



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

00322

82

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y
ANÁLISIS FUNCIONAL PRELIMINAR DE
UNA MUTANTE DEL DESARROLLO
FLORAL EN *Arabidopsis thaliana***

TESIS CON
FALSA TE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLOGA

PRESENTA:
TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN
CODIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES



MÉXICO, D.F.



2003

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización molecular y análisis funcional preliminar de una mutante del desarrollo floral en Arabidopsis thaliana"

realizado por Tania Hernández Hernández

con número de cuenta 9531841-7, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis		
Propietario	Dra. Alicia Gamboa de Buen	<i>Alicia Gamboa de B.</i>
Co-director de Tesis		
Propietario	Dra. Elena Alvarez-Buylla Roces	<i>E. Alvarez-Buylla</i>
Propietario	Dra. Alma Orozco Segovia	<i>Alma Orozco Segovia</i>
Suplente	Dra. Margarita Collazo Ortega	<i>M. Collazo Ortega</i>
Suplente	M. en IBB. Rosalinda Tapia López	<i>Rosalinda Tapia López</i>

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Índice

Agradecimientos 5

Abreviaciones 7

I.- Introducción 11

(Desarrollo Floral)

A. Fases del desarrollo en *Arabidopsis thaliana* 12

B. Bases genéticas del desarrollo floral 14

C. El desarrollo reproductivo está íntimamente relacionado con el desarrollo vegetativo 16

D. El modelo ABC para el desarrollo floral y los genes MADS-Box 18

E. AGAMOUS: Desarrollo carpelar y determinación meristemática 20

F. AGAMOUS no actúa solo en el desarrollo carpelar y la determinación meristemática 22

II.- Antecedentes 25

(Vías de transducción de señales. FLOR1 y las LRR)

A. La proteína FLOR1: una LRR que interactúa in vitro con el factor de transcripción AGAMOUS 26

B. Localización subcelular de FLOR1 en *Arabidopsis thaliana* 27

C. Las proteínas ricas en leucina y su importancia biológica 28

D. Búsqueda de la mutante *flor1* 31

III.- Objetivos 35

Objetivo general 35

Objetivos Particulares 35

A. Corroborar de la mutación en FLOR1 por inserción de T-DNA 35

B. Analizar de la secuencia de mRNA de FLOR1 en las plantas mutantes 35

C. Hacer una búsqueda de posibles motivos regulatorios en las secuencias promotoras e intrónicas del gen FLOR1 35

D. Analizar el fenotipo mutante. Comparar su crecimiento y desarrollo en diferentes condiciones de iluminación 36

E. Construir plásmidos recombinantes 36

IV.- Materiales y Métodos 37

- Material Biológico 37
- A. *Corroboración de la mutación en FLOR1 por inserción de T-DNA* 38
- B. *Análisis de la secuencia de mRNA de FLOR1 en las plantas mutantes* 39
- C. *Búsqueda de posibles motivos regulatorios en las secuencias promotoras e intrónicas del gen FLOR1* 40
- D. *Análisis del fenotipo mutante. Comparación crecimiento y desarrollo en diferentes condiciones de iluminación* 41
- E. *Construcciones en plásmidos recombinantes* 42

V.- Resultados 47

- A. *Corroboración de la mutación en FLOR1 por inserción de T-DNA* 47
- B. *Análisis de la secuencia de mRNA de FLOR1 en las plantas mutantes* 47
- C. *Búsqueda de posibles motivos regulatorios en las secuencias promotoras e intrónicas del gen FLOR1* 48
- D. *Análisis del fenotipo mutante. Comparación entre luz continua y fotoperiodo* 54
- E. *Construcciones en plásmidos recombinantes* 65

VI.- Discusión 67

(Luz, Hormonas y Transducción de señales)

- A. *Caracterización molecular* 67
- B. *Búsqueda de motivos regulatorios en las regiones no codificantes de FLOR1* 67
- C. *Análisis funcional preliminar. Comparación plantas mutantes vs. plantas control* 72
- C.1. *Desarrollo reproductivo* 72
- C.2. *Desarrollo vegetativo* 73
- Respuesta diferencial a las condiciones de luz en las plantas mutantes* 73
- Alteraciones en el fenotipo de las mutantes flor1* 75
- Citocininas y respuesta diferencial a las condiciones de iluminación* 77

VII.- Conclusiones y perspectivas 81

VIII.- Bibliografía 85

IX.- Apéndice 95

Agradecimientos

A mi papá y mi mamá, que me han inculcado la pasión por la ciencia, por la búsqueda del conocimiento y la curiosidad por entender la vida...

A mis hermanos queridos...

A Alejandro...

A los profesores que durante mis estudios han representado para mí fuente de motivación, y que me han ayudado a entender y preguntar:

Alicia Gamboa, Elena Alvarez-Buylla, Judith Márquez, Margarita Collazo, Víctor Valdés, Alfonso Torre Blanco, Shaday Michan, Luis Delaye y Arturo Becerra, Eberto Novelo, Gerardo Hernández, Carlos López Beltran, León Martínez, Juan Nuñez, Montserrat Gispert, María Teresa Benitez, Lucía Almeida, Monica Vizcaino, Guadalupe Vidal, Irene Pisanty y Eduardo Rendón, Maricarmen Uribe, Rosa Zugazagoitia y Ana Adela Sanchez.

Creo que son ellos quienes han hecho que para mí estudiar biología merezca la pena de dedicarle todo mi tiempo y energías. Muchos de ellos me enseñaron además a ser una mejor persona.

A mis queridos amigos Sara, Chucho y Louis.

A todos los miembros del Laboratorio, que nunca me han negado ayuda y orientación: Rosalinda Tapia (Rous), Elizabeth (Elicienta), Enrique Ortiz, Ignacio Tlalpa (Nacho), León Martínez, Francisca Acevedo (Fran), Arturo Pérez, Mitzi, Anidia, Amanda Ochoa, Angeles Cortéz y todos los demás que se fueron y que llegan.

A la Facultad de Ciencias, al Instituto de Ecología y a la Fundación TELMEX-HombreNaturaleza.

Además, quiero hacer tres agradecimientos especiales:

A la Dra. Alicia Gamboa por enseñarme y dirigirme con gran paciencia, por acercarme a la realidad del quehacer científico, por haber contribuido enormemente a mi formación y sobre todo por haberme ofrecido su amistad.

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla por su orientación y correcciones y por darme tanta libertad.

A la Dra. Alma Orozco, a la Dra. Margarita Collazo y a la M. en IBB. Rosalinda Tapia por acceder amablemente a revisar este trabajo.

A Perico (*y mamá*).
Tu valor y tu fuerza nos inspiran,
tu sonrisa ilumina nuestras vidas.

Abreviaciones

Arabidopsis: nombre común de *Arabidopsis thaliana*

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP's: desoxinucleótidos trifosfatados

FP: fotoperiodo

FR : rojo lejano

IE-UNAM: Instituto de Ecología de la UNAM

LC : luz continua

LRR : proteína rica en leucina

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PS-LRR: subfamilia de proteínas ricas en leucina específicas de plantas

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa para amplificar productos de
reverso transcripción

R:FR : relación rojo-rojo lejano

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

UWBC: siglas en inglés del Centro de Biotecnología de la Universidad de
Wisconsin

I. Introducción

Desarrollo Floral

Las angiospermas dominan en abundancia el reino vegetal, comprendiendo alrededor de 250,000 especies existentes entre las cuales están la mayoría de plantas que han sido domesticadas para fines agrícolas (Fosket, 1994). El atributo principal que caracteriza a las angiospermas es la presencia de estructuras florales. Las angiospermas son identificadas y clasificadas principalmente por las características de sus flores, pero a pesar de la diversidad de formas florales que podemos encontrar en la naturaleza existen similitudes básicas en los patrones de disposición de los órganos florales. Las flores contienen carpelos (órganos reproductivos femeninos) y estambres (órganos reproductivos masculinos) rodeados por el perianto, constituido por órganos estériles. En muchas especies, el perianto está compuesto de pétalos y sépalos perfectamente diferenciables, mientras que en otras éstos son indistinguibles unos de otros y se les denomina tépalos.

Como estructuras reproductivas, las flores constituyen uno de los mas visibles y espectaculares productos de la evolución (Lawton-Rauh et al., 2000). Siendo el origen de las angiospermas un "misterio abominable" para Darwin, las estructuras florales aparecen por vez primera en el registro fósil de las plantas con semillas hace aproximadamente 130 millones de años, en algún momento durante el Cretácico temprano (Raven, 1992). A partir de entonces ocurre un rápido evento de diversificación de las plantas con flores, poblando diferentes ambientes y llegando a tener una posición dominante en la vegetación de la tierra (Cronquist, 1968).

En un contexto evolutivo, los elementos estructurales de las flores pueden ser definidos como el resultado de innovaciones clave (Endress, 2001). Las innovaciones clave ("key innovations") son pasos intrigantes en la filogenia de los organismos (Lauder y Liem, '89, Cheverud, '90, Cracraft, '90, Müller, '90, Nitecki, '90, Raff, '96, Crane y Kenrick, '97, etc. en Endress, 2001); son nuevos caracteres que adquieren un papel biológico indispensable (en el desarrollo o la ecología del organismo), lo que provoca que se conserven a pesar de las presiones cambiantes de adaptación (Müller y Wagner, 1991; en Endress, 2001). La aparición del carpelo albergando a los óvulos en las angiospermas primitivas, o la presencia de pétalos y nectarios atractores de polinizadores potenciales, pueden considerarse como innovaciones clave que aparecen con las angiospermas. Como vemos, el desarrollo floral puede considerarse como un interesante evento cuyo estudio arrojará información sobre importantes mecanismos evolutivos.

A. Fases del desarrollo en Arabidopsis thaliana

Los progresos recientes en la disertación de los diversos factores que influyen en el desarrollo floral, así como de los eventos moleculares que lo originan se han logrado en gran parte gracias a los estudios hechos en *Arabidopsis thaliana*. (Simpson et al., 1999). *A. thaliana* es una planta herbácea anual * perteneciente a la familia Brassicaceae (Bowman, 1994). Lo que ha hecho de esta planta la elección principal como un excelente modelo experimental es su pequeño tamaño (lo que facilita su manejo en el laboratorio), su ciclo de vida corto (de cinco a seis semanas creciendo en condiciones óptimas) con una prolífica producción de semillas, su genoma pequeño, que es susceptible de mutagenesis o de transformarse genéticamente con metodologías establecidas, y sobre todo el hecho de que su genoma esta secuenciado en su totalidad (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

En la figura 1 se representa esquemáticamente las fases vegetativa y reproductiva *Arabidopsis thaliana*, las cuales están separadas temporalmente. La fase vegetativa se caracteriza por la producción de hojas de roseta dispuestas en filotaxia espiral con pequeño internodos entre hojas sucesivas (Bowman, 1994). La transición de estadio vegetativo a reproductivo está controlada por factores tanto endógenos como ambientales que determinan el momento en el cual el meristemo apical que producía las hojas en la fase vegetativa cambia a meristemo de inflorescencia en la fase reproductiva. Una vez que la transición floral ocurre, los primordios florales se inician a partir de los costados del meristemo vegetativo apical y se desarrollan después los órganos florales en cada uno (Simpson et al., 1999).

En *A. thaliana* el desarrollo de las inflorescencias y las flores que las componen ocurre en dos pasos básicos (Rounsley et al., 1995). A partir de la transición a la floración, primero se produce una inflorescencia primaria o principal a partir del meristemo apical del tallo, que da lugar al meristemo de inflorescencia, el cual produce meristemas florales a sus costados en forma espiral.

En segundo lugar, cada meristemo floral se desarrolla en una sola flor consistiendo de cuatro distintos tipos de órganos arreglados en cuatro verticilos concéntricos. Estos verticilos contienen cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y dos carpelos fusionados (Rounsley et al., 1995).

* Las plantas anuales o monocarpicas florecen una vez en su tiempo de vida para morir posteriormente, perpetuándose a sí mismas solo como semillas (Cronquist, 1971).

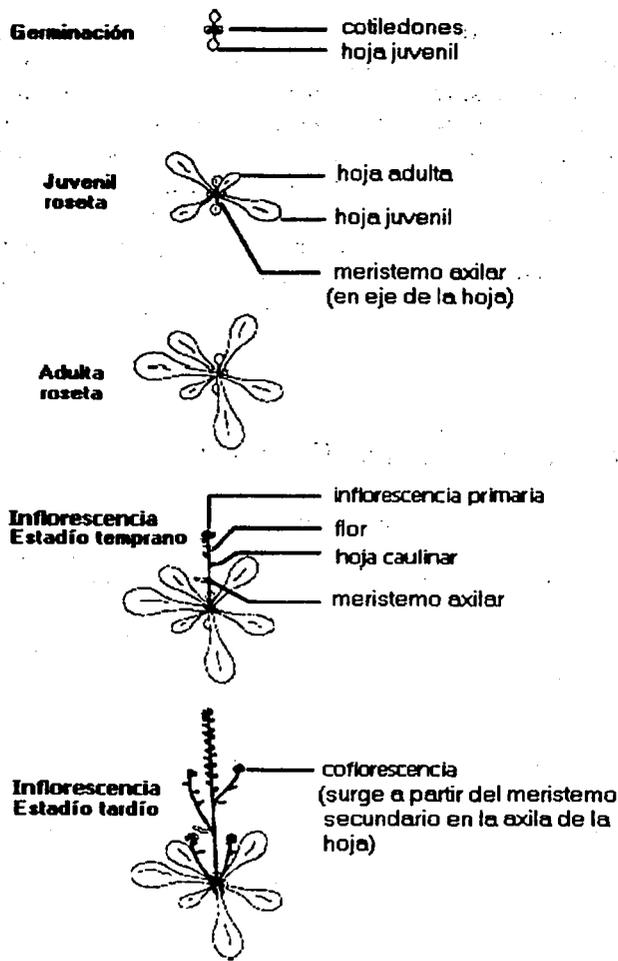


Figura 1. Diferentes fases del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*. Tomado y modificado de Simpson et al., 1999

Una vez desarrollada la inflorescencia apical, aumenta la distancia internódica entre las hojas más superiores del tallo y las flores (inflorescencia estadio temprano, fig. 1). Las posiciones apicales más cercanas a la base del tallo de la inflorescencia primaria están ocupadas entonces por un pequeño número de hojas caulinares y las posiciones apicales más cercanas al meristemo de la inflorescencia primaria están ocupadas por un número indeterminado de flores individuales (fig. 1), que

irán surgiendo de los costados del meristemo de inflorescencia mientras se elongan los internodos entre ellas, quedando en la misma filotaxia espiral que las hojas inferiores. Posteriormente surgen meristemos secundarios en las axilas de las hojas caulinares, comenzando a desarrollarse coflorescencias, con un patrón reiterativo del desarrollo de la inflorescencia primaria (Bowman, 1994). Una vez culminada la floración, la dominancia apical disminuye, permitiendo que las inflorescencias secundarias o coflorescencias (que surgen de los meristemos axilares de las hojas caulinares y de roseta) se desarrollen (Simpson et al., 1999). También pueden surgir inflorescencias terciarias a partir de las axilas de las hojas caulinares de los tallos de la inflorescencia secundaria o de manera basipétala a partir de las axilas de las hojas de roseta.

B. Bases genéticas del desarrollo floral

La biología del desarrollo ubicada en un contexto evolutivo comienza a emerger como una nueva disciplina integrativa (Raff, 2000; Wallace, 2002). Las bases genéticas del desarrollo en animales se han estudiado desde hace algún tiempo en organismos modelo como *Drosophila melanogaster* o *Chaenorabditis elegans*, y solo recientemente estos estudios han cobrado auge en plantas, gracias a organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* o *Anthirrinum majus*.

Hace ya más de dos siglos que Goethe (1790) se percató del valor del estudio de los mutantes, o "metamorfosis retrógradas" como él las llamaba, en la elucidación de los mecanismos por los cuales los organismos se desarrollan: "*From our acquaintance with this abnormal metamorphosis, we are enabled to unveil the secrets that normal metamorphosis conceals from us, and to see distinctly what, from the regular course of development, we can only infer*" (Goethe, 1790; en Bowman, 1994).

