línea w19.1-3 con respecto a la línea silvestre (gráfica 6). Las raíces de los individuos de la línea w19.1-3 tienen una longitud menor que las raíces de la línea silvestre a partir del día 3 después de la siembra y hasta el final del experimento. Las curvas de crecimiento para ambas líneas tienen el mismo comportamiento y las pendientes de ambas curvas parecen ser iguales a partir del día 4 después de la siembra. En los cuatro primeros días después de la germinación (día 2) las raíces de la línea mutante crecen a una velocidad menor que las raíces silvestres. Al parecer, la diferencia en la aceleración de la velocidad de crecimiento es la que produce las diferencias en la longitud de las raíces mutante y silvestre a lo largo del experimento.

La diferencia significativa en el crecimiento de las raíces de la línea w19.1-3 y la línea silvestre en el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa, permite afirmar que existe un efecto en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana* provocado por la mutación del gen. En esta tesis se evaluaron distintos parámetros celulares de las líneas mutante y silvestre en el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa para explicar el origen de la diferencia en la longitud de las raíces en la cinética de crecimiento.

Existen diferencias significativas en la longitud de la zona de elongación(L_e) y en la zona de crecimiento de la raíz (L_{gr}) entre las líneas w19.1-3 y silvestre, sin embargo estas diferencias no explican la diferencia en la longitud total de la raíz identificada en el experimento de cinética de crecimiento en el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa.

El crecimiento de los órganos de las plantas, en este caso la raíz, es el resultado de los procesos de expansión celular y producción celular (Scheres y Heidstra, 1999). La tasa de producción celular tiene dos componentes la tasa de división celular y el número de células en división (Baskin, 2000). En un estudio realizado por Beemster y Baskin (1998) en la raíz de *Arabidopsis*, se caracterizó la contribución de los componentes de producción celular y expansión celular en el crecimiento de la raíz. En este estudio, realizado con un método cinemático sobre células vivas de córtex, se determinó que la aceleración en la velocidad de crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* es el resultado de un incremento en la producción celular del meristemo, con cambios mínimos en la tasa de elongación celular y el tamaño final de las células. En este mismo estudio se determinó que el incremento en la producción celular es causado por un aumento en el número de células en división, mientras que la tasa de división celular permanece constante a lo largo del meristemo hasta que decrece repentinamente a 0 en la base de éste. Para regular el número de células en división, la raíz debe de controlar la salida del ciclo celular en la parte proximal del meristemo, este control podría ser espacial, de forma que la zona de proliferación se mantendría hasta una posición determinada, o temporal, de forma que la proliferación se mantuviera por cierto número de divisiones celulares (Baskin, 2000). Beemster y Baskin (1998) concluyen también que las zonas de división y elongación están acopladas, por lo que un aumento en el número de células en división produce un mayor número de células en elongación, entonces la longitud de la zona de elongación está determinada por el

número de células que pasan a través de ella, favoreciendo una perspectiva celular con respecto al crecimiento de los órganos.

En el caso de los parámetros celulares medidos y calculados en esta tesis para la raíz de la línea mutante w19.1-3 utilizando el método de Tasa de Producción Celular desarrollado por Ivanov y Dubrovsky (1997), no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros observados con respecto a la línea silvestre. Únicamente se encontraron diferencias significativas en la longitud de la zona de elongación (L_e) y la longitud de la zona de crecimiento de la raíz (L_{gpr}); ambos parámetros son menores en la línea mutante que en la línea silvestre (tabla 2).

La zona de elongación es más corta en la línea mutante pero está compuesta por el mismo número de células que la zona de elongación de las raíces de la línea silvestre. Las raíces de ambas líneas tienen el mismo número de células meristemáticas, del mismo tamaño, dividiéndose a la misma tasa (la tasa de división celular es el inverso de la duración del ciclo celular (Baskin, 2000)), es decir que su tasa de producción celular es igual. Al tener una tasa de división igual, también tienen el mismo número de células que entra a la zona de elongación.

El comportamiento de las células de córtex al entrar a la zona de elongación es distinto entre ambas líneas. Debido a que la longitud de las células de córtex completamente elongadas es igual para ambas líneas y el número de células que entra a la zona de elongación también es el mismo, podemos pensar que en la línea mutante las células de córtex se elongan a una mayor velocidad y se diferencian más cerca del ápice de la raíz, de tal forma que observamos una zona de elongación de menor tamaño en las raíces mutantes con respecto a las raíces silvestres. El menor tamaño de la zona de elongación de las raíces mutantes también es la causa de las diferencias en el tamaño de la zona de crecimiento de la raíz, que está formada por la suma de la zona de elongación y la zona meristemática.

El punto reconocible del protoxilema se encuentra más cerca del ápice de la raíz en la línea w19.1-3 que en la línea silvestre, y el tiempo de diferenciación de este tipo celular también es más corto, aunque estos datos no son significativos apoyarían a los datos encontrados para las células de córtex, donde las células se elongan más rápido y por lo tanto se diferencian más cerca del ápice de la raíz.

En contraste con los resultados obtenidos por Beemster y Baskin (1998) con respecto al crecimiento de raíces silvestres, en el caso del mutante w19.1-3 la tasa de elongación celular sí tiene un efecto en el crecimiento de la raíz mutante, ya que al parecer en este mutante la elongación celular está acelerada y permite a las células alcanzar una longitud normal en una zona de elongación de menor tamaño.

La diferencia en la longitud de la zona de elongación de las raíces mutantes con respecto a la línea silvestre no puede explicar las diferencias en la longitud final de la raíz observadas en el experimento de cinética de crecimiento en el mismo medio, ya que la misma cantidad de células se dividen a la misma tasa y alcanzan la misma longitud final, entonces las raíces de ambas líneas deberían tener la misma longitud.

Debido a que los parámetros celulares evaluados no explican las diferencias en la longitud final de las raíces silvestre y mutante, es posible que las causas que originan estas diferencias ocurran en etapas más tempranas del desarrollo radicular.

Como se observó anteriormente en el experimento de cinética de crecimiento, las raíces de la línea w19.1-3 tienen una velocidad de crecimiento menor que la línea silvestre en los cuatro primeros días del experimento, su aceleración también es menor en esos días. Debido a que el tamaño de las células completamente elongadas es igual en las líneas mutante y silvestre, es de esperarse que la producción celular en los individuos mutantes sea menor en algún momento del desarrollo, ya sea embrionario o postembrionario.