Las intensas búsquedas de mutantes de desarrollo en *D. melanogaster* (con afectaciones en la formación de los patrones en el embrión y en el adulto) y el análisis de la estructura, función y expresión de las proteínas que codifican han revelado que de los miles de genes en el genoma solo son unos cuantos los que alteran de manera discreta el desarrollo, y que éstos codifican ya sea para factores de transcripción o para componentes de vías de transducción de señales; además de que la expresión espacio temporal de los genes está muy relacionada con las regiones en las que el gen cumple su función (Carroll et al, 2001). Los avances en el estudio del desarrollo en plantas indican que estas generalizaciones también se aplican a las bases genéticas del desarrollo vegetal (Howell, 1998).

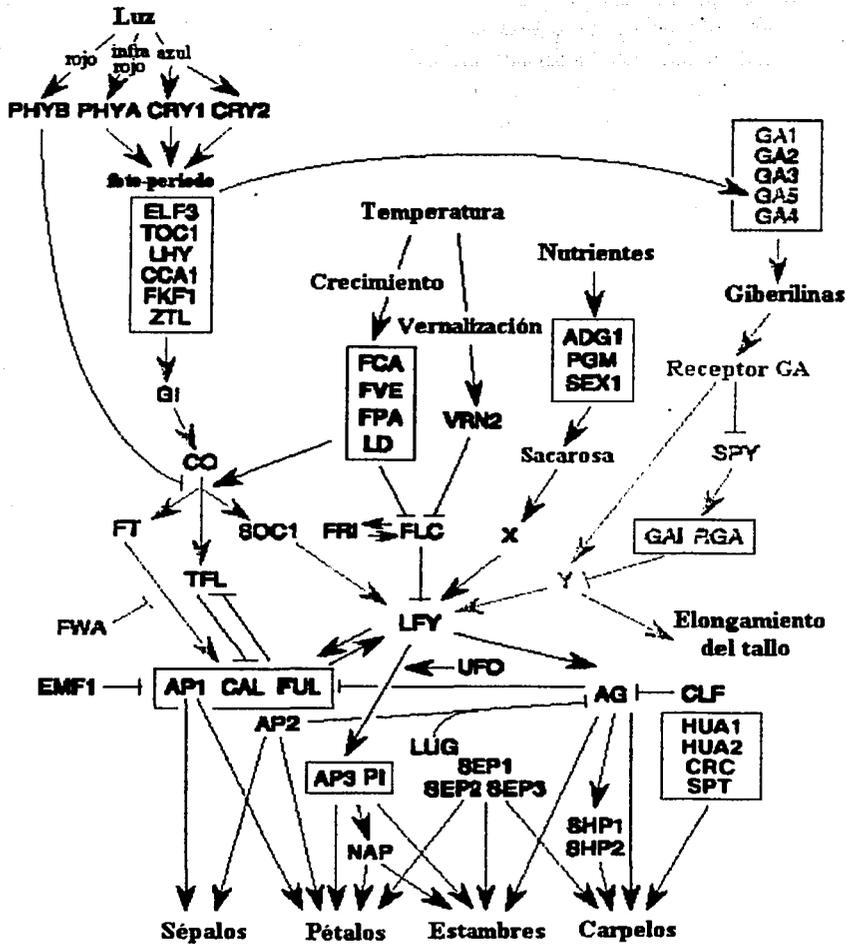


Figura 2. Esquema que representa las interacciones entre los diferentes genes que controlan o intervienen en el proceso de floración y desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana*. El modelo se basa principalmente en estudios realizados con mutantes del desarrollo. Las diferentes vías de inducción a la floración se muestran en distintos colores. Las abreviaciones en mayúsculas representan a los genes. Tomado y traducido de Blázquez, 2000

En plantas, los estudios basados en análisis de mutantes han llevado a elucidar exitosa, aunque aún parcialmente, algunas de las interacciones genéticas regulatorias más importantes para el desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*; y es así como estas especies se han convertido en organismos

modelo para el estudio del desarrollo floral (Weigel y Meyerowitz, 1994). El desarrollo de inflorescencias y flores en las dicotiledoneas está determinado por una red de genes bien organizada (Blázquez, 2000; Theissen et al. 2000) que están siendo caracterizados a nivel genético y molecular (figura 2).

Como primer punto en la acción de la red de regulación del desarrollo floral podemos encontrar a los **genes de transición a la floración**, como *FCA* o *CO* (*CONSTANS*). Los análisis genéticos hechos en mutantes de floración tardía y temprana en *Arabidopsis* han revelado tres principales vías de inducción de la floración: la vía de promoción por día largo, la vía de estimulación de floración por giberelinas y la vía autónoma (independiente de fotoperiodo) que responde a la temperatura y donde tiene su efecto la vernalización (Jack, 2000; Blázquez, 2000). La transición a la floración ha resultado un proceso sumamente complejo determinado por la interacción de más de 30 genes componentes de las diferentes vías (Blázquez, 2000; para revisiones ver Koornneef et al., 1998 y Simpson et al., 1999).

Las múltiples vías que regulan el tiempo de la transición floral actúan directa o indirectamente en la activación de los **genes de identidad meristemática**, como *LFY* (*LEAFY*), *CAL* (*CAULIFLOWER*) o *AG* (*AGAMOUS*), que hacen que el destino de las células meristemáticas cambie para dar lugar a la fase reproductiva de la planta, es decir, de meristemo vegetativo a meristemo de inflorescencia y de meristemo de inflorescencia a meristemo floral (Koornneef et al., 1998). Algunos genes intermedios posiblemente median el paso entre meristemo floral y **genes de identidad de órganos**, como *AP3* (*APETALA3*), *PI* (*PISTILLATA*) o *AG* (*AGAMOUS*); que dirigen la formación de las diferentes partes florales. Los genes que dan identidad a los órganos son aquellos cuyas alteraciones producen mutaciones homeóticas (Koornneef et al., 1998; Simpson et al., 1999; Theissen et al. 2000).

C. El desarrollo reproductivo está íntimamente relacionado con el desarrollo vegetativo

Los estudios recientes de la morfología floral y de desarrollo vegetal en general se ubican cada vez más en un contexto evolutivo, y están dominados por análisis genéticos y moleculares de las vías de desarrollo que dan lugar a las inflorescencias y a la morfogénesis floral (Yanofsky, 1995. Weigel, 1995). De la integración de todos estos estudios se ha logrado echar solo un pequeño vistazo a la compleja red de interacciones genéticas que dan lugar al desarrollo floral (Blázquez, 2000; Mendoza,

et al., 1999), y se ha visto que éste debe entenderse en términos de la interacción de eventos en las diferentes fases del desarrollo y con el ambiente, pues los diversos aspectos del desarrollo (embrionario, vegetativo) tendrán una profunda influencia en el adecuado desarrollo reproductivo (ver figura 2).

La floración y desarrollo floral implica un intrincado y complejo proceso de desarrollo y morfogénesis que responde ampliamente a factores ambientales como temperatura o condiciones de luz, y además, es un proceso que está íntimamente relacionado y coordinado con el desarrollo vegetativo de la planta (Simpson et al., 1999; Koornneef et al. 1998). El tiempo de transición a la floración esta determinado por la interacción entre los factores internos que hacen que la planta este en un estadio competente de desarrollo y entre los factores ambientales que favorecerán la floración en condiciones que promuevan el éxito reproductivo (Simpson et al., 1999; Koornneef et al. 1998). Tanto los factores internos como los ambientales serán percibidos por las células de la planta a través de lo que se conoce como vías de señalización o de transducción de señales. Dicho proceso se llevará a cabo en las estructuras vegetativas de la planta, en especial en el meristemo vegetativo del tallo (Howell, 1998), y es en esta fase del desarrollo en la cual se iniciarán los procesos que posteriormente serán determinantes del tiempo de floración. Por ejemplo, eventos que afectan el tiempo de floración como la longitud del día o la vernalización son percibidos en las hojas o en el ápice del tallo (Lang, 1965, Napp-Zinn, 1987, en Simpson et al., 1999). Además, la transición de fase juvenil a fase vegetativa es importante por que solo los meristemos vegetativos maduros serán competentes a ser inducidos para floración (Telfer y Poeting, 1998). Como veremos más adelante, los meristemos vegetativos tienen un crecimiento indeterminado, pero cuando pasan a ser meristemos florales adquieren crecimiento determinado, y esta transición implica cambios en la condición meristemática vegetativa inicial (Mizukami y Ma 1997, Howell, 1998).

A pesar de todos los esfuerzos, las vías de señalización que dan lugar a la activación de la floración y la consecuente organogénesis floral en las plantas permanecen solo parcialmente conocidas. Se han reportado varios genes correlacionados con diversos factores, como el fotoperiodo o la percepción de hormonas y factores de crecimiento que influyen tanto el crecimiento como la determinación de la fase reproductiva de las plantas, sin embargo, permanecen sin elucidarse las interacciones entre las vías de transducción de señales y la acción de los factores de transcripción que subyacen el desarrollo vegetal.

D. El modelo ABC para el desarrollo floral y los genes MADS-Box

En ciertas plantas mutantes, la identidad de algunos órganos florales cambia, y se pueden observar en ellas órganos bien desarrollados pero en el lugar equivocado (como sépalos en lugar de estambres o meristemas en la superficie de las hojas). Esto se conoce como el fenómeno de *homeosis*. A partir del análisis de mutantes florales homeóticas se infirió un modelo simple y elegante de desarrollo floral llamado el **modelo ABC** (Coen y Meyerowitz, 1991), que provee de una explicación fenomenológica para el desarrollo.

Este modelo establece que hay tres clases de genes homeóticos que determinan la identidad de los órganos florales: los genes de clase A, B y C (Howell, 1998) (Figura 3). La sola expresión de genes A (como *APETALA 1* y *2* en *A. thaliana* o *SQUAMOSA* en *A. majus*) en el primer verticilo determinará la formación de sépalos. La expresión de genes A más la expresión de genes B (como *APETALA 3* y *PISTILLATA* en *A. thaliana* o *DEFICIENS* y *GLOBOSA* en *A. majus*) en el segundo verticilo determinará la formación de pétalos. La combinación de la expresión de los genes clase B más genes clase C (*AGAMOUS* en *A. thaliana* y *PLENA* en *A. majus*) en el tercer verticilo determinará la formación de estambres, y la sola expresión de los genes clase C en el cuarto verticilo determinará el desarrollo de carpelos (Weigel y Meyerowitz, 1994) (fig.3). Además, el modelo propone que los genes de función A y C se regulan unos a otros negativamente y que la función B esta restringida al segundo y tercer verticilo independientemente de las funciones A y C (Weigel y Meyerowitz, 1994; Theissen et al. 2000).

El grupo de secuencias genéticas relacionadas que comprende a la mayoría de los loci florales homeóticos como los que hemos mencionado pertenece a la familia multigénica de los **MADS-Box**, que codifican para factores de transcripción (Shore & Sharrocks, 1995). El nombre de la familia deriva de las iniciales de sus cuatro genes miembros fundadores: *MCM1* proveniente de *Saccharomyces sp.* (Jarvis et al. 1989), *AGAMOUS* de *Arabidopsis thaliana* (Yanofsky et. al. 1990), *DEFICIENS* de *Antirrhinum majus* (Sommer et. al. 1990) y *SRF* del humano (Norman et al. 1988). Los genes **MADS-Box** tienen una amplia distribución taxonómica, participando en diversas funciones, por ejemplo; actuando como reguladores de muchos aspectos del crecimiento celular, división y especialización celular (*MCM1*) en levadura; como represores en el control del metabolismo de arginina (*AGR80*) también en levadura; o el desarrollo del músculo cardiaco (*SRF*) en animales (Davies y Schwarz-Sommer, 1994; Alvarez-Buylla, et al. 2000). De cualquier manera, el común denominador en cuanto a las funciones de estos genes es que todos, de alguna

manera tienen que ver con el control del desarrollo o la diferenciación celular (Theissen y Saedler, 1995).

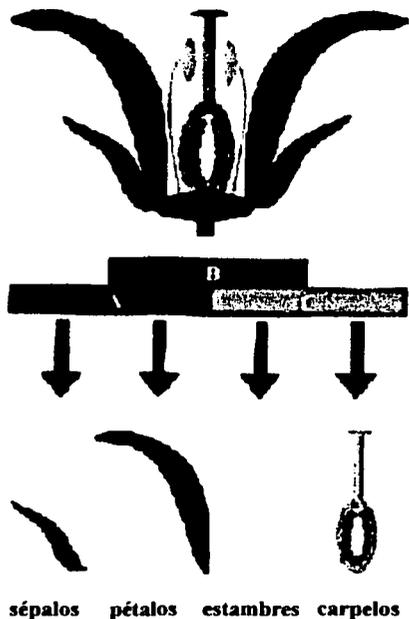


Figura 3. Representación del modelo ABC del desarrollo floral. En color negro se muestran los genes tipo A que determinan identidad de sépalos; en color púrpura se muestran los genes y actividad tipo B, que junto con los genes tipo C dan identidad a estambres y junto con los genes tipo A dan identidad a pétalos (púrpura); por último en color rojo se muestran los genes tipo C, que dan identidad a carpelos y que junto con los genes tipo B dan identidad a estambres (amarillo). Figura tomada de: http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e28_2/abcmodel.html

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La mayoría de las proteínas codificadas por genes MADS de plantas poseen una estructura estereotípica denominada MIKC (Figura 4); con un dominio de unión a DNA altamente conservado en la parte amino-terminal, de aproximadamente 57 aminoácidos, denominado **dominio MADS**, o **caja MADS**, que da nombre a la familia. Además, estas proteínas poseen un **dominio K** moderadamente conservado en la parte central, en dirección 3' con respecto al dominio MADS formando una estructura de rizo enrollado, la cual puede ser importante para llevar a cabo interacciones con otras proteínas que también lo contengan, promoviendo dimerización (Davies y Schwarz-Sommer, 1994). El dominio K no se encuentra presente en ninguna proteína MADS de animales u hongos conocida hasta el momento (Theissen, 2000). El dominio K y el dominio MADS se encuentran separados por una región de secuencia muy variable denominada **dominio I** ("Intervening") o **L** ("Linker") de aproximadamente 30 aminoácidos, aunque la longitud es variable. Se ha demostrado en algunas proteínas MADS de Arabidopsis que el dominio I constituye un determinante molecular para la formación selectiva

de dímeros de unión a DNA (Riechmann y Meyerowitz, 1997). Además, poseen una región carboxilo-terminal denominada dominio C, muy pobremente conservada, que puede funcionar como dominio de transactivación (Alvarez-Buylla et al., 2000; Jack, 2000; Theissen et al., 2000, Purugganan et al., 1997). Aunque el dominio MADS es el mayor determinante de la unión al DNA, también lleva a cabo funciones de dimerización y de unión a factores accesorios (Shore & Sharrocks, 1995).

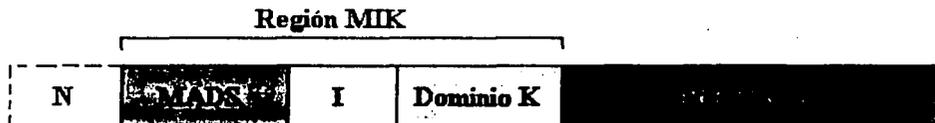


Figura 4. Estructura de dominios típica de los genes MADS-Box tipo MIK en plantas.

E. AGAMOUS: Desarrollo carpelar y determinación meristemática

Las flores son, morfológicamente, las partes más complicadas de las plantas. A diferencia de los órganos sencillos como las hojas, raíces o tallos, las flores son estructuras compuestas de un cierto número de órganos arreglados en un patrón determinado (Endress, 2001). Una flor es un brote **determinado** o con crecimiento limitado que alberga esporófilos (Raven, 1992). El nombre (de las plantas con flores) "angiosperma" deriva del griego *angeion*, que significa "vasija", y *sperma*, que significa "semilla". La estructura definitoria de la flor es el **carpelo**- la "vasija", que contiene los óvulos que se desarrollarán en semillas después de la fertilización (Raven, 1992). La innovación clave más prominente en la filogenia de las angiospermas fue la aparición de carpelos (Endress, 2001).