La regulación del crecimiento y la morfogénesis en plantas se interpreta desde dos perspectivas. La perspectiva organísmica o espacial sostiene que el crecimiento y la morfogénesis son guiados por la expansión de los órganos, cuyas células constituyentes solamente fragmentan el volumen resultante (Scheres y Heidstra, 1999). Desde esta perspectiva la división y expansión celular son la consecuencia del crecimiento y la morfogénesis. La perspectiva celular sostiene que la división y expansión celular dirigen de forma autónoma el crecimiento y la morfogénesis. Las células son consideradas entidades individuales que juntas conforman al organismo, de forma que el tiempo y número de divisiones, así como el tiempo y grado de expansión celular son específicos para cada célula (Scheres y Heidstra, 1999).

El comportamiento de crecimiento de la raíz puede ser interpretado desde las perspectivas celular y espacial. Desde la perspectiva celular, la producción celular en el meristemo dirige el crecimiento de la raíz, produciendo las células que subsecuentemente se elongarán hasta alcanzar un tamaño maduro determinado; entonces las zonas de proliferación y elongación están acopladas (Beemster y Baskin, 1998). Por otro lado desde la perspectiva espacial podría señalarse que las tasas de división y expansión celular se determinan en función de la posición en el eje longitudinal de la raíz; entonces el crecimiento de la raíz desde está determinado por el tamaño de la zona de crecimiento de la raíz y las tasas locales de expansión celular. De acuerdo con esta visión la división celular solo subdivide el espacio celular provisto por el proceso de expansión celular (Beemster et al., 2002).

En el caso de la raíz del mutante *w19.1-3*, una zona de división igual que la de la raíz silvestre no se presenta junto con una zona de elongación longitud igual a la de las raíces silvestres. La zona de crecimiento es de menor tamaño en el mutante. Podría decirse que en el caso de la raíz mutante las zonas de división y elongación están desacopladas, este desacoplamiento sería solo físico, ya que funcionalmente las zonas

de elongación de la raíz mutante y silvestre son iguales. Desde la perspectiva espacial podría decirse que la zona de crecimiento de la raíz se ve reducida debido a que existen señales que estimulan la tasa de elongación celular local en la zona de elongación, compensando su tamaño reducido y produciendo células elongadas de tamaño normal. La reducción en la zona de elongación sería la causa de la aceleración en la elongación celular. Desde la perspectiva celular podríamos afirmar que las zonas de división y elongación sí están acopladas, en este caso, las células al salir del meristemo tienen la capacidad de elongarse de forma más rápida por lo que producen una zona de elongación menor en longitud; la disminución en la zona de elongación celular sería el producto de la aceleración en la elongación celular. Las señales que producen la disminución en la zona de elongación provendrían de la zona proliferativa en el caso de la perspectiva celular, y provendrían de la zona de elongación en la perspectiva espacial. En ambos casos el efecto de reducción en la zona de elongación podría ser el resultado de un acercamiento de las señales de diferenciación del tejido maduro hacia el ápice de la raíz.

Las mutantes de los genes AGL19 y AGL14 son similares.

Los defectos a nivel celular en la columela y en la diferenciación prematura observados en la línea mutante *w19.1-3* son similares a los observados en la mutante *w14.5-1* de gen *AGL14* analizada en el laboratorio de Genética Molecular y Evolución, UNAM (Ortiz-Moreno, 2002). El mutante de *AGL14* presenta, al ser crecido en el medio MS 0.2X con 2% de sacarosa, una zona de elongación reducida, pero en contraste con la mutante de *AGL19*, su tasa de producción celular y el tamaño final de las células diferenciadas son menores que los de la línea silvestre. En el mutante de *AGL14*, al igual que en el mutante de *AGL19*, se observó una desorganización celular en la columela. *AGL14* y *AGL19* tienen una similitud del 76% en la secuencia de aminoácidos de la

región MIK por lo que es posible que sean redundantes funcionalmente (Alvarez-Buylla, *et al.* 2000a). El hecho de que las mutantes de *AGL19* y *AGL14* tengan un fenotipo similar individualmente, sugiere que, en lugar de ser redundantes funcionalmente, ambos genes podrían participar en la misma vía de desarrollo. Sin embargo, es de esperarse que la doble mutante de los genes *AGL19* y *AGL14* brinde información importante acerca de la función de estos genes en desarrollo de la raíz.

El mutante w19.1-3 se diferencia prematuramente.

Las divisiones periclinales en la endodermis de la raíz de *Arabidopsis* son comunes en raíces de más de una semana 1 de edad, estas divisiones están asociadas al origen del córtex medio y ocurren a nivel del meristemo (Baum, *et al.* 2002). Las divisiones periclinales observadas en la endodermis de las raíces del mutante *w19.1-3* son inusuales ya que este experimento se realizó en raíces de menos de una semana de edad y además estas divisiones no se observaron en ninguna raíz silvestre.

La disminución en la zona de elongación del mutante *w19.1-3*, aunado a la presencia de divisiones periclinales de endodermis prematuras en el meristemo, permite proponer que *AGL19* podría estar implicado en mantener un estado no diferenciado en el meristemo; en ausencia parcial de *AGL19* el proceso de diferenciación ocurre más rápido.

Los defectos en el crecimiento y celulares del mutantes w19.1-3 se asocian con el patrón de expresión in situ de mRNA reportado para AGL19.

Los defectos en el crecimiento y celulares del mutante *w19.1-3* si se asocian con el patrón *in situ* de mRNA previamente reportado (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a) en el caso de la columela y la diferenciación prematura en el meristemo. Una vez más parece confirmarse que el patrón de expresión de mRNA de los genes de la familia MADS-box

de plantas son predictivos del sitio donde el gen ejerce su función y que por lo tanto este tipo de análisis es esencial para dirigir los estudios por genética inversa.

Perspectivas

A lo largo de la discusión se proponen experimentos concretos a realizarse a partir de la información y herramientas generadas en esta tesis. Es necesario corroborar el fenotipo del mutante *w19.1-3*, así como caracterizar otro alelo mutante de *AGL19* para confirmar que los fenotipos observados se deben a la mutación del gen. Los datos generados en esta tesis aún no ligan a *AGL19* a una vía de desarrollo concreta. Dada la importancia demostrada por otros genes MADS-box en el desarrollo reproductivo de las plantas, y debido a que el mutante *w19.1-3* presenta un fenotipo, se mantiene la hipótesis de que *AGL19* podría estar implicado en la regulación del desarrollo de la raíz. La caracterización a fondo de alelos mutantes de *AGL19*, líneas transgénicas de sobreexpresión y reporteras de la expresión de *AGL19*, permitirá dirigir experimentos que, eventualmente, ligan a este gen a funciones concretas del desarrollo radicular.

Anexo de protocolos, plásmidos y oligos

Transformación (*E. coli*)

En presencia de mechero:

1. Añadir la mitad de una reacción de ligación a 70 μ l de células competentes. Mezclar por pipeteo.

2. Incubar en hielo 20'.

3. Incubar las células a 42°C de 45-50" Y regresar inmediatamente al hielo.

4. Añadir 950 μ l de medio LB líquido a cada tubo.

6) Incubar 1 h30' a 37°C en agitación.

5. Preparar placas de medio LB sólido con el antibiótico requerido por el plásmido utilizado, a una concentración de 100 μ g/ml. En el caso de plásmidos que tengan selección blanco azul (pGEM T o pGEM T easy y pART27):

a) Distribuir sobre el medio LB sólido con asa de vidrio 20 μ l de X-Gal (50 mg/ml) y 100 μ l de IPTG (0.1 M).

6. Centrifugar l' a 6000 rpm.

7.

Retirar 900 μ l de sobrenadante. Resuspender pellet en los 100 μ l restantes y plaqurear.

8. Incubar o/n a 37°C. Después poner en refrigeración 4°C.

Medio LB para bacterias.

Disolver en 800 ml de agua 10g de Caseína hidrolizada o Peptona, 5g de NaCl. Ajustar el volumen a 1l con agua y esterilizar en autoclave. Si se trata de medio sólido añadir 15g/l de bactoagar antes de esterilizar, no hay que mezclarlo ya que no entra en solución hasta que se funde en el autoclave.

Extracción de plásmido de *E. coli* por boiling miniprep

Buffer STET (4°C)	para 100 ml
Sacarosa 8%	8 g
Tritón X-100 5 %	5 ml
EDTA 50 mM	10 ml (0.5 M pH 8.0)
Tris 50 mM	5 ml (1M pH 8.0)

1. Picar una colonia proveniente de una transformación en LB líquido y el antibiótico respectivo a una concentración 100 μ g/ml. Crecer *overnight* a 37°C.

2. Centifugar 1.5 ml de bacterias en un tubo eppendorff por 2 min a 13 000 rpm.

3. Descartar sobrenadante.

4. Resuspender en 150 μ l de STET. Mezclar en vortex para disolver.

5. Añadir 10 μ l de lizozima (10 mg/ml). mezclar en vortex.

6. Hervir en agua inmediatamente por 40 seg.

7. Centifugar 10 min a 13 000 rpm.

8. Sacar el precipitado con un palillo y descartarlo.

9. Añadir un volumen igual de isopropanol frío (150 μ l). mezclar por inversión.

10. Centifugar por 10 min a 13 000 rpm.

11.

Lavar el precipitado con EtOH al 70 %. Centifugar 5 min, descartar y poner a secar a temperatura ambiente.

12. Resuspender en 30 μ l de TE IX. Añadir 1 μ l de RNA A (10 mg/ml) e incubar 30 minutos a 37 °C.

Obtención de células competentes TOP10 *E. coli*.

Material:

- Tubos con medio LB.
- Matraces de 500 ml con 100 ml de medio LB.
- NaCl 10 mM frío estéril
- CaCl₂ 50 mM frío estéril
- Glicerol estéril.

1. Plaquear cepa de *E. coli* (TOP 10) en una placa de medio LB.
 2. PRECULTIVO: Picar con un palillo estéril una colonia aislada, e inocular en 1 tubo de medio LB. Incubar con agitación constante toda la noche a 37°C.
 3. CULTIVO: Inocular con 1 ml del precultivo 100 ml de medio LB, crecer a 37°C, durante 3 a 4 horas, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ = 0.4.
 4. Centrifugar en frío para coleccionar las células por 15 min. a 6000 rpm.
 5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 20 ml de NaCl 10 mM frío.
 6. Centrifugar en frío 15 min a 10 500 rpm. 7.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 8 ml de CaCl₂ 50 mM frío. (Las células ahora son muy frágiles, así que hay que tratarlas cuidadosamente).
8. Mezclar las células con glicerol estéril, calculando que el glicerol quede a una concentración final de 20 %.
 - 9.- Hacer alicuotas de 150 µl y almacenarlas a -70° C.

Restricción de DNA

1. Determinar los µg y el volumen de DNA que serán digeridos con una enzima o varias enzimas de restricción.

2. Determinar las unidades (U) y el volumen de enzima(s) necesarios para digerir la muestra de DNA. En general es mejor utilizar 2.5 U/µg de DNA para evitar digestiones parciales.

$$\text{Unidades de enzima (U)} = (\mu\text{g de DNA}) (2.5)$$

$$\text{Volumen de enzima } (\mu\text{l}) = (\text{U de enzima}) / (\text{concentración de la enzima, U}/\mu\text{l})$$

3. Determinar basándose en el volumen de DNA y de enzima(s) el volumen de reacción. Los buffers de las enzimas de restricción están a una concentración 10X, y si las enzimas lo requieren, la espermidina está a una concentración 100X. Utilizar el buffer específico de la enzima y si se trata de una digestión doble utilizar un buffer compatible con ambas enzimas.

4. Determinar el volumen de dd H₂O para la reacción:

$$\mu\text{l dd H}_2\text{O} = (\text{volumen de reacción}) - (\mu\text{l buffer 10X} + \mu\text{l DNA} + \mu\text{l enzima(s)} + \mu\text{l espermidina})$$

5. Preparar la reacción y añadir la enzima(s) al final.

6. Incubar la reacción a 37°C. De 3-5 horas si se trata de DNA genómico y de 30 minutos a 1 hora y 30 minutos si se trata de DNA de plásmido.

7. Detener la reacción 15 minutos a 65°C.

Células competentes para electroporación de *Agrobacterium*

En condiciones estériles.

1. Inocular la cepa de *Agrobacterium* C44 en placa de LB, incubar de 28-30 °C por 2 días.
2. Picar 1 colonia de Agro en tubo de LB, incubar de 28-30°C 1 día.
3. Inocular 100 ml de LB + 0.1 % de Glucosa con 1 00 µl de precultivo, incubar a 30°C.
4. Incubar hasta que se alcance una D.O.₆₀₀ = 0.5-0.7, poner el matraz en hielo.
5. Coleccionar las células centrifugando por 15 min a 6000 rpm.