Las bases genéticas del desarrollo carpelar, así como las de los demás órganos florales, han sido ampliamente estudiadas. Una de las primeras y más importantes mutantes encontradas en *Arabidopsis* con carpelos afectados fue *agamous*. Las mutaciones en el gen *AGAMOUS* resultan en un fenotipo general de "flores dentro de flores", con ausencia de estambres y carpelos (Yanofsky et al., 1990). Los seis estambres de la flor tipo silvestre en *Arabidopsis* son reemplazados por seis pétalos, y los carpelos son reemplazados por una nueva flor; de manera tal que las flores

consisten en diez pétalos (cuatro normales y seis en el lugar donde normalmente ocurren los estambres), dentro de cuatro sépalos, y dentro de los pétalos se encuentran nuevamente cuatro sépalos y diez pétalos (Yanofsky et al., 1990) (Fig.5). Este patrón se repite a sí mismo y la flor resultante consiste en más de 70 órganos. (Yanofsky et al., 1990). *AGAMOUS*, un gen *MADS-Box* de identidad meristemática y de identidad de órganos es el único gen de clase C encontrado hasta ahora en *Arabidopsis*. Este gen no solo confiere identidad al carpelo, también junto con los genes clase B confiere identidad a los estambres. Además es importante notar que en las mutantes *agamous* la determinación del meristemo floral se pierde dando lugar a flores indeterminadas que consisten en muchos órganos, todos los cuales son sépalos y pétalos, lo que habla del papel que *AGAMOUS* tiene en la determinación del crecimiento del meristemo floral (Mizukami y Ma, 1997). Esta indeterminancia del meristemo floral ocurre de manera independiente de la diferenciación del gineceo (Mizukami y Ma, 1995). Una función más de *AGAMOUS* es que reprime a los genes de clase A como *APETALA1* (*AP1*) en los verticilos 3 y 4 (Gustafson-Brown et al., 1994).

Las vías de regulación de *AG* y las redes de interacciones en que participa están siendo ampliamente estudiadas. Por ejemplo, se sabe que *AG* es activado durante los estadios tempranos del desarrollo por los genes *LEAFY* y *WUSCHEL* (Busch et al., 1999), además de que comparte funciones con otros genes (se discute más adelante); sin embargo, se sabe muy poco acerca de otros genes que puedan ser activados o reprimidos por *AGAMOUS* (Jack, 2002).

Los métodos convencionales de búsqueda de mutantes específicos para estos genes han resultado en el hallazgo de fenotipos con defectos dramáticos en la determinación floral o en el desarrollo de estambres y carpelos, pero todos han resultado ser producto de mutaciones en alelos de *ag* (Jack, 2002). El impedimento de encontrar mutantes florales regulados por *AG* puede deberse a que esta característica (desarrollo adecuado del carpelo) tan trascendente está sujeta a redundancia funcional, a que las mutaciones resultan letales, o a que los genes que están regulados por *AG* son importantes solo para un subconjunto de funciones, como la especificación de tejidos en el carpelo, pero no tienen ninguna función en el desarrollo de estambres, en la determinación del meristemo floral o en la represión de los genes clase A (Jack, T. 2002).

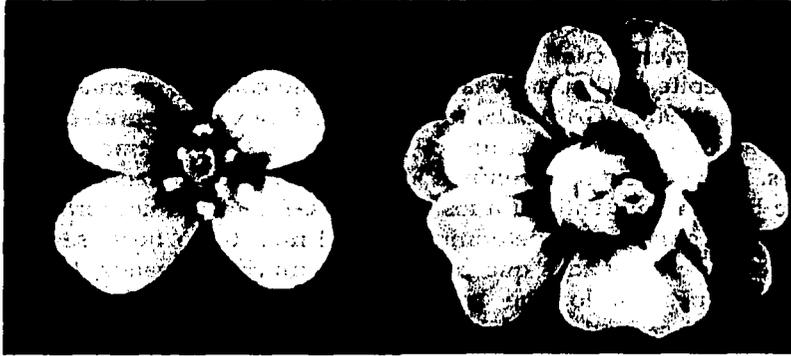


Figura 5. Flor de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (izquierda) y flor de la mutante *agamous* (derecha)

F. AGAMOUS no actúa solo en el desarrollo carpelar y la determinación meristemática

A pesar de la importancia del gen *AGAMOUS* en la determinación del meristemo floral (es decir, para que éste no crezca indefinidamente) se han encontrado muchos más loci que intervienen en este proceso. Dentro de la ruta de regulación de *AGAMOUS* se encuentran dos genes importantes mencionados anteriormente. El gen *LEAFY* (*LFY*) coopera junto con *WUSCHEL* (*WUS*) para inducir la expresión de *AG* en el meristemo floral (Lenhard et al., 2001). Las dos proteínas se unen independientemente a secuencias adyacentes en regiones regulatorias contenidas en el segundo intrón de *AG*, que son regiones importantes para su activación (Sieburth y Meyerowitz, 1997). Más específicamente, la función de *WUS*, dependiente de *LFY*, es la activación restringida espacialmente de *AG*, siendo que *WUS* y *AG* tienen funciones antagónicas en el desarrollo, pues las flores de mutantes *wus* terminan prematuramente mientras que las flores de mutantes *ag* continúan produciendo órganos. Además, en las mutantes *ag* se puede encontrar expresión de *WUS* al centro de las flores, lo que indica que el papel de la regulación de la determinación meristemática de *AG* se debe a que este gen regula negativamente a *WUS* antes de la formación del carpelo, lo cual previene que el meristemo floral crezca indefinidamente (Fletcher, 2002), y da lugar a una retroalimentación en la regulación entre ambos genes.

Otros genes importantes para la regulación del desarrollo y determinación meristemática son los loci *CLAVATA 1-3*, que promueven la incorporación de células a primordios de órganos en el meristemo; y los genes *ZWILLE* y *SHOOT*

MERISTEM-LESS, que promueven la identidad de las células propias de cada primordio (Doerner, 2000). Las mutantes *clv1-3* tienen fenotipos muy similares (meristemas más grandes y mayor número de primordios de órganos con aparente pérdida de la filotaxia) y con su estudio se logró elucidar la llamada vía de transducción de señales de *CLAVATA* (Fletcher, 2002; Doerner, 2000), que se requiere para la preservación correcta del reservorio de células en la zona central del meristemo apical del tallo. Juntos, los tres loci de *CLV* codifican para componentes clave de esta vía de transducción de señales. Tanto *CLV1* como *CLV2* codifican para proteínas receptoras con dominios LRR (ver antecedentes). Las mutaciones de pérdida de función en los genes *CLV1*, *CLV2* o *CLV3* provocan el agrandamiento progresivo del tallo y de los meristemas florales a lo largo del desarrollo, lo cual resulta en una forma muy alargada, con incremento en el número de primordios de órganos, aparente pérdida de la filotaxia y carpelos supernumerarios (Doerner, 2000). La acumulación de células meristemáticas en las mutantes *clv* indica que la vía de transducción de señales de *CLV1-3* regula la actividad y el tamaño de la población celular en el meristemo, controlando espacialmente el dominio de expresión de *WUSCHEL* (las mutantes *wus* son incapaces de mantener la población de células meristemáticas, lo que produce que el meristemo y el crecimiento termine rápidamente) (Fletcher, 2002; Doerner, 2000).

A pesar de los grandes esfuerzos que llevaron a la elaboración de la hipótesis de vía de transducción de señales de *CLAVATA* y de *AGAMOUS*, se han identificado muchos más genes que intervienen en el proceso de desarrollo carpelar o determinación meristemática independientemente de los que participan en las vías mencionadas. Por ejemplo, en las mutantes de los genes *CRABS CLAW* y *SPATULA* el gineceo presenta alteraciones notables (Alvarez y Smyth, 1999), lo cual indica que estos genes tienen un papel en el desarrollo carpelar paralelo a *AGAMOUS*. Otro ejemplo es el gen *LEUNIG*, cuyas mutaciones producen un fenotipo de sépalos transformados en estructuras estaminoides o carpeloides y pétalos estaminoides o ausentes, además de que este gen regula negativamente la expresión de *AGAMOUS* en los sépalos y pétalos (Liu y Meyerowitz, 1995; Conner y Liu, 2000).

II. Antecedentes

Vías de transducción de señales. FLOR1 y las LRR.

Las interacciones y las redes regulatorias en las que actúan los genes MADS-Box son complejas y aun se conocen poco. Las secuencias de genes MADS-Box codifican para **factores de transcripción**, es decir, son proteínas de unión al DNA funcionando como reguladores de la transcripción. Se han hecho análisis que demuestran que las cajas MADS aisladas se unen a elementos promotores en el DNA que contienen el motivo CARG, con una secuencia consenso $CC(A/T)_6GG$ (Howell, 1988). Los genes que contienen esta secuencia en su región promotora probablemente estén regulados por genes MADS, sin embargo, es posible que haya otros sitios diferentes de reconocimiento. Además, diversos estudios han demostrado que las proteínas MADS interactúan unas con otras formando dímeros tanto *in vitro* (Howell, 1998) como *in vivo* (Immink et al., 2002), preferentemente con los genes MADS de su misma clase (A, B, C etc.) y esta dimerización parece ser esencial para la localización nuclear de estos factores de transcripción (Immink et al., 2002) y para su interacción con el DNA.

A pesar de que las proteínas MADS se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros, estudios con proteínas MADS-Box de humano y levadura han mostrado que también pueden formar otros complejos con una variedad de diferentes proteínas no relacionadas y reclutar estas proteínas en sus sitios de unión (Davies y Schwarz-Sommer, 1994). En plantas este tipo de interacciones no ha sido estudiado.

En el Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Desarrollo en Plantas del Instituto de Ecología de la UNAM (IE-UNAM) se inició un proyecto encaminado a explorar las interacciones de proteínas con el dominio MADS con otro tipo de proteínas que posiblemente participan en la señalización. Esto podría representar una buena aproximación al entendimiento de la relación entre vías de transducción de señales y la regulación de la expresión y función de los genes MADS-box, y la búsqueda de la relación que existe entre los dos factores determinantes del desarrollo como son los factores de transcripción y los componentes de las vías de transducción de señales. El presente trabajo de tesis es en realidad una breve contribución a este proyecto.

A. La proteína FLOR1: una LRR que interactúa in vitro con el factor de transcripción AGAMOUS

Es sabida la importancia de la actividad de los genes MADS-box como reguladores transcripcionales, activando o reprimiendo la transcripción de sus genes blanco, pero se sabe muy poco acerca de los mecanismos de su regulación post-traduccional y de su interacción con proteínas accesorias no relacionadas con la familia MADS.

Con la motivación de encontrar y purificar proteínas que interactuarán con la proteína tipo MADS-Box AGAMOUS; en el laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Desarrollo se llevaron a cabo diversos experimentos con metodologías bioquímicas poco convencionales en el área de investigación en biología del desarrollo (Gamboa et al., 2001). Inicialmente se diseñó una columna de cromatografía por afinidad a partir de un fragmento derivado de la secuencia de aminoácidos de AGAMOUS (TTNRQVTFCK), encontrado típicamente en el dominio MADS de las proteínas MADS-Box, que contiene un posible sitio de reconocimiento por fosfatasa (RXVXT) con un sitio putativo de fosforilación (RXXT) (Gamboa et al., 2001). A partir de un extracto crudo de flores de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre se aislaron dos proteínas: **VSP1** (*vegetative storage protein 1*), una proteína específica de carpelos con actividad de fosfatasa ácida, y **FLOR1**, una proteína perteneciente a la familia de proteínas ricas en leucina o LRR (por las siglas de "leucine-rich repeat" en inglés) no reportada previamente (Figura 6). Esta proteína esta cercanamente relacionada a las proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa (PGIP, "polygalacturonase inhibitor proteins") y a proteínas cinasas receptoras descritas en diferentes plantas (Desiderio et al., 1997; Kajava y Deisenhofer, 1995; citados en Gamboa et al., 2001).

Para verificar la interacción *in vitro* de FLOR1 y VSP1 con AGAMOUS se llevaron a cabo otros experimentos como inmunoprecipitaciones, columnas de afinidad con GST-AGAMOUS y experimentos de doble híbrido. Este estudio representó el primer reporte de una interacción proteína-proteína entre un factor de transcripción MADS-Box y proteínas que no corresponden a la familia MADS en plantas (Gamboa et al., 2001).

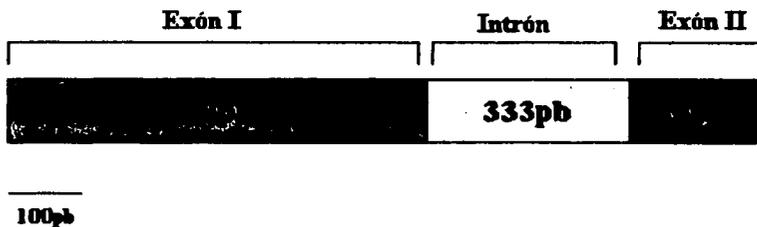


Figura 6. Estructura del gen *FLOR1*. La clonación y secuenciación del cDNA y gen completo *FLOR1* mostró que era un gen con dominios ricos en leucina de 1310 pb, con un único intrón de 333 pb.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

B. Localización subcelular de FLOR1 en Arabidopsis thaliana

El primer requisito para que la interacción de AGAMOUS con *FLOR1* pueda ser funcional *in vivo* es que estas proteínas se co-localicen tanto en los mismos tejidos y momentos del desarrollo como en los mismos compartimentos celulares. Para ello se realizaron experimentos encaminados a determinar la localización subcelular de *FLOR1* (Acevedo, F. comunicación personal).

Los experimentos de hibridación de mRNA *in situ* para caracterizar los patrones espacio-temporales de expresión de este gen demostraron que *FLOR1* se expresa de manera importante en los meristemos de inflorescencia del primer estadio; especialmente en los extremos del meristemo, donde se inician los primordios florales (Acevedo, F. comunicación personal). En meristemos florales más avanzados (estadios 7 y 8) la expresión de *FLOR1* se hace específica a primordios de estambres y gineceo. Más tarde en el desarrollo floral, cuando los primordios del tercer y cuarto verticilo se empiezan a diferenciar en estambres y carpelos respectivamente, el mRNA de *FLOR1* queda restringido a ciertos tipos celulares (estadios 10 y 11). En los estambres, la expresión del mRNA de *FLOR1* esta restringido a las anteras, sin incluir los granos de polen. La expresión en los primordios de los carpelos es uniforme; y para el estadio 11 *FLOR1* queda restringido a la placenta, el funículo y los integumentos internos y externos (Acevedo, F. comunicación personal).

Experimentos de inmunolocalización de la proteína *FLOR1* durante diferentes estadios del desarrollo floral mostraron que esta proteína esta uniformemente distribuida en el citoplasma de las células de los meristemos florales y de inflorescencia. Además, la localización subcelular se verificó por sobreexpresión de

la proteína quimérica FLOR1-GFP. La proteína se localizó intracelularmente, tanto en el citoplasma como en el núcleo en los carpelos. Tanto los patrones de expresión del mRNA de *FLOR1* como la localización de la proteína indican que esta presente en cualquier tejido con alta proliferación, sugiriendo que su actividad puede ser importante en el control de la actividad meristemática (Acevedo, F. comunicación personal). Los resultados arrojados por estos estudios sugieren una coincidencia en la expresión espacio-temporal de *AGAMOUS* y de *FLOR1*, y por lo tanto son consistentes con una posible interacción entre ambas proteínas *in vivo*.

FLOR1 también se expresa en el meristemo apical (Acevedo, F. omunicación personal) y en estadios tempranos del meristemo de inflorescencia, antes de que empiece la expresión de *AGAMOUS*; resultados que indican que *FLOR1* podría tener otra función en el meristemo apical no necesariamente relacionada con la posible interacción con *AGAMOUS*. Cabe mencionar que la columna de afinidad con la que se aisló y verificó la interacción *in vitro* de *FLOR1* con *AGAMOUS* fue diseñada con un péptido señal característico de las proteínas de la familia proteínas tipo MADS como *SOC1* y *AGL24* que también se expresan en el meristemo apical, y por tanto, es posible que la interacción de *FLOR1* no sea específica para *AGAMOUS*, y pueda interactuar con otras proteínas relacionadas.

C. Las proteínas ricas en leucina (LRR) y su importancia biológica

Las proteínas ricas en leucina (LRR) tienen secuencias con motivos de 20 a 29 residuos de largo repetidas en tándem. Estas secuencias incluyen un segmento conservado de 11 residuos con la secuencia consenso $LxxLxLxx^N/cxL$ (donde x puede ser cualquier aminoácido y las posiciones de L también pueden ser ocupadas por una valina, isoleucina o fenilalanina (Kobe y Kajava, 2001). La mayoría de estas proteínas se encuentran en eucariontes y parecen intervenir en procesos de reconocimiento proteína-proteína (Kobe y Kajava, 2001), proveyendo una red estructural que permite la formación de las interacciones.