- 6.- Resuspender las células en 10 ml de HEPES 1 mM pH7.0, centrifugar como punto 5. Repetir el lavado 3 veces más.
7. Lavar el pellet con 10 ml de Glicerol 10%, centrifugar nuevamente.
8. Resuspender las células en un volumen de 500- 700 μ l de Glicerol 10%.
9. Guardar en alícuotas de 40 μ l, congelar en N₂ líquido y almacenar a -80°C.

Transformación por electroporación de *Agrobacterium*

En condiciones estériles.

1. Descongelar las células en hielo. Pre-enfriar la celda de electroporación.
 2. Mezclar 10 ng de plásmido con las células (40 μ l) y transferir a la celda.
 - 3.- Aplicar un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω . 4.
- Añadir 1 ml de LB, incubar por 1 h a 30°C con agitación ocasional.
5. Plaquesear una alícuota de las células en cajas de LB con el antibiótico respectivo, incubar por 2 días a 30°C.
- Nota. Siempre crecemos la cepa C44 con Rifampicina 100 μ g/ml además del antibiótico de selección para el plásmido.

Transformación de *Arabidopsis* por infiltración

Crecimiento de Plantas

1. Preparar macetas con tierra y sobrellenarlas, cubrirlas con malla (tul) y sujetar la malla con una liga, asegurarse de que la malla este bien pegada a la tierra.
2. Seleccionar semillas del genotipo adecuado (mis transformaciones se hicieron en el ecotipo Columbia). En cinco puntos de la maceta sembrar alrededor de tres semillas. Vernalizar durante dos días a 4°C. Crecer las plantas en cámaras de crecimiento a 22°C. Una semana después de la germinación retirar dos plántulas y dejar solo la más sana en cada punto.
3. Crecer las plantas hasta que el tallo esté de 1 a 5 cm por arriba de la roseta. decapitar la punta del tallo por arriba de una hoja caulina, para promover el crecimiento de tallos secundarios. Realizar la infiltración de 3 a 4 días después de decapitar. La decapitación no es esencial así que puede ser usada para tener listas las plantas para la infiltración. La tierra debe estar saturada de agua antes de la infiltración, de forma que la menor cantidad de *Agrobacterium* se quede en la tierra.

Infiltración

4. Crecer un cultivo líquido grande de *Agrobacterium* con la construcción apropiada a 30°C. Comenzar con un cultivo de 20 ml (LB + antibiótico) tres días antes de la infiltración. Un día antes de la infiltración usar este cultivo para inocular un cultivo de 300 ml (siempre crecemos la cepa C44 con Rifampicina 100 μ g/ml además del antibiótico de selección para el plásmido).
5. Después de 24 horas de crecimiento en el cultivo grande, las células se encuentran a una OD₆₀₀ de al menos 1.2-6. Colectar las células centrifugando por 15 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente. Resuspender en 500ml de Medio de Infiltración, MI. Resuspender por pipeteo durante unos minutos, no es necesario resuspender las células suavemente.
6. Poner en un recipiente un poco más profundo que las macetas el MI. Colocar las macetas invertidas sobre el recipiente de forma que las plantas estén totalmente sumergidas en el MI. Mantenerlas sumergidas durante 15 minutos. Utilizar la suspensión de bacterias tres veces.
7. Quitar las macetas del medio y dejarlas escurriendo de lado sobre una charola. Cubrirlas con un domo y dejarlas en esta posición dentro un cuarto frío durante un día.

Al día siguiente se quita el domo y se paran las macetas, y se transfieren a una cámara a 22°C y no se riegan durante 2-3 días.

8. Recuperar las semillas tres a cuatro semanas después de la infiltración.

Medio de Infiltración	para 1 litro
10 mM MgCl ₂	2.0331g MgCl ₂ * 6H ₂ O
5% Sacarosa	50g
0.044µM benzylamino purina (10mg/ml)	10µl
0.03% Silwet L77 (Lehle seeds)	300µl

Selección de transformantes

1. Preparar placas grandes con medio MS + el antibiótico adecuado.
2. Esterilizar aproximadamente 800 µl semillas (volumen seco) en un tubo falcon, resuspender en TC agar al 0.1% y vernalizar a 4°C. por dos días.
3. Sembrar las semillas en el medio de selección, poniendo gotas de aproximadamente 200 µl. Dejar secar, tapar y sellar con parafilm.
4. después de 8 a 10 días las plantas transformantes deben ser claramente distinguibles como plantas con cotiledones verde intenso y hojas verdaderas.
5. Transplantar a tierra las plantas seleccionadas y cubrir con un domo de plástico hasta que se establezcan bien en las macetas.

Tinción de GUS.

1. Colocar las raíces en un tubo eppendorf de 2ml y añadir 1ml de solución substrato.
2. Incubar a 37 °C toda la noche.
3. Observar al microscopio.
4. Si es necesario aclarar en etanol al 95% , el precipitado azul es estable en etanol.

Solución substrato: 1mM X-gluc en buffer de fosfatos 100 mM pH7. EDTA 10 mM, potasio ferricianido (potassium ferricyanide) 1mM, Triton X-100 al 0.1%.

Stock x-gluc: solución 20 mM en N, N-dimetilformamida (almacenar a -20°C).

Miniprep de DNA genómico de plantas

1. Recuperar 1-3 hojas de *Arabidopsis*. Agregar N2 líquido.
2. Moler en un tubo con un pistilo de vidrio. Poner N2 líquido en el tubo, primero moler el tejido a mano con el pistilo y luego vortexear con el pistilo dentro para pulverizar el tejido.
3. Añadir 700 µl de buffer de extracción antes de que se descongele el tejido.
4. Descongelar a temperatura ambiente vortexear intermitente durante 10 minutos.
5. Añadir 700 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1).
6. Vortexear 10 min a temperatura ambiente, intermitente.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos.
8. Transferir sobrenadante, 600 µl a un nuevo tubo, agregar 1/10 volúmenes de acetato de sodio (60 µl) Y 360 µl de isopropanol, mezclar por inversión 6 veces, dejar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad, eliminar sobrenadante.
10. Lavar el pellet con 200-300 µl de etanol al 70%.
11. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad, eliminar sobrenadante.
12. Secar el pellet (vacío o t. ambiente). Disolver en 20-40 µl de TE o ddH₂O.
13. Almacenar a -20 °C.

Usar 1 μ l para PCR o 3 μ l para digestiones de Southern blots.

Buffer de extracción, para 100 ml.