Estas proteínas participan en muchos procesos biológicos importantes, como las interacciones hormona-receptor, inhibición enzimática, adhesión y transporte celular (Kobe y Kajava, 2001). Muchos estudios recientes han revelado que las LRR intervienen en el desarrollo temprano de mamíferos (Tong et al., 2000), en desarrollo neural (Mutai et al., 2000), en la regulación de la expresión génica (Linhof et al., 2001), en la morfología y dinámica del citoesqueleto (Xu et al., 1997), etc. En todos estos procesos, las LRR probablemente median interacciones proteína-proteína, a excepción de una LRR encontrada en zanahoria, la cual al parecer utiliza su estructura repetitiva para inhibir la cristalización del hielo

(Worrall et al., 1998). Se ha determinado la estructura cristalográfica de una LRR: la proteína inhibidora de la ribonucleasa (ribonuclease inhibitor, RI), y se ha visto que los motivos con elementos ricos en leucina repetidos en tándem corresponden a unidades estructurales que consisten de hebras β y hélices α , dispuestas paralelamente a un eje común. Esto resulta en una estructura no globular, en forma de herradura (Figura 7) con las hebras en β conformación paralelamente curvadas que delimitan la circunferencia interna de la herradura, mientras que las hélices α delimitan la circunferencia externa (Kajava, 1998). Esta forma de herradura determina que se facilite la interacción con otras proteínas.

Además de que las LRR proveen una red estructural ideal para las interacciones proteína-proteína, su estructura repetitiva puede ser benéfica en procesos en los que se requiere una rápida generación de nuevas variantes como la resistencia a enfermedades en plantas o la virulencia bacteriana (Jones y Jones, 1997; Evdokimov et al., 2001; Marino et al., 1999; citados en Kobe y Kajava, 2001), debido a que puede evolucionar más rápidamente (Kobe y Kajava, 2001).

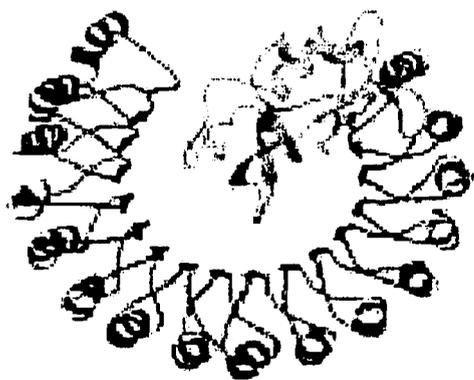


Figura 7. Dos diferentes vistas de la estructura 3D de la RI (Inhibidora de la Ribonucleasa de cerdo). La figura de la izquierda fue tomada de Kajava, A. 1998; la figura de la derecha corresponde a la imagen tomada de la base de datos de estructuras 3D de proteínas PDB (Protein Data Bank) de la RI. El número de acceso es 2BNH.

Las proteínas LRR constituyen una superfamilia de proteínas compuesta de al menos seis subfamilias (Kajava, 1998). Las proteínas LRR de plantas descritas hasta ahora están contenidas en dos de estas subfamilias, la subfamilia CC (LRR que contienen cisteína), que tienen diversas funciones pero comparten localización

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Listado de diferentes proteínas con LRRs encontradas en plantas, con información disponible acerca de sus sitios de expresión, posible función y/o papel biológico en la planta.

Proteína	Organismo	Información	Fuente
RLK3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Se expresa en raíces y hojas de roseta. Posible importancia en la señalización celular.	Walker, 1993.
RPS2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Se aisló, por medio de la infección de <i>Arabidopsis</i> con <i>Pseudomonas sp.</i> patógenas. Tiene marcadas similitudes con el producto del gen N de tabaco, que confiere resistencia al virus de mosaico.	Ausubel, et al. 1995
CLAVATA1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Es una cinasa receptora, lo que sugiere su papel en la transducción de señales. Mutaciones en este gen provocan acumulación de células indiferenciadas y consecuente crecimiento anormal de meristemas florales y del tallo, lo cual sugiere que esta asociada a la mantención del balance entre la proliferación y la diferenciación celular en dichos meristemas.	Clark, Williams y Meyerowitz, 1997
CLAVATA2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Regula desarrollo de meristemo y de órganos. Requerida para una acumulación normal de CLAVATA1 para adecuada transducción de señales extracelulares	Jeong, Trotschaud y Clark, 1999
RKF1-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RKF1 se expresa de manera importante en estambres, detectable en primordios florales tempranos durante el desarrollo de estambres. Presenta actividad cinasa <i>in vitro</i> . RKF2 y 3 se presentan en bajos niveles en todos los órganos	Takahashi, et al. 1998
BRI1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desarrollo de la planta. Interacción con los brasinoesteroides (BRs), reguladores de la promoción del crecimiento. Mutaciones en este gen tienen fenotipo "enano" y no responden a la aplicación exógena de brasinoesteroides.	Li & Chory, 1997. Friedrichsen y Chory, 2001.
ZmSERK1 y ZmSERK2	<i>Zea mays L.</i>	ZmSERK1 se expresa en tejidos reproductivos femeninos y masculinos, con expresión preferencial en microsporas. ZmSERK2 se expresa más o menos uniformemente en todos los tejidos.	Baduino, 2001
SERK	<i>Daucus carota</i> (zanahoria)	("Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase"), expresada en células embrionarias. Posible papel en la transducción de señales presentes en el medio de cultivo y activa el desarrollo embrionario.	Schmidt et al., 1997 en Baduino et al. 2001
carrot- AFP	<i>Daucus carota</i> (zanahoria)	Proteína anticongelante, inhibe recristalización de hielo.	Worrall, et al. 1998
-	<i>Daucus carota</i> (zanahoria)	Diferenciación celular y proliferación en plantas. Interacción <i>in vitro</i> con el péptido sulfato-fitosulfocina PSK.	Matsubayashi, et al. 2002.
EILP	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cercanamente relacionado con los genes Cf de tomate; posible intervención en sistemas de detección de patógenos; resistencia a no-hospederos en tabaco	Takemoto, et al. 2000
SLRR	<i>Sorghum vulgare</i> (sorgo)	Con homología significativa con las cinasas receptoras RLK5 y TMK1 (genes de resistencia a enfermedades) de <i>Arabidopsis thaliana</i> que tienen dominios de unión extracelular. El mRNA se acumula rápidamente en mesófilo y hojas juveniles, y durante la postinoculación con hongos.	Hipskind, Noeholson y Goldsbrough, 1996
LRP	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Expresada particularmente en ciertos tipos celulares como estele, fibras del floema, parénquima del protodema y xilema secundario. Dentro del contexto de resistencia a enfermedades, es procesado proteolíticamente hacia pesos moleculares menores mediante proteasas extracelulares inducidas por hospederos. Posiblemente media eventos de reconocimiento e interacción en la matriz extracelular, bajo condiciones normales o relacionadas a patógeno.	Tornero et al., 1996.
<i>inrpk1</i>	<i>Ipomea (Pharbitis) nil</i> Roth. Cv.	Asociado a floración por inducción en fotoperiodo de días cortos. Cercanamente relacionada a ERECTA. Con solo un intrón, este es removido eficientemente excepto en cotiledones y hojas de plantas en estado vegetativo, lo que hace ineficiente su actividad cinasa.	Bassett et al., 2000
FIL2	<i>Antirrhinum majus</i>	Se expresa débilmente en pétalos y de manera más abundante en órganos reproductivos. Es activo en filamentos y anteras de estambres, y en estigma y tejido conductor del carpelo. Posible componente de mecanismos de señalización celular. Su expresión se ve afectada en las mutantes del factor de transcripción homeótico DEFICIENS	Steinmayr et al., 1994
Xa21	<i>Oryza sativa</i>	Cinasa. Actúa como receptor de ligandos producidos en respuesta a patógenos. Una vez unida al ligando se autofosforila por mecanismos intramoleculares. La autofosforilación intramolecular es particularmente importante para la activación del reconocimiento de factores de crecimiento por algunas cinasas receptoras en animales.	Guo-Zhen et al., 2002
Pib	<i>Oryza sativa</i>	Gen de resistencia a la plaga llamada "maldición" del arroz. Miembro de la clase NBS-LRR de genes de resistencia a enfermedades en plantas. Su expresión se induce en condiciones ambientales alteradas como alteraciones en temperatura y oscuridad.	Wang et al., 1999
RPR1	<i>Oryza sativa</i>	Similar estructuralmente a genes conocidos de resistencia. Puede estar regulado por tratamiento con inductores químicos de resistencia sistémica adquirida (agroquímicos) o por inoculación con patógenos.	Sakamoto, et al. 1999

intracelular, y la subfamilia PS (LRR específicas de plantas), que actúan en las vías de transducción de señales y están localizadas en la membrana externa de las células (Kajava, 1998).

En plantas se ha visto que las proteínas con fragmentos ricos en leucina participan en procesos muy diferentes (Tabla 1), como el desarrollo, la resistencia a enfermedades o la auto-incompatibilidad, presumiblemente implicadas en las vías de señalización celular y transducción de señales. Se ha visto que muchas proteínas PS-LRR de plantas tienen actividad de cinasas, y que además de estar involucradas en interacciones proteína-proteína, también juegan un papel crucial en las vías de transducción de señales extracelulares (Baduino et al., 2001). La mayoría de los genes de resistencia a enfermedades en plantas codifican para un dominio de unión a nucleótidos (NBS o "nucleotide binding site") y un dominio rico en leucina (LRR); y algunos de ellos en su extremo N terminal tienen homología con los genes Toll (Pan et al., 2000), que son esenciales para la ontogénesis y resistencia anti-microbiana en *Drosophila*. Los ortólogos de Toll han sido clonados en vertebrados, y fueron llamados TLRs, que en humanos están involucrados en la herencia del sistema inmune (Muzio et al., 2000).

FLOR1 pertenece a la familia de las PS-LRR (Gamboa et al., 2001), grupo que incluye a las cinasas CLAVATA1 y ERECTA, que median interacciones proteína-proteína y señalización intercelular (Clark et al., 1997; Torii et al., 1996). La localización subcelular de FLOR1 muestra un patrón contrastante con la localización de todas las PS-LRR descritas hasta ahora, que muestran una localización extracelular.

D. Búsqueda de la mutante *flor1*

Los estudios en genética clásica aplicaban una aproximación directa para el estudio de las funciones de los genes, es decir, comenzando a partir de un organismo con fenotipo mutante se hacía la pregunta ¿cuál es el genotipo?; ¿cuál es la secuencia del gen cuya mutación da lugar al fenotipo que se observa?. Con el advenimiento de novedosas técnicas de análisis genético molecular surge la aproximación inversa, la cual inicia con la secuencia de un gen de interés al cual se introduce una mutación para posteriormente hacer la pregunta ¿cuál es el cambio resultante en el fenotipo?. Los *knockouts* de genes o mutaciones nulas proveen una ruta directa para determinar la función del producto de un gen.

Existen diferentes maneras de implementar mutagénesis dirigidas a genes específicos. La mutagénesis por inserción es una opción que se está utilizando ampliamente, ya que consiste en la inserción de una secuencia de DNA externa

conocida al gen de interés. De esta manera el DNA externo no solo actúa alterando la expresión del gen de interés sino que además actúa como marcador para la subsecuente búsqueda e identificación de la mutación (Krysan et al., 1999). En *Arabidopsis*, esto se puede hacer por medio ya sea de elementos transponibles (trasposones) o por inserción de T-DNA. Una ventaja de utilizar inserciones de T-DNA en lugar de trasposones es que las inserciones de T-DNA no se transponen (no se "mueven") después de su integración en el genoma, por lo que son química y físicamente más estables a lo largo de las generaciones (Krysan et al., 1999).

Las bacterias de suelo *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* son capaces de transferir unidades discretas de DNA, denominado T-DNA por el nombre en inglés del plásmido Ti o "tumor-inducing plasmid", en el genoma de varias gimnospermas y angiospermas (Glick y Thompson, 1993). Este plásmido es responsable de la formación de tumores en las plantas, lo que ocurre cuando *Agrobacterium sp.* las infecta a través de pequeñas heridas y llagaduras, pues la bacteria es capaz de transmitir, insertar y expresar un segmento particular de DNA en el genoma. Los análisis genéticos del plásmido Ti revelan dos regiones esenciales para la generación de los tumores: pequeñas secuencias flanqueantes (llamadas T-DNA propiamente) y la región *vir* o de virulencia (Shaw, 1988). Las secuencias de la región *vir* son esenciales para la transferencia e integración del T-DNA. Ya integrado el T-DNA en el genoma de la planta codifica productos involucrados en la síntesis de fitohormonas como auxinas, ácido indolacético y citocininas, y es la sobreproducción de estas hormonas la que provoca la tumoración (Shaw, 1988). Los plásmidos Ti son manipulados por ingeniería genética primero en *E. coli*, para colocar el DNA con la secuencia de interés que se desea introducir a la planta en lugar de los genes de tumoración. Posteriormente las construcciones de interés son transferidas por electroporación o choque-térmico a *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas resultantes de *A. tumefaciens* son utilizadas para llevar a cabo la transformación.

Estas novedosas técnicas desarrolladas para la inserción de T-DNA mediada por *A. tumefaciens* han permitido crear bancos de varios cientos o miles de líneas de *Arabidopsis thaliana* con inserciones diferentes. Cálculos estadísticos han permitido establecer la cantidad aproximada de líneas necesarias para la saturación del genoma de *Arabidopsis* con inserciones de T-DNA (Krysan et al., 1999), así que la probabilidad de encontrar ahí el gen de interés mutado es alta.

Por estas razones, para llevar a cabo un análisis de su función, en el Laboratorio de Genética Molecular y Desarrollo en Plantas del IE-UNAM se decidió hacer la búsqueda de una mutante para el gen *FLOR1* en el banco de líneas mutantes por inserción de T-DNA de *A. thaliana* del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, o UWBC por sus siglas en inglés (<http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis/ArabidopsisH>

ome.asp). El método de búsqueda desarrollado por este centro consiste en una serie de rondas de reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con DNA extraído de grupos de líneas mutantes, de manera tal que se van descartando grupos de líneas (ya que el banco comprende 60,480 líneas diferentes) hasta encontrar el grupo o *pool* que contenga la línea deseada. Los pares de oligos utilizados para estas amplificaciones se muestran en la Tabla 2. Al final de una serie de reacciones el UWBC envía al solicitante un *pool* o grupo de semillas agrupado en 25 tubos conteniendo semillas de 9 líneas diferentes cada uno. El investigador solicitante lleva a cabo entonces otra ronda de búsqueda por PCR en su laboratorio, con los mismos pares de oligos o *primers*, de tal manera que las reacciones con resultado positivo correspondan a las líneas con la presencia de la secuencia de T-DNA en el gen de interés.

<p>Oligo específico <i>forward</i> o sentido del gen de interés Para FLOR1 se diseñó el oligo AG21R, con secuencia: 5' CCTCAAAGCATCCACACATAATC ACGATG 3' (ver Materiales y Métodos)</p>	+	<p>Oligo <i>reverse</i> o antisentido para la secuencia de T-DNA (extremo izquierdo) Se utilizó el oligo con secuencia provista por el UWBC J202, con secuencia: 5' CATTITATAATAACGCTGCGGACATCTA C 3' y el oligo JL270, con secuencia 5' TTICTCCATATTGACCATCATACTCATT G 3'</p>
<p>Oligo específico <i>reverse</i> o antisentido del gen de interés Para FLOR1 se diseñó el oligo AG20F, con secuencia 5' CTCGAGGTGTAGTTTAGTCAGTGCTG GTG 3' (ver Materiales y Métodos)</p>	+	<p>Oligo <i>forward</i> o sentido para la secuencia de T-DNA (extremo derecho) Se diseñó el oligo OLIGO31, con secuencia: 5'GGTGGGAAAGCGCGTTAC AA 3' (ver Materiales y Métodos)</p>

Tabla 2. Pares de oligos utilizados para la búsqueda de la mutante para FLOR1 (un fragmento del gen de interés (*fl1*) más un fragmento del T-DNA) en DNA genómico extraído de varias líneas mutantes (por inserción de T-DNA) de la línea 12.

Desde las primeras rondas de PCR es posible mandar a secuenciar las bandas positivas y localizar de esta manera la inserción dentro de la secuencia del gen de interés. Con este método se aisló la línea 12 con resultados positivos para la inserción de T-DNA por PCR y por hibridaciones tipo Southern. Esta línea destacó por observaciones preliminares de su fenotipo (ver discusión). Por posterior secuenciación de los productos de PCR se ubicó la inserción del T-DNA en la base número 208 del intrón del gen (Figura 9).

III. Objetivos

Objetivo general:

Hacer una caracterización molecular preliminar de las plantas seleccionadas de la línea 12 (ver Material Biológico), encontrada previamente como mutante por inserción de T-DNA para *FLOR1*. Hacer un análisis funcional de esta mutante por medio de un análisis de su crecimiento en diferentes condiciones de iluminación y elaborar herramientas moleculares para posteriores experimentos y análisis.

Objetivos particulares:

A. Corroborar la mutación en FLOR1 por inserción de T-DNA

Corroborar, por medio de la realización de reacciones de PCR; la presencia de la inserción de T-DNA en el gen *FLOR1* en las plantas de la líneas seleccionadas (ver Material Biológico en Materiales y Métodos).

B. Analizar la secuencia de mRNA de FLOR1 en las plantas mutantes

Como primer paso, determinar la presencia o ausencia del RNA mensajero en plantas mutantes por RT-PCR. Si el resultado es positivo y la mutante no es nula, entonces el objetivo es determinar el estado en el que se encuentra el RNA mensajero de *FLOR1* en las plantas mutantes por la obtención y análisis de su secuencia, también por medio de la técnica de RT-PCR y secuenciación.

C. Hacer una búsqueda de posibles motivos regulatorios en las secuencias promotora e intrónica

Por medio de métodos bioinformáticos, encontrar motivos presumiblemente regulatorios en la región promotora y en el intrón de la secuencia de DNA de *FLOR1* que puedan estar implicados en la regulación de la transcripción de este gen.

D. Analizar el fenotipo mutante. Comparar su crecimiento y desarrollo en diferentes condiciones de iluminación

Hacer un análisis comparativo de diferentes características morfológicas del mutante *flor1*. Con el objetivo de determinar si las diferencias en las condiciones de luz afectan considerablemente el crecimiento de las plantas mutantes para *FLOR1* (*flor1*) se llevará a cabo una comparación cuantitativa del crecimiento entre estas plantas crecidas en luz continua y las crecidas en fotoperiodo.

E. Construir plásmidos recombinantes

Para análisis posteriores de las plantas mutantes se requiere el desarrollo de herramientas moleculares que permitan experimentos de transformación de plantas y síntesis de sondas para análisis de hibridación.

Un objetivo de este trabajo es el diseño y construcción de plásmidos recombinantes con las siguientes secuencias:

- T-DNA

Que servirá posteriormente para la síntesis de sondas para experimentos tipo *southern-blot*.

- Secuencia de *FLOR1* completa, con región promotora e intrón

Que servirá para posteriores experimentos de transformación de plantas *flor1* de recuperación de fenotipo.

IV. Materiales y Métodos

Material Biológico

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Wassilewskija (WS) de la línea 12, que previamente habían resultado positivas para la inserción de T-DNA en el gen *FLOR1*. En particular se analizaron en este estudio las semillas obtenidas a partir de las plantas 12.19.5 y 12.8.7, es decir, la cuarta generación (G4) (Figura 8).

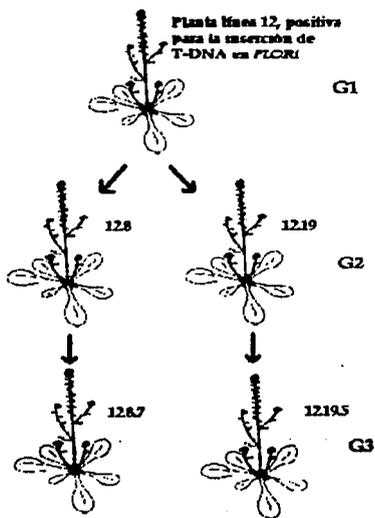
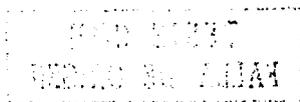


Figura 8. Diferentes generaciones de la línea 12. Para este estudio se seleccionó la línea 12 positiva para la inserción de T-DNA. Posteriormente se seleccionaron sus hijas núm. 8 y 19, es decir segunda generación (G2). De su descendencia se seleccionaron las hijas 8.7 y 19.5, es decir, tercera generación (G3). Para este estudio se utilizaron las semillas obtenidas a partir de estas plantas, es decir, la generación cuatro (G4).

Análisis previos (ver Antecedentes) revelaron que estas mutantes tienen la inserción de T-DNA ubicada a partir de la base 208 del intrón de *FLOR1*, con una longitud de 5, 938 pb (Figura 9). A partir de ahora llamaremos "mutantes *flor1*" a las plantas estudiadas.

Como control provisional se utilizaron plantas crecidas a partir de semillas obtenidas a las plantas 12.27 y 12.15, también *Arabidopsis thaliana* ecotipo Wassilewskija (WS) que resultaron negativas para la inserción de T-DNA en *FLOR1*.



A. Corroboración de la mutación en FLOR1 por inserción de T-DNA

Corroboración de la mutante

Para la corroboración de la inserción de T-DNA en las mutantes *flor1* se llevaron a cabo varias reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): los oligos utilizados fueron AG 21R (*upper primer*, instalado en la secuencia 5' no codificante de FLOR1), con secuencia 5' CCTCAAAGCATCCACACATAATCAGATG 3' en la misma reacción con el oligo JL-202 (amplifica la secuencia del extremo izquierdo o *left border* del T-DNA), con secuencia 5' CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC 3' o con el oligo JL-270 (también amplifica la secuencia del extremo izquierdo o *left border* del T-DNA), con secuencia 5' TTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTG 3'; ambas secuencias provistas por el UWBC. Además, se utilizó el oligo OLIGO31, con secuencia 5'GGTGGGAAAGCGCGTTACAA 3' (ver Antecedentes), para amplificar el extremo derecho o *right border* de la secuencia de T-DNA, y se probó con el oligo AG 20F

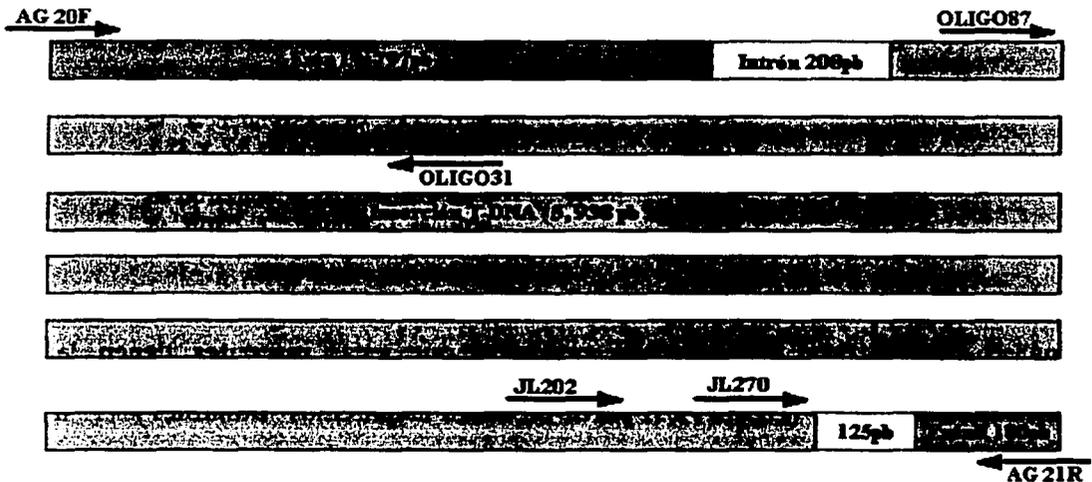


Figura 9. Localización de la inserción de T-DNA en el gen *FLOR1*. La inserción, de 5, 938 pb de largo se encuentra en el medio del intrón del gen, en el sitio 1005 en dirección 5'-3'. La inserción va del sitio 209 al sitio 124 del intrón. Se indican los lugares aproximados donde se hibridan los oligos AG20F, AG21R, OLIGO31, OLIGO87, JL202 y JL270.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(*lower primer*, instalado en la secuencia 3' no codificante del gen *FLOR1*) con secuencia 5' CTCGAGGTGTAGTTTAGTCAGTGCTGGTG 3' en la misma reacción. Los oligos AG 21R y AG 20F (amplifican *FLOR1*) utilizados durante las primeras etapas del escrutinio fueron diseñados y provistos por la Dra. Alicia Gamboa del IE-UNAM. La Figura 9 muestra más claramente los sitios correspondientes a los oligos mencionados.

El DNA genómico fue extraído con el método de CTAB (*bromuro de hexadeciltrimetilamonio*, Apéndice I). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en una mezcla con volumen final de 50 μ l que contenía 10 mM Tris-HCL, pH 8.9 y 80 mM KCL (Buffer de PCR); 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), 10 nM de cada oligo (AG20F/JL270, AG21R/JL202), 10 ng de DNA, y 2.0 unidades de polimerasa de DNA Taq. Esta reacción fue sujeta a 35 ciclos de amplificación a temperaturas de 94°C-30'' (desnaturalización), 60°C-20'' (hibridación de oligos), 72°C-1'30'' (polimerización), seguidos de 5' a 72°C, por último se mantuvieron a 4°C. Los resultados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (Apéndice II).

B. Análisis de la secuencia de mRNA de FLOR1 en las plantas mutantes

RT-PCR

El análisis del mRNA puede dar un indicio de la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional. Para corroborar el estado del mRNA mensajero en las plantas mutantes se utilizó la técnica de RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Como primer paso se extrajo RNA total a partir de tejido floral de las plantas mutantes para el gen *FLOR1* por el método de TRIZOL (Apéndice IV) y se congeló a -80°C para su uso posterior. Este RNA se utilizó como templado para la síntesis de cDNA utilizando la enzima RT (siglas en inglés de la transcriptasa reversa) según el protocolo del "3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" de LifeTechnologies-GibcoBRL (Apéndice VII). Con el cDNA sintetizado se llevó a cabo la reacción de PCR para amplificar *FLOR1*. Los oligos utilizados fueron FA6R con secuencia 5' CTAGCCATGGACAAGCCTTAAGGGGAGTTC 3' y FA5F con secuencia 5' GGAATTCATGAGGCTCTTTGTTTCATCTC 3', que amplifican *FLOR1* y fueron diseñados por la Dra. Francisca Acevedo y provistos por la Dra. Gamboa. La reacción, con un volumen final de 50 μ l contenía 10 mM Tris-HCL, pH 8.9 y 80 mM KCL (Buffer de PCR); 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 10 nM de cada oligo (FA6R y FA5F), 10 ng de cDNA, y 2.0 unidades de polimerasa de DNA Taq. La reacción fue sujeta a 94°C por 5' para estabilización, y posteriormente a 35 ciclos de

amplificación a temperaturas de 94°C 30' (desnaturalización), 60°C 30' (alineación), 72°C 1' (polimerización), seguidos de una incubación final a 72°C por 5' y 10°C ∞. El resultado se corrió por electroforesis en un gel de agarosa 1%.

Las bandas resultantes de la amplificación fueron cortadas y colocadas en un tubo eppendorf. El DNA de estas bandas fué extraído del gel por el método de fibra de vidrio siliconizada (péndice III). Se hizo ligación con este fragmento (inserto) para introducirlo en el (plásmido) vector de clonación pGEMT-Easy (para explicación y protocolo completo ver Apéndice V) para su posterior secuenciación. La reacción de ligación contenía 1.5 µl de vector 50 ng/µl, 2.5 µl de buffer de ligación, 5 µl de inserto (presumiblemente cDNA de *FLOR1* sintetizado a partir de su mRNA), y 1 µl de ligasa; y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se hizo transformación de células competentes TOP-10 de *E.coli* con esta reacción (ver protocolo de transformación en el Apéndice V) y se seleccionaron las colonias transformantes por coloración y se cultivaron en medio LB líquido con carbenicilina (ver protocolo de transformación, Apéndice V). Se extrajo el plásmido por el método de buffer STET (ver método de extracción de plásmido en el Apéndice VI). Se corroboró la ligación por digestión del plásmido con una reacción con volumen final de 20 µl que contenía 4 µl de solución de plásmido recombinante, 13 µl de agua bidestilada, 1 µl de enzima EcoRI y 2 µl de buffer específico para la enzima (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.025 % Tritón X-100 pH 7.5).

Una vez seleccionadas las clonas positivas tanto por coloración como por digestión, se extrajo y purificó el plásmido con el kit para minipreps de QUIAGEN y se mandaron secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

Con la secuencia se hicieron varios procesos de alineación pareada con ClustalX utilizando el programa MacVector contra la secuencia completa del gen *FLOR1* tipo silvestre (GeneBank, número de acceso T23B7.10), y contra la secuencia de mRNA de *FLOR1* tipo silvestre (GeneBank, número de acceso BAB01964.1).

C. Búsqueda de posibles motivos regulatorios en las secuencias promotora e intrónica

La región promotora del gen *FLOR1* se obtuvo de la base de datos de GenBank, y como se mencionó anteriormente consiste de 613pb. Se consideró como región promotora aquella entre el codón de término del gen anterior a *FLOR1* y el codón de inicio de transcripción de *FLOR1*. La región intrónica también fue obtenida de GenBank y corroborada con la secuencia genómica y los datos obtenidos en el laboratorio (Gamboa et al., 2000).

Para la búsqueda de motivos conservados se utilizó el programa RSA-Tools (<http://embnet.cifn.unam.mx/rsa-tools/>), que busca secuencia por secuencia palabras cuya ocurrencia y probabilidad sea mucho mayor en estas regiones en comparación con la frecuencia esperada en las regiones no codificantes del genoma completo de *A. thaliana*. Posteriormente, se hizo una búsqueda de motivos regulatorios en ambas secuencias (promotora e intrón) en la base de datos PLACE-Database (Higo et al. 1999) (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>), una base de datos de motivos regulatorios conocidos encontrados en regiones promotoras de genes en el DNA de plantas. Los motivos fueron extraídos de reportes publicados previamente en estudios en genes de plantas vasculares (Higo et al. 1999). Se hizo una comparación de los datos obtenidos por ambos métodos (RSA-Tools y PLACE-Database).

D. Análisis del fenotipo mutante. Comparación entre luz continua y fotoperiodo

Se utilizaron semillas de la línea 12 cuarta generación para asegurar homocigosis (ver Material Biológico). Las líneas 12.19.5 y 12.8.7 se tomaron en cuenta como dos repeticiones experimentales independientes para el análisis del fenotipo.

Se sembraron 18 macetas para fotoperiodo y 18 macetas para luz continua, aproximadamente cinco semillas en cada maceta. Tanto para fotoperiodo como para luz continua se sembraron 6 macetas con semillas línea 12.19.5 y 6 macetas con semillas 12.8.7. Las demás macetas se sembraron con controles (6 para fotoperiodo y 6 para luz continua). Como control provisional se utilizaron plantas de líneas que no presentaron la inserción de T-DNA en *FLOR1* durante la búsqueda de la mutante y que, por observaciones previas, se vio que no presentaban diferencias considerables entre sí, tanto en su desarrollo vegetativo como reproductivo. Se seleccionaron como controles las líneas 12.27 y 12.15. La carencia de fenotipo se reflejaba en que había un mismo fenotipo para todas las plantas de las líneas con resultados negativos.

Se utilizó sustrato MetroMix 2000 (Scotts Company) esterilizado, que contiene vermiculita para horticultura, musgo tipo *peat moss* de sphagnum canadiense, perlita de horticultura y arena lavada. Todos los ingredientes esterilizados.

La temperatura, tanto para luz continua como para fotoperiodo fue de 20-22°C, con radiación luminosa en los siguientes parámetros:

Cámara de luz-oscuridad

Densidad de Flujo Fotónico: 400 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{seg}$

Relación rojo/rojo lejano: 8.05

16 horas luz / 8 horas oscuridad.

Cámara de luz continua:

Densidad de Flujo Fotónico: 160 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{seg}$

Relación rojo/rojo lejano: 8.05

Dichos parámetros se midieron con un radiómetro SKR-100 (Skye instruments, Scotland) para R (a partir de 640 a 670 nm; pico a 660), FR (690 a 748 pico a 730) y R:FR; y con un cuantómetro LI-189 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

Las plantas se midieron cuando el crecimiento se había detenido, es decir, cuando los meristemas de las inflorescencias finales dejan de producir nuevos brotes que dan lugar a flores laterales. Esto ocurre aproximadamente a los 50-60 días. Se midieron parámetros que consideramos importantes para cuantificar el crecimiento y desarrollo reproductivo: longitud del eje principal en cm, número de ramificaciones a partir de la base del eje principal o a partir de meristemas laterales, tamaño de los internodos en el eje principal, número de vainas o flores secundarias tanto en el eje principal como en las ramificaciones, anotando el número de vainas consideradas como viables por la presencia de semillas y el número de vainas estériles (sin semillas) y mal desarrolladas (Figura 10).