20ml Tris- HCl 1M, pH 7.5 [] final: 0.20M
5 ml NaCl 5M [] final: 0.25M
5 ml EDT A 0.5M, pH 8.0 [] final: 0.025M
10% [] final: 0.5%

5ml SDS
65 ml ddH₂O

Protocolo para Southern Blot

1. Digerir 5 μ g de DNA con las enzimas de restricción elegidas.
2. Añadir buffer de carga 5X.
3. Cargar las muestras y el marcador de peso molecular adecuado en un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio, correr a 50 mA por 4 horas aproximadamente. Revisar el gel y tomar foto.
4. Incubar en solución desnaturalizante el gel durante 30 minutos en agitación suave.
5. Incubar en solución neutralizante por 30 minutos en agitación suave
6. Transferir el DNA del gel a una membrana de nylon (Hybond N+ Amersham) con buffer 20X SSC.
7. Dejar transfiriendo en toda la noche, desmontar aparato de transferencia y enjuagar la membrana en 2X SSC, marcar con lápiz la cara que estuvo en contacto con el gel, así como los carriles.
8. Fijar el DNA a la membrana en el aparato de crosslinking dos veces a 12000 μ Joules X100 (UV Stratalinker 2400, Stratagene Corp.) y hornear 30 minutos a 65°C.
9. Prehibridar la membrana durante dos horas a 65°C en 10 ml de buffer Church.
10. Eliminar el buffer de prehibridación, añadir 10 ml de buffer Church nuevo y la sonda marcada (previamente desnaturalizada durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, e inmediatamente enfriada en hielo).
11. Hibridar a 65°C toda la noche.
12. Eliminar el buffer con la sonda y realizar dos lavados de 5 minutos a 1° ambiente con 2X SSC, y después 4 lavados con 0.1X SSC+SDS 0.1% a 65°C. Revisar si hay marca específica en la membrana.
13. Sellar la membrana dentro de una bolsa de plástico para evitar que se seque y autorradiografiar en un cassette con dos pantallas intensificadoras. Revelar y fijar.

Solución desnaturalizante para 1 litro

NaOH 0.4 N 16g
NaCl 0.4N 35g

Solución neutralizante para 1 litro

Tris base 60.6g
NaCl 87.7g
HCl conc. 25ml

SSC 20X para 1 litro

NaCl 175g
Citrato de Na 88g

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1M o HCl 5M.

Buffer Church

BSA 1%
EDTA 10mM
SDS 7%
Dextran-SO4 10%
Buffer de fosfatos 0.5M pH 7.2

Marcado de sonda con el kit High Prime DNA Labeling Boehringer Mannheim Cat No. 1585584.

1. Añadir 25ng de templado de DNA y llevar a un volumen de 8 μ l en agua estéril bidestilada.
2. Desnaturalizar el DNA calentando en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriando en hielo inmediatamente después.
3. Sobre el hielo mezclar:
 - 25ng (8 μ l) de DNA desnaturalizado.
 - 4 μ l de la mezcla 1, High Prime reaction mixture.
 - 3 μ l de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP (preparada haciendo una mezcla 1+1+1 de las soluciones 2,4 y 5)
 - 5 μ l [α^{32} P] dCTP solución acuosa
4. Incubar de 10 a 30 minutos a 37°C.
5. Detener la reacción añadiendo 2 μ l de EDTA 0.2M (pH 8.0) y/o calentando a 65°C durante 10 minutos.

Extracción de RNA total con Trizol (Gibco BRL)

Trabajar en condiciones estériles y con material libre de RNAsas.

1. Moler 100mg de tejido con N₂ líquido.
2. Antes de que el tejido se descongele añadir 1 ml de Trizol, homogeneizar.
3. Dejar de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 200 μ l de cloroformo, agitar con vortex durante 15 segundos.
5. Dejar 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos a 4°C.
7. Transferir la fase acuosa (alrededor de 600 μ l o 60% del Trizol utilizado) a un nuevo tubo.
8. Añadir 500 μ l de isopropanol, mezclar y dejar a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos.
9. Centrifugar a 12000 g durante 8 minutos a 4°C- 25°C.
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1ml de EtOH al 75%.
11. Centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a 4°C- 25°C o a 12000 g si el pellet no se precipita bien al fondo del tubo.
12. Eliminar el EtOH y secar brevemente (airdry) de 3 a 5 minutos. No secar completamente el pellet ya que esto reduce su solubilidad.
13. Resuspender en 10 μ l de buffer TE.

Síntesis de la primera cadena de cDNA utilizando Super Script RT para RT-PCR (Cat. No. 18053)

Un volumen de reacción de 20 µl puede utilizarse para 1ng-5µg de RNA total o 1ng-500ng de mRNA. Añadir los siguiente componentes a tubo para microcentrifuga libre de nucleasas:

1µl Oligo (dT) (500µg/ml)

1ng a 5µg de RNA total

1µl de dNTP 10mM

Llevar a un volumen de 12µl con agua estéril

Calentar la mezcla a 65°C durante 5 minutos y poner en hielo inmediatamente después.

Concentrar el contenido del tubo centrifugando brevemente y añadir:

4µl Buffer 5X para síntesis de primera cadena

1µl 0.1M DTT

Mezclar los componentes e incubar por dos minutos a 37°C. Añadir 1µl (200 unidades) de la reversotranscriptasa SuperScript y mezclar por pipeteo. Incubar 50 minutos a 37°C. Inactivar la reacción calentando a 75°C por 15 minutos. El cDNA está listo para ser utilizado como templado para amplificar por PCR.

Buffer 5X para síntesis de primera cadena [250mM Tris-HCL (pH 8.3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15mM MgCl₂]

Lavado y esterilización de semillas de Arabidopsis

Todo en condiciones estériles en la campana.

1. Colocar pocas semillas en un tubo eppendorf y agregar 1 ml de agua estéril. Dejar embebiendo 10 minutos con agitación ocasional.
2. Dar un spin y eliminar el agua.
3. Agregar 1 ml de EtOH absoluto. Agitar perfectamente. Dar un spin y eliminar el EtOH.
4. Agregar 1 ml de solución para esterilizarlas (Cloro 5 %, SDS 1 %, no se esteriliza), agitar constantemente durante 5 minutos.
5. Lavar 5 veces con agua estéril desionizada (o hasta que se considere que se eliminó completamente la sol. de esterilización).
6. Eliminar perfectamente el agua y añadir 1 ml de TC agar al 0.1% estéril.
7. Guardar a 4°C por al menos 2 días antes de sembrar. 8. Sembrar las semillas en tierra o medio con la punta de una pipeta y en las condiciones requeridas. Si se trata de una mayor cantidad de semillas hacerlo en un tubo falcon estéril y esperar a que las semillas se precipiten en el tubo sin centrifugar antes de hacer cada lavado o cambio de solución.