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa SigmaPlot, obteniendo y graficando los promedios para cada parámetro considerando la desviación estándar y el error estándar. En algunos casos se calcularon las regresiones lineales (método de mínimos cuadrados) para una serie de datos con un intervalo de confianza de 95%. Se aplicó además la prueba estadística no paramétrica de suma de rangos Wilcoxon-Mann-Whitney debido a que el número de muestra es pequeño.

E. Construcciones en plásmidos recombinantes

Se hicieron diferentes construcciones en plásmidos recombinantes, que servirán como herramientas para análisis posteriores:

T-DNA para posteriores experimentos tipo Southern-blot

Para amplificar el fragmento del extremo derecho de la secuencia de T-DNA (right border T-DNA) se utilizaron los oligos OLIGO31 y OLIGO87. OLIGO31 tiene la

secuencia 5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAA 3' y OLIGO87 tiene la secuencia 5' GCTCGCAATIGAGGTCTCATTGCGCCATTC 3'.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo en una mezcla con volumen final de 50 μ l que contenía 10 mM Tris-HCL, pH 8.9 y 80 mM KCL (Bufferde PCR); 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de desoxinucleótidos trifosfatados, 10 nM de cada oligo (FLOR3 y FLOR5), 10 ng de DNA, y 2.0 unidades de polimerasa de DNA Taq. Esta reacción fue sujeta a 35 ciclos de amplificación a temperaturas de 94°C 30'' (desnaturalización), 55°C 30'' (alineación), 72°C 1'30'' (polimerización), seguidos de una incubación final a 4°C ∞ .

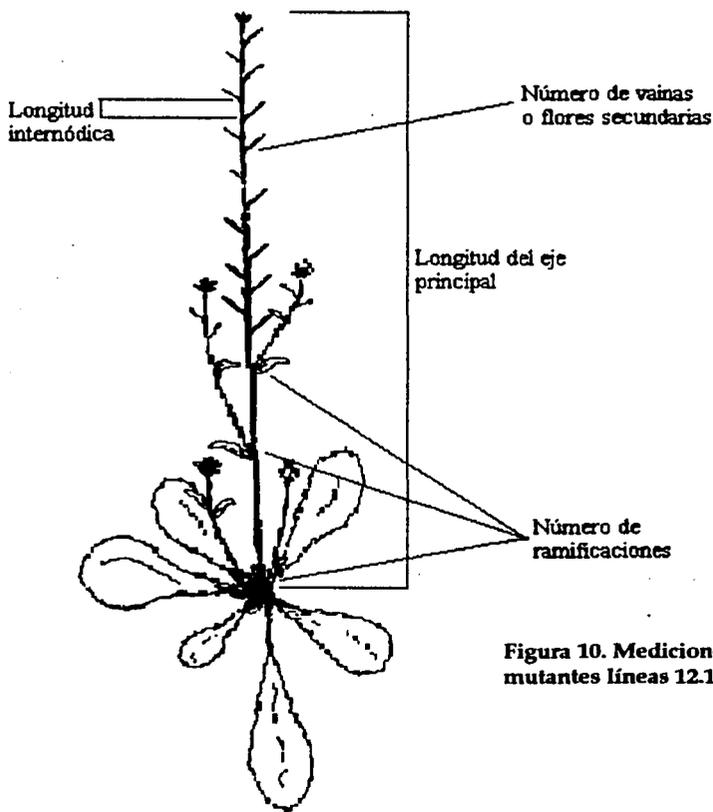


Figura 10. Mediciones que se hicieron a las plantas mutantes líneas 12.19.5 y 12.8.7 y controles

La reacción resultante se analizó por electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio. Las bandas que correspondían al peso molecular del fragmento a amplificar (extremo derecho de T-DNA, ~800 pb) fueron extraídas del gel por el método de fibra de vidrio siliconizada para su clonación en el vector pGEMT-Easy. Se hizo ligación con este fragmento (inserto) para introducirlo en el plásmido vector de clonación pGEMT-Easy, en una reacción que contenía 1.5 μ l de vector 50 ng/ μ l, 2.5 μ l de buffer de ligación, 5 μ l de inserto, presumiblemente extremo derecho del T-DNA, y 1 μ l de ligasa; y se dejó incubando toda la noche a 4°C (Apéndice V). Posteriormente con esta reacción se hizo transformación de células TOP-10 competentes de *Escherichia coli* (Apéndice V). Se seleccionaron las cepas transformantes por coloración según el protocolo de transformación con pGEMT-Easy, y posteriormente se prosiguió a crecerlas en medio de cultivo LB para extracción del plásmido recombinante por el método de minipreps (Apéndice VI). Con la solución de este plásmido se corroboró la inserción por digestión con una reacción con volumen final de 20 μ l que contenía 4 μ l de solución de plásmido recombinante, 13 μ l de agua bidestilada, 1 μ l de enzima EcoR1 y 2 μ l de buffer específico para la enzima (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.025 % Tritón X-100 pH 7.5).

Una vez seleccionadas las cepas transformantes tanto por coloración como por digestión, las soluciones con el plásmido recombinante de aquellas que resultaron positivas se mandaron secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. Con la secuencia se hicieron varios procesos de alineación pareada con ClustalX utilizando el programa MacVector contra contra la secuencia anterior de *FLOR1* más fragmento derecho de T-DNA obtenida durante la corroboración de la mutante. Además se hicieron varios BLAST o búsquedas por alineamientos locales con esta secuencia en la base de datos GeneBank.

Gen FLOR1 completo (con región promotora e intrón) para posteriores experimentos de transformación y recuperación de fenotipo

La liberación de la secuencia completa del genoma de Arabidopsis (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) permitió tener más claridad en cuanto a la región promotora y a la secuencia tanto de los exones como del intrón de *FLOR1*, lo cual permitió el diseño de los oligos más adecuados para su amplificación. *FLOR1* se encuentra ubicado en el cromosoma 3 de *A. thaliana*, y la región promotora se buscó en el Bac número T23B7 para éste cromosoma con número de acceso para GeneBank AP002063. En esta secuencia se encontró que el gen inmediato anterior al sitio de inicio de *FLOR1* se encuentra a 613pb, por lo que se pudo clonar toda la región completa que contiene los promotores.

Para la amplificación del gen *FLOR1* (tipo silvestre) completo se diseñaron con el programa MacVector los oligos **FLOR3**, con secuencia 5' CTGCAGCGATAGATTAGACTGGAAGGAGTC 3', y el oligo **FLOR5**, con secuencia 5' GAATTCACACCCATCTATTTAGGCG 3'. El DNA genómico se extrajo plantas tipo silvestre con el método de CTAB (Apéndice I). La reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla con volumen final de 50 μ l que contenía 10 mM Tris-HCl, pH 8.9 y 80 mM KCl (Buffer de PCR); 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de desoxinucleótidos trifosfatados, 10 nM de cada oligo (FLOR3 y FLOR5), 10 ng de DNA, y 2.0 unidades de polimerasa de DNA Taq. Esta reacción fue sujeta a 35 ciclos de amplificación a temperaturas de 94°C 30'' (desnaturalización), 60°C 30'' (alineación), 72°C 1' (polimerización), una estabilización final de 72°C 5' seguidos de una incubación final a 10°C ∞ .

La reacción resultante se analizó por electroforesis en un gel de agarosa 1%. Las bandas que correspondían al peso molecular del fragmento a amplificar (gen completo *FLOR1*) fueron extraídas del gel por el método de fibra de vidrio siliconizada para su clonación en el vector pGEMT-Easy. Se hizo ligación con este fragmento (inserto) para introducirlo en el plásmido vector de clonación pGEMT-Easy, en una reacción que contenía 1.5 μ l de vector 50 ng/ μ l, 2.5 μ l de buffer de ligación, 5 μ l de inserto, presumiblemente el gen completo *FLOR1* más su región promotora, y 1 μ l de ligasa; y se dejó incubando toda la noche a 4°C (Apéndice V). Posteriormente con esta reacción se hizo transformación de células TOP-10 competentes de *Escherichia coli* (Apéndice V). Se seleccionaron las colonias transformantes por coloración según el protocolo de transformación con pGEMT-Easy, y posteriormente se prosiguió a crecerlas en medio de cultivo LB para extracción del plásmido recombinante por el método de minipreps (Apéndice VI). Con la solución de este plásmido se corroboró la inserción por digestión con una reacción con volumen final de 20 μ l que contenía 4 μ l de solución de plásmido recombinante, 13 μ l de agua bidestilada, 1 μ l de enzima EcoR1 y 2 μ l de buffer específico para la enzima (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.025 % Tritón X-100 pH 7.5).

V. Resultados

A. Corroboración de la mutación en *FLOR1* por inserción de T-DNA

Corroboración de la mutante.

La combinación de oligos que dio resultados satisfactorios fue AG 20F / OLIGO31 que se anclan en el extremo 5' de *FLOR1* un poco antes del inicio de la transcripción y aproximadamente en el sitio 5,038 del T-DNA respectivamente (ver Figura 9). Con estos oligos las reacciones de PCR para el DNA de las líneas 12.8.7 y 12.19.5 resultaron positivas (Figura 11), lo que indica la presencia de al menos la región del extremo derecho o *right border* de la inserción de T-DNA en el gen *FLOR1*. El tamaño de la banda corresponde al esperado (aprox. 1900pb).

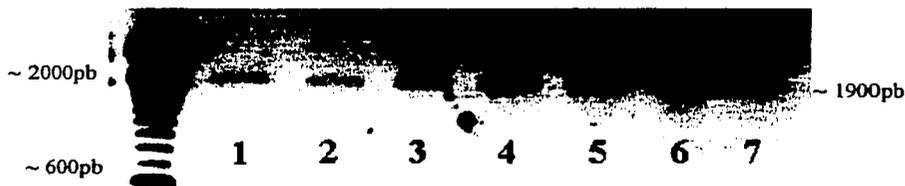


Figura 11. Corroboración de la inserción de T-DNA en la mutante *flor1* por PCR. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la línea mutante *flor1* 12.8; los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la línea mutante *flor1* 12.19. El carril número 7 corresponde a la reacción con DNA genómico control (en el carril del extremo izquierdo esta el marcador molecular de 100pb).

B. Análisis de la secuencia de mRNA de *FLOR1* en las plantas mutantes

RT-PCR

Una vez corroborada la inserción de T-DNA en *FLOR1* en las líneas 12.19.5 y 12.8.7 se prosiguió a hacer una caracterización molecular del RNA mensajero de este gen por medio de la síntesis y secuenciación de cDNA de *FLOR1* a partir de RNA total. Se logró sintetizar cDNA de *FLOR1* en ambas líneas mutantes analizadas (Figura

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12), lo cual indica la presencia de mRNA de *FLOR1* en estas plantas y por lo tanto, que estas mutantes no son nulas.

Posteriormente se hizo un análisis por secuenciación para la corroboración del *splicing* o adecuada maduración o edición del RNA mensajero, bajo la hipótesis de que la inserción de T-DNA en el intrón podría estar afectando la edición del mRNA.

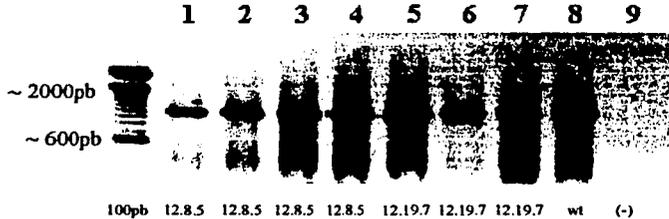


Figura 12. Resultados de RT-PCR en mutantes *flor1*. Los carriles 1 a 4 corresponden a plantas mutantes de la línea 12.8, los carriles 5 a 7 corresponden a plantas de las líneas 12.19. El carril 8 corresponde al control tipo silvestre (wt) y el carril 9 al control negativo

La alineación pareada de la secuencia de cDNA obtenido a partir de las mutantes *flor1* contra la secuencia de mRNA de *FLOR1* tipo silvestre mostró que la edición o *splicing* del RNA mensajero en estas líneas mutantes para *FLOR1* no se encontraba alterada; a pesar de la inserción de T-DNA (5,098 pb en el intrón). Posteriormente se decidió hacer una búsqueda de posibles motivos de regulación en el intrón del gen *FLOR1*, bajo la hipótesis de que la posible regulación otorgada por éstos sitios habría sido alterada por la inserción de T-DNA.

C. Búsqueda de posibles motivos regulatorios en las secuencias promotora e intrónica del gen FLOR1

Se hizo una búsqueda de sitios (de 4 a 8 nucleótidos de largo) tanto en a región promotora como en el intrón de *FLOR1* en RSA-tools. Este programa busca palabras con una frecuencia observada muy alta con respecto a la esperada en las regiones no codificantes del genoma de Arabidopsis, tanto en la cadena 5'->3' como en la complementaria, dando información del número de veces que el motivo o palabra aparece en la secuencia en la que se hizo la búsqueda . La tabla 3 muestra los resultados de esta búsqueda para la región promotora y la Tabla 4 para el intrón.

Tabla 3. Resultados de la búsqueda de motivos en RSA-tools para la región PROMOTORA de *FLOR1*. Notese la diferencia entre la frecuencia esperada para esos motivos en el genoma de *Arabidopsis thaliana* y la frecuencia observada.

MOTIVO ENCONTRADO	FRECUENCIA ESPERADA	NUM. DE VECES QUE APARECE EN LA REGIÓN	FRECUENCIA OBSERVADA
gtaa ttac	0.0093372235707	17	2.38
acac gtgt	0.0066620608430	14	2.24
caca tggt	0.0076653212514	13	1.07
taca tgta	0.0099379999963	15	1.02
agta tact	0.0081876241673	13	0.83
acat atgt	0.0113833304311	14	0.05
acaca tgtgt	0.0029219518280	11	3.14
agtaa ttact	0.0030821151206	8	0.58
cgtac gtacg	0.0030821151206	4	0.53
cacaa ttgtg	0.0029247739747	7	0.02
acacaa ttgtgt	0.0011177218558	7	1.99
gtacga tcgtac	0.0001835879342	3	0.38
cgtaca tgtagc	0.0002122695300	3	0.20
cgcgttc gaaacgcg	0.0000103673466	2	0.21
aaacgcga tcgcgttt	0.0000121575840	2	0.07
gtgtacga tcgtacac	0.0000123132569	2	0.06

Tabla 4. Resultados de la búsqueda de motivos en RSA-tools para e INTRON de *FLOR1*.

MOTIVO ENCONTRADO	FRECUENCIA ESPERADA	NUM. DE VECES QUE APARECE EN LA REGION	FRECUENCIA OBSERVADA
aacc gggt	0.0076807158239	8	0.39

También, con las mismas secuencias utilizadas para la búsqueda en RSA-tools se llevó a cabo una búsqueda de motivos en la base de datos de promotores y motivos regulatorios de genes de plantas PLACE-Database. En este tipo de búsquedas no se discriminan motivos por información estadística, solo arroja como resultado un listado de todos los motivos encontrados en la secuencia que se solicita que se encuentren en la base de datos y proporciona breve información sobre su función.

La Tabla 5 muestra los resultados de la búsqueda en PLACE-Database para la región promotora, haciendo una comparación con los resultados de RSA-tools. La Tabla 6 muestra los resultados de la búsqueda en PLACE-Database para la secuencia del intrón de *FLOR1*, también comparándolos con los resultados correspondientes en RSA-tools.

Tabla 5. Resultados de la búsqueda de motivos encontrados en PLACE-Database para la región CIS- o PROMOTORA. Se busca tanto en la cadena 5'->3' (+) como en la cadena complementaria (-). Las figuras de la columna de la izquierda sugieren la posible actividad de sitio: #) sitio de unión a factores de transcripción, *) provee de expresión tejido específica, &) determina regulación por luz, ♣) interviene de algún modo en la regulación por hormonas. Las casillas sombreadas con amarillo son las coincidencias estrictas entre sitios encontrados con RSA-tools y PLACE-Database. Las casillas sombreadas en azul son secuencias parecidas en ambos resultados. Las filas sombreadas en gris muestran aquellos sitios que se repiten más de una vez en una sola cadena. Para mayor información y citas sobre los motivos consultar la página de PLACE-Database: <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>.

	Motivo	Ubicación	Información
&	TATTCT	111(+) 345 (-)	Encontrado en el promotor del gen psbD que codifica para e centro de reacción DE de unión a clorofila en el fotosistema II en cloroplasto que es activado por luz azul, blanca o UV-A. (<i>Hordeum vulgare</i>)
	TAACARA	253 (+)	Encontrada en la región 5' del gen DE-alfa amilasa. (<i>Hordeum vulgare</i>); (<i>Oryza sativa</i>); (<i>Triticum OS aestivum</i>)
♣ &	TGACG	400 (-)	Se encuentra en muchos promotores que intervienen en la activación transcripcional de muchos genes mediada por auxinas y/o ácido salicílico. Puede ser relevante para la regulación de la transcripción mediada por la luz. CaMV; Cauliflower mosaic virus; plant; tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>); <i>Arabidopsis thaliana</i>
	ATAGAA	343 (+)	"Box II". Se encuentra en el promotor del gen atpB de cloroplasto. Conservado en muchos promotores de genes de cloroplasto. (<i>Nicotiana tabacum</i>)
*	CAAT	104 (+)15 (-) 24 (-)40 (-)249 (-) 330 (-)388 (-) 521 (-)538 (-)	Secuencia promotora consenso CAAT. Secuencias responsables de la actividad promotora del gen legA tejido-específica en tabaco.
*	CNAACAC	460 (+)	En proteínas de almacenamiento en <i>Brassica napus</i> . Da especificidad tisular a la expresión de napinA en embrión y endospermo.
	CATATG	381 (+)381 (-)	Encontrada en el elemento NDE de soya. Interviene en la respuesta a auxinas.
*	TGAAAAC	129 (-)	Responsable de la especificidad tisular de la actividad promotora de un gen de chícharo en tabaco.
#	AAAG	127 (+)204 (+)259 (+)273 (+) 294 (-)299 (-)358 (-) 484 (-)	Sitio central requerido para la unión de las proteínas Dof de unión a DNA únicas de plantas que promueven la transcripción.
*	ACACNNG	552 (+)	Promueve expresión del gen Dc3 específica en embrión. También puede intervenir en la respuesta a ABA. (<i>Daucus carota</i>); <i>Arabidopsis thaliana</i>
♣	CANNTG	381 (+)381 (-)	Caja-E del gen napA de almacenamiento en <i>Brassica napus</i>
& *	GATA	315 (+)391 (+)415 (+)184 (-) 438 (-)	"GATA box"; motivo GATA en el promotor CaMV 35S. Requerido para altos niveles de expresión. Regulado por luz y da expresión tejido-específica. (<i>Petunia hybrida</i>)
&	GRWAAW	34 (+)35 (+)191 (+)220 (+) 391 (+)	Sitio consenso encontrado en muchos genes regulados por la luz en muchas especies.
	GTGA	313 (+)134 (-)402 (-)410 (-) 509 (-)	Motivo GTGA encontrado en el promotor del gen g10 específico de polen en tabaco.
#	TGACGTGG	397 (-)	Motivo "Hex". Sitio de unión para la proteína bZIP en <i>Arabidopsis</i> y el factor GBF1.
	ACGTCA	399 (+)	Motivo "hexámero" encontrado en el promotor de genes de histonas y de

			HBP-1 (cierre de leucina). Posiblemente regulador de su transcripción.
	GATAAG	436 (-)	Caja "T". Se encuentra en regiones promotoras de genes con transcripción regulada por luz en <i>Arabidopsis</i> .
	GATAA	391 (+)437 (-)	Caja "T". Se encuentra en regiones promotoras de genes con transcripción regulada por luz en <i>Arabidopsis</i>
*	TAAATGYA	62 (-)	Caja "LI". En promotores del factor PDF1 de <i>Arabidopsis</i> . Interviene en la expresión capa-específica en el meristemo apical del tallo y en los primordios.
&	CCGAC	29 (-)	Centro de elemento de respuesta a temperatura (LTRE) mediada por la luz en <i>Arabidopsis thaliana</i> .
	TAACAAA	253 (+)	Elemento central del elemento de respuesta a giberilina (GA).
*	ACTTTA	293 (+)298 (+)	Sitio de unión a la proteína NtBBF1 en <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . Requerido para la expresión tejido-específica y la inducción por auxinas de gen rolB RT en plantas.
	AATAAA	152 (+)	Señal "PolyA" (poliadenilación) en el gen legA de chicharo y arroz.
	AGAAA	118 (+)245 (+)261 (+)270 (+)486 (-)	Es uno de los dos elementos regulatorios codependientes responsables de la activación específica del gen lat52 en polen de tomate.
	CAACA	86 (+)165 (+)479 (+)	Sitio RAV1 consenso de unión para factores de transcripción en <i>Arabidopsis thaliana</i> . Reconocido junto con RAV1-B (CACCTG) por proteínas que contienen dominios similares a los de AP2 y B3. Hy una expresión relativamente alta de RAV1 en hojas de roseta y raíz.
*	ATATT	13 (+)288 (-)347 (-)574 (-)	Motivo encontrado en promotores de rolD en <i>Agrobacterium sp.</i> que promueve especificidad de la expresión en raíz.
	CATGCA	496 (+)	Sitio repetitivo RT encontrado en las cajas RY/G (junto con las cajas G) del gen napA en <i>Brassica napus</i> . Requerido para la expresión específica en semilla. Transactivación dependiente de ABA.
	ATGGTA	454 (+)	Caja SIF, conservada en los genes RSP1 y RPL21 de espinaca, que codifica para una proteína ribosomal de cloroplasto.
#	RTTTTTR	168 (-)	Sitio de unión SEF4 encontrado en el gen Gmg17.1 de soya.
	TATAAAT	148 (+)	"caja TATA" encontrada en legA de papas <i>Pisum sativum</i> y tabaco, <i>Nicotiana tabacum</i>
	TTATTT	151 (-)	"Caja TATA" encontrada en el gen de la glutamin sintetasa de chicharo. (<i>Pisum sativum</i>)
#	TATTTAA	472 (-)	Sitio de unión para el factor de transcripción OsTBP2 encontrado en el gen OsTFIIB. Estimula la unión a DNA. <i>Oryza sativa</i>
	TGACGT	399 (-)	"Motivo TGACGT" encontrado en el promotor de la alfa-amilasa. Prové de alta expresión en los cotiledones de semillas germinantes.
#	TTGAC	522 (+)	"Caja W" en el promotor del gen NPR1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Reconocido por proteínas de unión a DNA inducidas por ácido-salicílico. Resistencia a enfermedades.
#	TAAAG	294 (-)299 (-)	Motivo TAAAG encontrado en el promotor del gen KST1 de <i>Solanum tuberosum</i> . Sitio de unión para el factor de transcripción StDof, que controla la especificidad de la expresión en células guarda.

Tabla 6. Resultados de la búsqueda de motivos encontrados en PLACE-Database para el INTRON deFLOR1. Se busco tanto en la cadena 5'->3' como en la cadena complementaria (comp). Las figuras de la columna de la izquierda sugieren la posible actividad de sitio: #) sitio de unión a factores de transcripción, *) provee de expresión tejido específica, &) determina regulación por luz, ♣) interviene de algún modo en la regulación por hormonas. Las casillas sombreadas con amarillo son las coincidencias estrictas entre sitios encontrados con RSA-tools y PLACE-Database. Las casillas sombreadas en azul son secuencias parecidas en ambos resultados. Las filas sombreadas en gris muestran aquellos sitios que se repiten más de una vez en una sola cadena. Para mayor información y citas sobre los motivos consultar la página de PLACE-Database: <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>

	Motivo	Ubicación	Información
&	TATTCT	289 (+)	Encontrado en el promotor del gen psbD de cloroplasto, cuya expresión esta regulada por luz
	CAAT	43 (+)157 (+)215 (+)271 (+) 164 (-)171 (-)204 (-)	Caja "CAAT" encontrada en el promotor del gen legA de chícharo (<i>Pisum sativum</i>).
	CCAAT	164 (-)171 (-) 174 (+)236 (-)	Secuencia común encontrada en las regiones 5' de genes eucariontes.
	CNAACAC	92 (+)	En proteínas de almacenamiento en <i>Brassica napus</i> . Transcripción específica en embrión y endospermo del gen napA.
#	AAAG	26 (+)32 (+)308 (+)259 (-)327 (-)	Requerido para la unión de proteínas Dof de unión a DNA en maíz.
#	ACACNNG	95 (+)	Secuencia de unión a factores de transcripción bZIP en zanahoria. Pueden dar especificidad tisular inducida por ABA.
&	GATA	50 (+)40 (-)188 (-)268 (-)	Caja "GATA". Encontrada en el gen Cab22 regulado por la luz. También da especificidad de la expresión. <i>Petunia hybrida</i>
&	GATAA	39 (-)	Caja "I". Secuencia encontrada en promotores de genes regulados por luz en monocotiledoneas y dicotiledoneas.
&	GRWAAW	29 (+)263 (+)38 (-)	Sitio GT-1 consenso encontrado en muchos genes regulados por luz en diversas especies.
& #	GGTTAA	235 (-)	Indispensable para la unión de la siti GT-1. Se correlaciona con secuencias requeridas para la activación transcripcional por luz del gen rbcS <i>Pisum sativum</i> .
*	GTGA	168 (+)154 (-)190 (-)	Motivo "GTGA" encontrado en el promotor del gen g10 específico de polen estadio tardío en tabaco.
&	YTCANTYY	103 (+)	"Inr". Elemento iniciador en el gen psaDb carente de cajas TATA en tabaco. Este gen se transcribe en respuesta a la luz.
# * ♣	ACTTTA	326 (+)	Sitio de unión para la proteína NtBBF1 (tipo Dof de tabaco). Requerida para la expresión tejido específica y la inducción por auxinas.
	AATAAA	70 (+)114 (+)287 (-)	Señal de poliadenilación en productos nucleares encontrada en el gen legA de chícharo.
	AATAAT	74 (+)	Señal consenso de poliadenilación en plantas.
*	AGAAA	34 (+)256 (-)	Uno de los dos elementos regulatorios co-dependientes de la activación específica del gen lat52 de polen en tomate.
&	AACCAA	172 (-)	"REalpha" encontrado en el promotor del gen Lhcb21 de <i>Lemna gibba</i> . Su actividad de unión es alta en plantas etioladas, pero baja en plantas verdes. Requerido para la regulación de fitocromo.
*	ATATT	186 (-)224 (-)266 (-)	Motivo encontrado en promotores de rolD. Expresión específica de raíz.
#	RTTTTTR	80 (-)330 (-)	Sitio de unión SEF4. Promueve la transcripción por interacción con

			factores nucleares como SEF4.
*	TAAAG	31 (+)307 (+) 327 (-)	Motivo encontrado en el promotor de gen KST1 en <i>Solanum tuberosum</i> . Sitio de unión para las proteínas StDof1 que controlan expresión específica en células guarda.
	TTATTT	69 (-)73 (-)113 (-)	Caja TATA encontrada en el gen de la glutamin sintetasa de chicharo.

Para la región promotora se encontraron dos motivos con resultados coincidentes por ambos métodos (RSA-Tools y Place-Database). Ambos motivos están presentes una sola vez en la secuencia, en el sitio 460+ y en el sitio 552+ en posición *upstream* o río arriba a partir del sitio de inicio de transcripción. Ambos motivos dan especificidad tisular de la expresión de los genes en que se presentan en el embrión, ya sea para *Brassica napus* o para *Daucus carota*. De los 35 motivos encontrados con PLACE-Database para la región promotora, el 25%, (9 motivos) corresponden a secuencias encontradas en genes cuya expresión esta regulada por luz. En especial la secuencia tipo GATA contenida en ellas se repite cerca de nueve veces en la región promotora. El 34% de los motivos (12 motivos) corresponden a secuencias que brindan especificidad tisular en la expresión de los genes en los que se han encontrado. En especial la secuencia tipo CAAT, ACTTTA y AGAAA se repiten continuamente en diferentes puntos de la secuencia. Las secuencias encontradas proveen especificidad tisular en polen, meristemo y primordios florales, raíz y tejido vascular, pero la mayoría en embrión y semillas. Además se encontraron siete posibles sitios de unión a factores de transcripción.

En la secuencia del intrón se encontraron también dos coincidencias para los resultados entre PLACE-Database y RSA-Tools. Ambos motivos (GGTTAA y AACCAA) se encuentran en la cadena complementaria, en el sitio 235(-) y 172(-), y han sido encontrados en genes cuya expresión esta regulada por la luz. Estos motivos no se encuentran en el promotor de *FLOR1*. Un 33% de motivos (siete motivos) encontrados intervienen en la regulación de la transcripción por luz, 28% (seis motivos) intervienen en la expresión tejido específica en embrión, polen, raíz y células guarda. Algunos de estos sitios se repiten varias veces y también están presentes en el promotor (secuencia tipo GATA, AATAAA, TAAAG). El 23% de motivos (5 motivos) encontrados en PLACE-Database son posibles sitios de unión a factores de transcripción, de los que destacan dos sitios que se repiten más de una vez y que también están presentes en el promotor: AAAG, que en maíz es un sitio de unión para proteínas tipo Dof y la secuencia tipo RTTTTTR, sitio de unión para SEF4.

Muchos de los sitios encontrados en PLACE-Database son secuencias muy cortas y en su mayoría no coincidieron con los resultados de RSA-Tools, por lo que la posibilidad de su aparición en las secuencias por azar es alta. Muchos de los resultados en las tablas 5 y 6 donde no hay coincidencia con RSA-tools pueden ser falsos positivos.

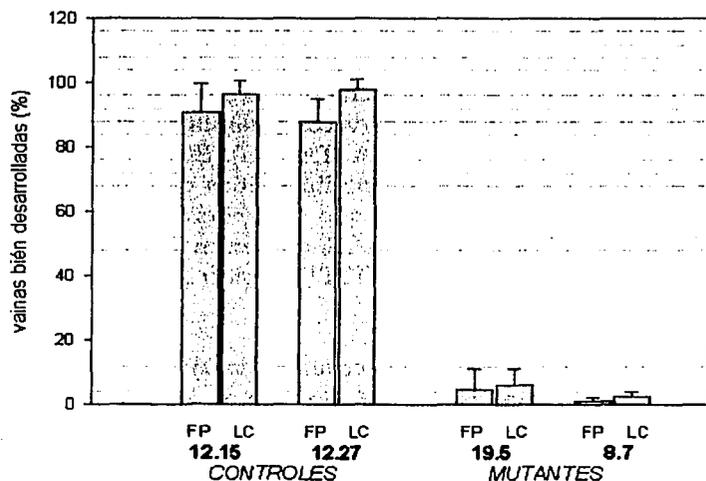
D. Análisis del fenotipo mutante. Comparación entre luz continua y fotoperiodo

En los análisis de la región promotora y del intrón del gen *FLOR1* se encontraron algunos motivos que posiblemente dan regulación de la expresión por luz. Debido a esto se decidió que, además de hacer un análisis del fenotipo de las mutantes *flor1* se añadiría una variable más, creciéndolas y comparando su desarrollo en dos diferentes condiciones de iluminación: luz continua y fotoperiodo.

Formación y desarrollo de vainas

En la Figura 13 se observa como las vainas y las flores de las plantas de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 con inserción de T-DNA en *FLOR1* muestran alteraciones notables en comparación con las líneas control 12.27 y 12.15 que resultaron negativas para la inserción en *FLOR1* (indistintamente de si han crecido en luz continua o en fotoperiodo). Las vainas de las líneas mutantes *flor1* son más pequeñas y su desarrollo se encuentra atrofiado, pues no logran producir semillas. Las flores también presentan estructuras alteradas, con pétalos de menor tamaño y carpelos y estambres alterados.

Para hacer una comparación cuantitativa se contó el número de vainas bien desarrolladas (lo cual se decidía por que tenían un buen tamaño y producían semillas) en relación con el total de vainas (las viables y productoras de semillas más las atrofiadas y mal desarrolladas). Los resultados se muestran en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Análisis de formación y desarrollo de vainas. Las columnas muestran los porcentajes de vainas viables (productoras de semillas) para las líneas 12.15 y 12.27 (controles) y las mutantes *flor1* de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 crecidas en luz continua (LC) y en fotoperiodo (FP). En las líneas control casi la totalidad de las vainas son viables (producen semilla), mientras que en las líneas mutantes este porcentaje es mínimo, lo cual indica que la mayoría de ellas son estériles. Las barras muestran la desviación estándar.



Figura 13. Vainas y flores de las mutantes *flor1* a la izquierda, y a la derecha las líneas control. (ambas líneas mutantes, 12.19.5 y 12.8.7, y controles, 12.15 y 12.27, presentan el mismo fenotipo). La flecha de la parte superior izquierda señala una vaina del tipo mutante, pequeña y mal desarrollada. La flecha de la izquierda abajo señala una flor de las líneas mutantes, donde se perciben los pétalos más pequeños. A la derecha se muestra un acercamiento de las vainas y flores de las plantas control. La flecha de la derecha arriba muestra una vaina. Puede notarse inmediatamente el mayor tamaño. La flecha de la derecha abajo muestra una de las flores de las líneas controles, donde a simple vista se observan los pétalos más grandes.

La Tabla 7 muestra el promedio del número de vainas viables para cada línea así como los datos estadísticos. En dicha tabla se muestran los resultados de la prueba estadística aplicada (Wilcoxon-Mann-Whitney) para determinar las diferencias estadísticas entre las plantas crecidas en luz continua y las crecidas en fotoperiodo para cada línea, así como las diferencias entre mutantes y controles. No hubo diferencias estadísticas en cuanto al número vainas viables entre las líneas mutantes crecidas en luz continua y las crecidas en fotoperiodo. Entre las plantas control de la línea 12.15 crecidas en LC y FP tampoco hubo diferencias significativas, pero entre las plantas control de la línea 12.27 en FP y LC hubo diferencias con un α de 0.1 (Tabla 7), aunque podría deberse al pequeño número de réplicas.

También se compararon las plantas de líneas mutantes crecidas en FP y LC contra las control crecidas en FP y LC. En todos los casos hubo diferencias significativas con altos niveles de confianza ($\alpha < 0.001$), lo que confirma la observación de la evidente esterilidad de las mutantes independientemente de las condiciones de iluminación en su crecimiento.

FORMACION Y DESARROLLO DE VAINAS				
Líneas control (12.27 y 12.25)	12.15		12.27	
	FP	LC	FP	LC
	90.8 σ 8.79 \pm 2.53 n=12	96.3 σ 4.63 \pm 1.39 n=11	88.04 σ 6.95 \pm 2.83 n=6	97.92 σ 3.16 \pm 1.41 n=5
Diferencias estadísticas entre FP y LC	*			
Líneas mutantes (12.19.5 y 12.8.7)	12.19.5		12.8.7	
	FP	LC	FP	LC
	4.63 σ 6.47 \pm 2.28 n=8	6.16 σ 4.98 \pm 1.38 n=13	1.13 σ 0.95 \pm 0.30 n=10	2.54 σ 1.38 \pm 0.48 n=8
Diferencias estadísticas entre FP y LC				
Diferencia estadística entre controles y mutantes	12.15FP Vs. 12.19.5FP	12.15LC Vs 12.19.5LC	12.27FP Vs 12.8.7FP	12.27LC Vs 12.8.7LC
	****	****	****	****
	12.15FP Vs. 12.8.7FP	12.15LC Vs 12.8.7LC	12.27FP Vs 12.19.5FP	12.27LC Vs 12.19.5LC
	****	****	****	****

Tabla 7. Formación y desarrollo de vainas. Datos y diferencias estadísticas para líneas control y mutantes. Los promedios de vainas viables se muestran en números oscuros, σ) desviación estándar, \pm) error estándar, n) número de replicas. Diferencia estadística con una $\alpha < 0.1$, $\alpha < 0.02$, $\alpha < 0.005$ y $\alpha < 0.001$ se indica como *, **, *** y **** respectivamente.

A pesar de que las diferencias no son significativas, tanto en las plantas control como en las mutantes puede observarse una tendencia a una mayor producción de vainas viables cuando las plantas crecen en condiciones de luz continua, sin embargo, esto puede deberse a las diferencias en las condiciones de iluminación de las cámaras de crecimiento de luz continua y de luz-oscuridad (ver Materiales y Métodos). Esto se mencionará a mayor profundidad en la Discusión.

Alteraciones en el número de ramificaciones.

En la Figura 14 y la Figura 15 se observan plantas de las líneas mutantes *flor1* y controles a los 60 días. A simple vista pueden notarse claras diferencias en cuanto al número de ramificaciones, que es mayor en las mutantes. Las ramas, que son más abundantes en las mutantes *flor1* también son más delgadas y frágiles.

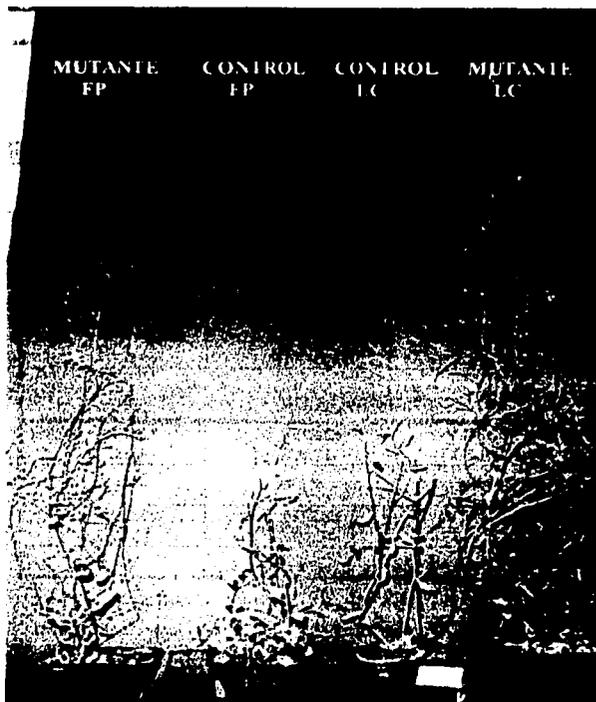
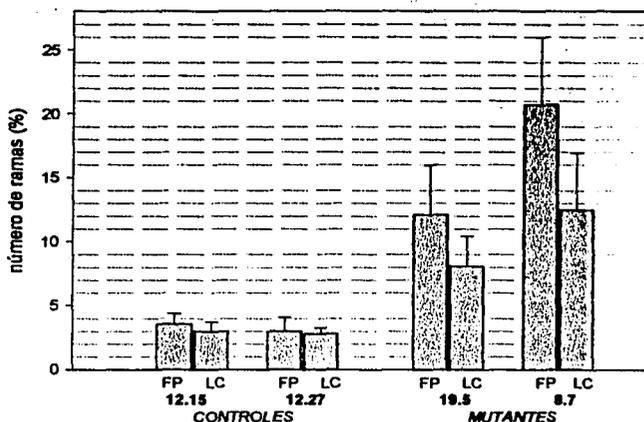


Figura 14 y 15. Plantas mutantes *flor1* y controles. Las fotografías muestran de izquierda a derecha: una planta mutante *flor1* crecidas en FP, planta de línea control crecida en FP, planta de línea control crecidas en LC y planta mutante *flor1* crecidas en LC. (ambas líneas, tanto mutantes como controles presentaban el mismo fenotipo). Arriba se puede observar claramente como las plantas mutantes están más ramificadas. A la izquierda se aprecia como las plantas mutantes crecidas en luz continua tienen ramificaciones más largas que las plantas crecidas en fotoperiodo, siendo que ambas son más largas que las plantas control.

Para hacer la comparación cuantitativa se contó el número de ramas para cada planta. La Gráfica 2 muestra los resultados y en la Tabla 8 se muestran los análisis estadísticos correspondientes.

Gráfica 2. Número de ramas para plantas mutantes *flor1* y controles. Las barras muestran la desviación estándar.



NUMERO DE RAMAS				
Líneas control (12.27 y 12.25)	12.15		12.27	
	FP	LK	FP	LK
	3.58 σ 0.79 \pm 0.22 n=12	3 σ 0.79 \pm 0.22 n=12	3 σ 1.09 \pm 0.44 n=6	2.8 σ 0.44 \pm 0.19 n=5
Diferencias estadísticas entre FP y LC				
Líneas mutantes (12.19.5 y 12.8.7)	12.19.5		12.8.7	
	FP	LK	FP	LK
	12.1 σ 3.87 \pm 1.22 n=10	8.07 σ 2.32 \pm 0.64 n=13	20.7 σ 5.25 \pm 1.66 n=10	12.5 σ 4.40 \pm 1.55 n=8
Diferencias estadísticas entre FP y LC	**		***	
Diferencia estadística entre controles y mutantes	12.15FP Vs. 12.19.5FP	12.15LC Vs. 12.19.5LC	12.27FP Vs. 12.8.7FP	12.27LC Vs. 12.8.7LC
	****	****	****	****
	12.15FP Vs. 12.8.7FP	12.15LC Vs. 12.8.7LC	12.27FP Vs. 12.19.5FP	12.27LC Vs. 12.19.5LC
	****	****	****	****

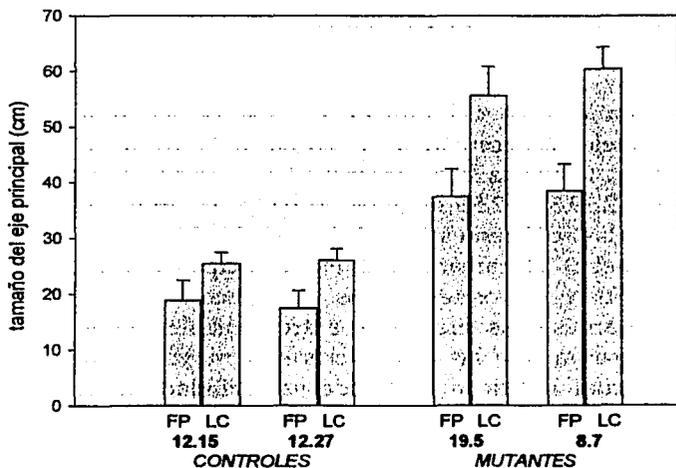
Tabla 8. Número de ramas. Datos y diferencias estadísticas para líneas control y mutantes. Los promedios de número de ramas para cada línea se muestran en números oscuros, σ) desviación estándar, \pm) error estándar, n) número de replicas. Diferencia estadística con una $\alpha < 0.1$, $\alpha < 0.02$, $\alpha < 0.005$ v $\alpha < 0.001$ se indica como *, **, * v **** respectivamente.**

En la Gráfica 2 se observa claramente que el promedio del número de ramas en las líneas mutantes es mayor, y aunque la desviación estándar es alta, se observa que las mutantes crecidas en FP tienen un mayor número de ramas. Esto se corrobora en el análisis estadístico de la Tabla 9, pues las mutantes de la línea 12.19.5 crecidas en FP y LC son diferentes estadísticamente con un $\alpha < 0.02$ y las mutantes de la línea 12.8.7 en FP y LC son diferentes con un $\alpha < 0.005$. Todo lo anterior indica que las plantas mutantes *flor1*, a diferencia de las controles, tienen reacciones diferentes en cuanto al número de ramificaciones a las diferentes condiciones de iluminación.

La comparación de las mutantes *flor1* con las líneas control también reveló que las diferencias son altamente significativas ($\alpha < 0.001$) en todos los casos. En cuanto al número de ramas también se observa una tendencia en el caso de las plantas control, que no es significativa, de un mayor número de ramas cuando las plantas crecen en FP, pero esto puede deberse a las condiciones de iluminación de las cámaras de crecimiento.

Tamaño del eje principal

En las mutantes *flor1* no hay pérdida de la dominancia apical, pero como se observa en la Figura 14 y 15, la longitud de las ramas aumenta en comparación con las plantas control, sobre todo en cuanto a la longitud del eje principal, que fue el parámetro medido a continuación.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3. Promedio de tamaño del eje principal para líneas mutantes *flor1* (12.8.7 y 12.19.5) y plantas control (12.27 y 12.15). Las barras muestran la desviación estándar.

La Gráfica 3 muestra los promedios del tamaño del eje principal medido en cm para plantas mutantes *flor1* y controles. La Tabla 9 muestra los datos estadísticos y los resultados de la prueba de Wilcoxon-Mann-Withney.

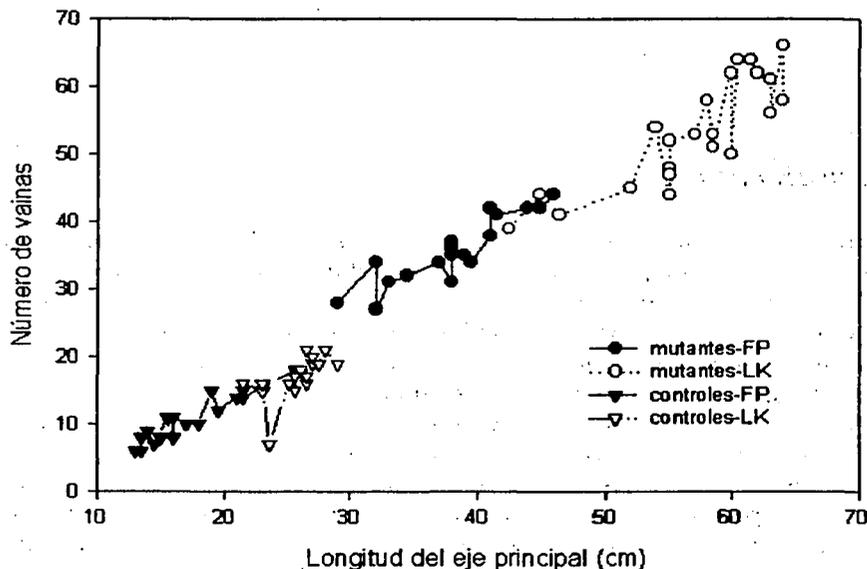
TAMAÑO DEL EJE PRINCIPAL				
Líneas control (12.27 y 12.25)	12.15		12.27	
	FP	LK	FP	LK
	18.9	25.5	17.5	26.1
	σ 3.57	σ 2	σ 3.17	σ 2.07
	\pm 1.03	\pm 0.57	\pm 1.29	\pm 0.92
	n=12	n=12	n=6	n=5
Diferencias estadísticas	****		***	
Líneas mutantes (12.19.5 y 12.8.7)	12.19.5		12.8.7	
	FP	LK	FP	LK
	37.55	55.65	38.55	60.5
	σ 4.93	σ 5.22	σ 4.78	σ 3.90
	\pm 1.55	\pm 1.44	\pm 1.51	\pm 1.37
	n=10	n=13	n=10	n=8
Diferencias estadísticas	****		****	
Diferencia estadística entre controles y mutantes	12.15FP Vs. 12.19.5FP	12.15LC Vs 12.19.5LC	12.27FP Vs 12.8.7FP	12.27LC Vs 12.8.7LC
	****	****	****	****
	12.15FP Vs. 12.8.7FP	12.15LC Vs 12.8.7LC	12.27FP Vs 12.19.5FP	12.27LC Vs 12.19.5LC
	****	****	****	****

Tabla 9. Tamaño del eje principal. Datos y diferencias estadísticas para líneas control y mutantes. Los promedios de longitud del eje principal (cm) para cada línea se muestran en números oscuros, (σ) desviación estándar, (\pm) error estándar, n) número de replicas. Diferencia estadística con una $\alpha < 0.1$, $\alpha < 0.02$, $\alpha < 0.005$ y $\alpha < 0.001$ se indica como *, **, *** y **** respectivamente.

Como se observa en la Tabla 9, en el caso del tamaño del eje principal hay diferencias estadísticas con altos niveles de confianza al comparar tanto la línea control 12.15 crecida en FP y LC ($\alpha < 0.001$), la línea control 12.27 crecida en FP y LC ($\alpha < 0.02$), y las líneas mutantes 12.19.5 y 12.8.7 crecidas en FP y LC (ambas con $\alpha < 0.001$); lo cual indica que las diferentes condiciones de luz afectan considerablemente (según esta prueba) el tamaño del eje principal tanto en controles como en mutantes; sin embargo estos resultados no son consistentes si observamos las diferencias entre mutantes y las diferencias entre controles crecidas en FP y LC en la Gráfica 3 (se observa que las diferencias son mayores entre mutantes que entre controles), lo cual indica la falta de sensibilidad de esta prueba.

Número de vainas en el eje principal