Aclaración de raíces de Arabidopsis.

Es importante tener perfectamente identificadas las raíces individuales que se aclararán, sobre la caja de petri de donde se extraes y en el tubo o recipiente donde serán aclaradas.

1. Incubar en Sol. de Metanol acidificado durante 50 min a 62°C.
2. Quitar del calor y poner en solución básica, incubar 15 min a temp. Ambiente.
3. Rehidratar de 10 min a o/n en (alrededor de 12 horas en cada etanol en este experimento);

40 % EtOH

20 % EtOH

10% EtOH

4. Añadir a las muestras que están en EtOH 10 %, 1 volumen de glicerol al 50 %. Incubar mínimo 30 min a temperatura ambiente.

4. Montar en glicerol al 50 % en portaobjetos con un marco de parafilm. Ver en Nomarsky.

Metanol acidificado, para 50ml

Metanol	10 ml
HCL concentrado	2 ml
H2O	38 ml

Solución básica, 7 % (w/v) NaOH, para 50ml

EtOH	30 ml		H2O
20 ml		NaOH,	3.5g

Otras soluciones

Buffer DS de PCR 10 x

KCl 500mM

Tris pH. 8.0

MgCl₂ 25mM

BSA 100µg/ml

Bromuro de Etidio. Disolver 1 g de EtBr en 100 ml de H₂O_{dd}. Filtrar a través de Whatman # 1 por gravedad. El EtBr es un mutágeno muy poderoso, utilizar siempre guantes y bata; almacenarlo en un frasco cubierto con papel aluminio y a temp. ambiente.

TBE 5X.. Mezclar en 800 ml de H₂O_{dd} 54 g de Trizma, 27.5 g de Ac. Bórico y 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0. Ajustar el volumen a un litro con H₂O y autoclavear, almacenar en botella de plástico a temperatura ambiente.

TE IX.. A 90 ml de H₂O_{dd} se añaden 1 ml de Tris 1M pH8.0 y 200 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0, se afora a 100 ml y se esteriliza por autoclave y se almacena a Temp. ambiente.

X-GaJ, 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D galactosido. Hacer una solución disolviendo el X-gal en dimetilformamida para tener una solución de 20 mg/ml. La dimetilformamida es muy tóxica, por lo que hay que usar guantes y trabajarla en la campana de extracción. Almacenar en tubo de cristal o en tubo de polipropileno. Envolver el tubo en papel aluminio, para evitar que la luz degrade al X-GaJ. Almacenar a -20°C.

IPTG, 100mM Isopropil-thio-galactosido. Disolver 0.2383 g de IPTG en 8 ml H₂O_{dd}, aforar a 10 ml. Esterilizar por filtración y almacenar en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf a -20°C.

Lisozima. Preparar una solución de 10 mg/ml de lisozima en H₂O_{dd} estéril. Almacenarla en alícuotas de 10 ml en tubos de plástico a -20°C.

Loading Buffer 6X. Mezclar 25 ml de glicerol con 0.25 g de azul de bromofenol y llevar el volumen de 50 ml con H₂O_{dd}. Guardar en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf a 4 °C.

Vitaminas para MS stock. 1mg/ml tiamina, 5mg/ml piridoxina, 5mg/ml ácido nicotínico. Agregar 100µl para 1l de MS completo.

Medios de cultivo para plantas

Selección de transformantes. MS completo +antibiótico

Sales MS (Murashige-skoog)

Vitaminas B5 100X

MES

Sacarosa

Agar*

1l
4.4g
1ml
0.5g
10g
8g

Antibiótico, para selección con Kanamicina es necesaria una concentración final de 50mg/ml. *Ajustar el pH a 5.7 antes de agregar el agar, que se funde solamente al autoclavar, añadir vitaminas y antibiótico después de autoclavar en condiciones estériles.

	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 Con 1% de sacarosa	MS 1X Con 4.5% de sacarosa
Sales MS	0.88g	2.2g	2.2g	4.4g	4.4g	4.4g
Sacarosa	20g		5g		10g	45g
MES	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g
Vitaminas MS	20µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Agar*	8g	8g	8g	8g	8g	8g

*Ajustar el pH a 5.7 antes de agregar el agar, que se funde solamente al autoclavar, añadir vitaminas después de autoclavar en condiciones estériles.

Oligos

EN205 5'- AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA -3'

EN8130 5'- GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC- 3'

FAIF 5' - GGA TCC ATG GTG AGG GGC AAA AC - 3'

OEAB158 5' - GCA GCA ACA ATT GAA CGC TAT CAG AGA CG -3'

OEAB171 5'- GCT ATT GTT GCT GTT CCC ATT CCA AGC C -3'

OEAB160 5' - GAA ATT GGG AAT AAT CAT AAG -3'

OEAB162 5' - ACC AGT CTC CAC TTC CAT ATT G- 3'

UBIF 5'- CTT CGT CAA GAC TTT GAC CG - 3'

UBR 5'- CTT CTT AAG CAT AAC AGA GAC GAG -3'

Plásmidos

PGEM-T y pGEM-T Easy Vector Systems Promega

PART27 y pRITA (Gleave, 1992). En los mapas no están registrados los tamaños de los fragmentos individuales, a continuación presento una lista de los tamaños aproximados de los fragmentos de interés:

LB \approx 500pb

RB \approx 1 kb

Nos5' \approx 500pb

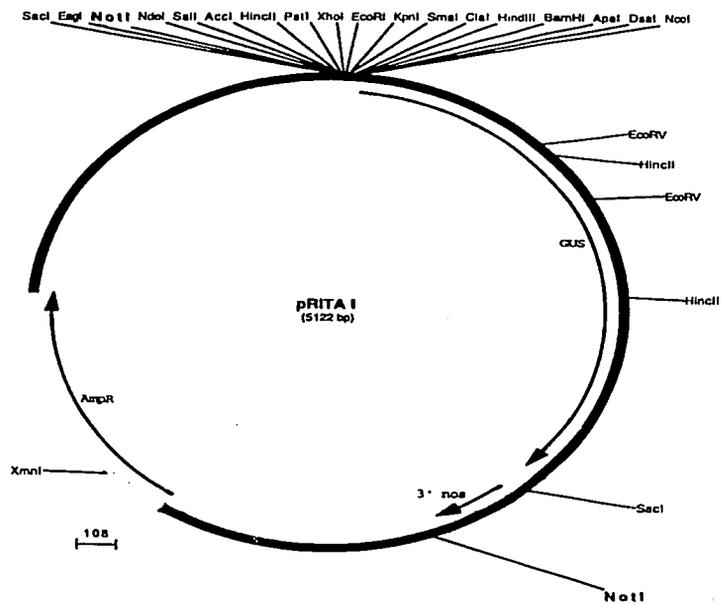
NLSGUS \approx 2.0kb

NptII \approx 900

Bar \approx 600pb

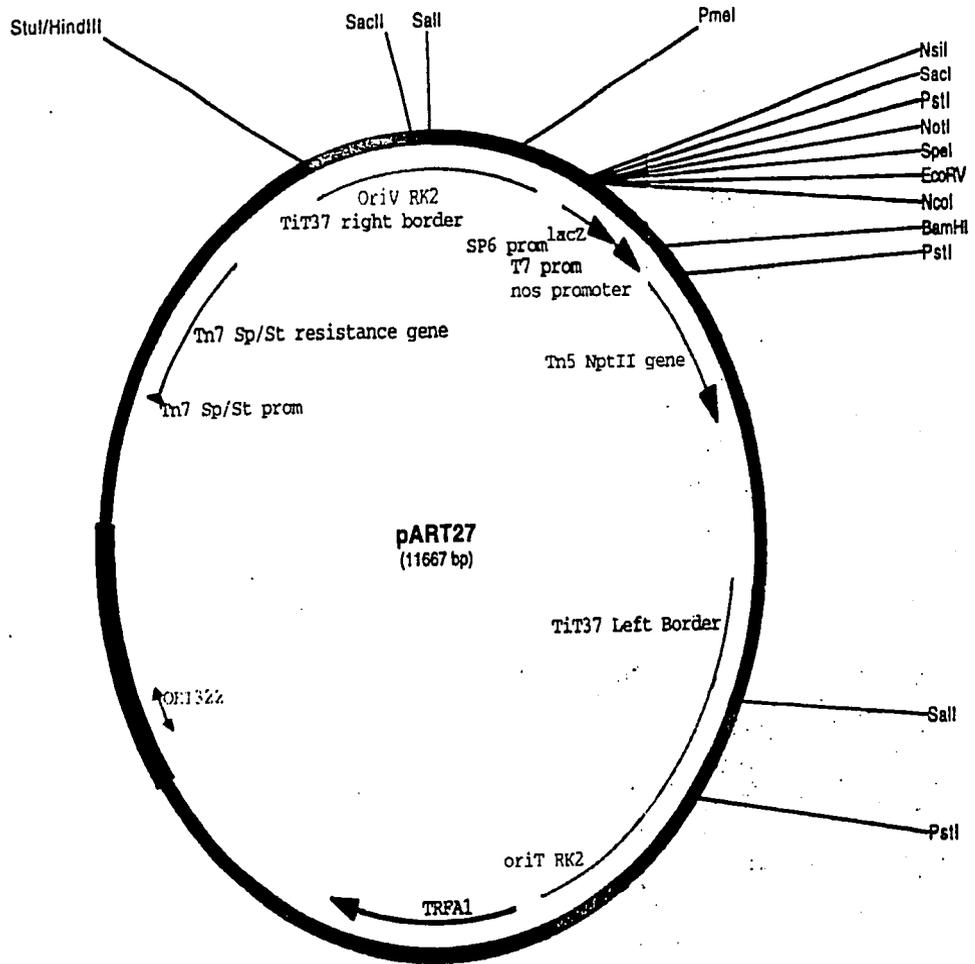
Nos3' \approx 300pb

LacZ \approx 580



Vector pRITA con el gen reportero GUS

Vector binario PART27



Referencias

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD. (1994) Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. USA. 1293 p.
2. Álvarez-Buylla, ER., Liljegren, SJ., Pelaz, S., Gold, SE., Burgeff, C., Ditta, GS., Vergara-Silva, F., Yanofsky, MF., (2000a) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant Journal* 24:457-466.
3. Alvarez-Buylla, ER., Pelaz, S., Liljegren, SJ., Gold, SE., Burgeff, C., Ditta, GS., Ribas de Pouplana, L., Martínez-Castilla, L. Yanofsky, MF. (2000b) An ancestral MADS-box genes duplication occurred prior to the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:5328-5333.
4. Ambrose, BA., Lerner, DR., Ciceri, P. Padilla, CM., Yanofsky, M., Schmidt, RJ. (2000) Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular Cell* 5: 569-579.
5. Anderson, M., Wilson, F. (2000) Growth, maintenance, and use of *Arabidopsis* genetic resources. En *Arabidopsis a practical approach* (Ed. Z.A. Wilson) Oxford University Press, USA. 275p.
6. Baskin, TI. (2000) On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Molecular Biology* 43:545-554.
7. Baum, DA. (1998) The evolution of plant development. *Current Opininion in Plant Biology* 1:79-86.
8. Baum, SF., Dubrovsky, JG., Rost, TL. (2002) Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *American Journal of Botany* 89:908-920.
9. Baumann, E., Lewald, J., Saedler, H. (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an *En-1*-mutagenised *Arabidopsis thaliana* generated via single seed descent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 12432-12437.
10. Beemster, GTS., Baskin, TI. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116:1515-1526.
11. Beemster, GTS., De Vusser, K., De Tavernier, E., De Bock, K., Inze, D. (2002) Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiology* 129: 854-864.
12. Benfey, NP. Scheres B. (2000) Root development. *Current Biology* 10:R813-R815.
13. Bomblies, K., Dagenais, N., Weigel, D. (1999) Redundant enhancers mediate transcriptional repression of *AGAMOUS* by *APETALA2*. *Developmental Biology* 216:260-264.
14. Bowman, JL., Alvarez, J., Weigel, D., Weyerowitz, EM., Smyth, DR. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 119:721-743.
15. Burgeff, C.(2001) Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: Patrones de expresión *in situ* y análisis filogenético. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F.
16. Burgeff, C., Liljegren, SJ., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, MF. Álvarez-Buylla, ER. (2002) MADS-box gene expresión in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214:365-372.
17. Busch, MA., Bomblies, K., Weigel, D. (1999) Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285-585-587

18. Carrol, SB. (2000) Endless forms: The Evolution of Gene Regulation and Morphological diversity. *Cell* 101:577-580
19. Coen, ES., Meyerowitz, EM. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
20. Cronk, QCB. (2001) Plant development and evolution in a post-genomic context. *Nature Review of Genetics* 2:607-619.
21. Doebley J., Lurkens, L. (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* : 1075-1082.
22. Dolan, L. (1999) en Development, genetics, epigenetics and environmental regulation. Russo, VEA., Cove, DJ., Edgar, LG., Jaenisch, R., Salamini, S. (Editores) Springer-Verlag, Germany. 542p.
23. Dolan, L. Janmaat, K. Willemsen, V. Linstead, P. Poethig, S. Roberts, K., sheres, B. (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
24. Dubrovsky, JG., Doerner, PW., Colón-Carmona, A., Rost, TL. (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: 124: 1648-1657.
25. Ferrandiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. Yanofsky, MF. (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1*, and *CAULIFLOWER*. *Development* 127: 725-734.
26. Friml, J., Benková, E., Bilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., Palme, K. (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 661-673.
27. Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, MF., Martienssen, R. (1998) The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125: 1509-1517.
28. Hartmann, U., Hohmann, S., Nettlesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., Huijser, P. Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 21:351-360.
29. Hill, TA., Day, CD., Zondlo, SC., Thackeray, AG., Irish, VF. (1998) Discrete spatial and temporal *cis*-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. *Development* 125:1711-1721.
30. Hofer, J., Ellis, N. (2002) Conservation and diversification of gene function in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 5:56-61.
31. Honma, T., Goto, K. (2000) The *Arabidopsis* homeotic gene *PISTILATA* is regulated by discrete *cis*-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* 127: 2021-2030.
32. Honma, T., Goto, K. (2001) complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409:525-529.
33. Howell, SH. (1998) Molecular genetics of plant development. Cambridge University Press, UK. 365 p.
34. Ivanov IB., Dubrovsky JG. (1997) Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cell-cycle, rate of cell production, and rate of root growth. *International Journal of Plant Sciences* 158(6): 757-763.
35. Jack, T. (2001) Plant development going MADS. *Plant Molecular Biology* 46:515-520.
36. Lee, H., Suh, SS., Park, E., Cho, E., Ahn, JA., Kim, SG., Lee, JS., Kwon, YM., Lee, I. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 14: 2366-2376.
37. Levine, M. (2002) How insects lose their limbs. *Nature* 415: 848-849.
38. Lewin, B. (2000) Genes VII. Oxford University Press, USA. 990 p.

39. Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F. (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
40. Meissner, R.C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H.D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeekens, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulman, E., Tissier, A.F., Bouchez, D., Jones, J.J.D., Pereira, A., Wisman, E., Bevan, M. (1999) Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* 11: 1827-1840
41. Meyerowitz, E.M. (1989) *Arabidopsis* a useful weed. *Cell* 56: 263-269.
42. Michaels, S.D., Amassino, R.M. (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11: 949-956.
43. Ng, M., Yanofsky, M.F. (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Review of Genetics* 2:186-195.
44. Ortiz-Moreno, E. (2002) Análisis funcional preliminar de un gen MADS box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F.
45. Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M. (2000) B and C floral identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405:200-203.
46. Purugganan, M.D. (1998) The molecular evolution of development. *Bioessays* 20: 700-711.
47. Raff, R.A. (2000) Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nature Review of Genetics* 1:74-79.
48. Raven, P.H., Evert, R.F., Eichorn, S.E. (1999) *Biology of Plants*. W.H. Freeman and Company/Worth Publishers, USA. 944p.
49. Riechmann, J.L., Ratcliffe, O.J. (2000) Genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion of Plant Biology* 3: 423-434.
50. Samach, A., Onuchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarts-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., Coupland, G. (2000) Distinct roles of CONSTANTS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613-1616.
51. Scheres, B., Heidstra, R. (1999) Digging out roots, pattern formation, cell division, and morphogenesis in plants. *Current Topics in Developmental Biology* 45:207-245.
52. Scheres, B., Wolkenfelt, H. (1998) The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 36(1-2):21-32.
53. Sieburth, L.E., Meyerowitz E.M. (1997) Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* 9:355-365.
54. Smyth, D. (2000) A reverse trend – MADS functions revealed. *Trends in Plant Sciences*. 5: 315-317.
55. Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kano, A., Kim, J.T., Munster, T., Winter, K.U., Saedler, H. (2000) A short story of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42:115-149.
56. The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796-815.
57. Theissen, G., Kim, J.T., Saedler, H. (1996) Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 43: 484-516.
58. Theissen, G., Munster, T., Henschel, K. (2001a) Why don't mosses flower?. *New Phytologist* 150: 1-8.

59. Thiessen, G. (2001b) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion Plant Biology* 4:75-85.
60. Tilly, JJ., Allen, DW., Jack, T. (1998) The CarG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects. *Development* 125:1647-1657.
61. Tsugeki, R., Fedoroff, NV. (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:12941-12946.
62. Vergara-Silva, F., Martinez-Castilla, L. Álvarez-Buylla, ER. (2000) MADS-box genes: development and evolution of plant body plans. *Journal of Phycology* 36:803-812.
63. Xie, M. He, Y. (2001) Bidirectionalization of polar promoters in plants. *Nature Biotechnology* 19: 677-679.
64. Yu, TS., Li, Hm. Chloroplast protein translocon components atToc159 and atToc33 are not essential for chloroplast biogenesis in guard cells and root cells. *Plant Physiology* 127: 90-96.
65. Zar, JH.(1974)Biostatistical analysis. Prentice-Hall, USA.. 620 p.
66. Zhang, H., Forde, BG. (1998) An *Arabidopsis* root development that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Elena Alvarez-Buylla por permitirme participar en los proyectos que se realizan en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas. En el laboratorio Elena me dió la oportunidad de aprender a mi ritmo, además me introdujo a un área de la Biología que me es de gran interés y a la que pienso dedicarme en los próximos años. También quiero agradecer todo lo que me enseñaron los integrantes del laboratorio: León, Angeles, Rosalinda, Alicia, Fran, Mario, Julio, Ignacio, Caro, Enrique, Barbara, Paco, Elda, Arturo, Eli, y a los demás estudiantes del lab.

Agradezco también a mis sinodales por sus consejos para mejorar esta tesis, y a Joseph Dubrovsky en concreto, ya que gran parte del trabajo experimental presentado en este trabajo se planeó y realizó con su ayuda.

Disfruté mucho la carrera de Biología, gracias a mis maestros de la Facultad de Ciencias y amigos de la carrera.

Pues gracias a mis papás: Margarita, David y Miguel, mis hermanas: Dení, Marel, María y Bárbara, a mi abuelo Raúl. Y a la familia extendida.

Gracias a mis amigos de siempre, Ale, Laura, Pati, Chente, Aline, Luis, Enrique Ortiz muchas gracias, Enrique Bravo, a Marusia, Caro, Rodrigo y Babel.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA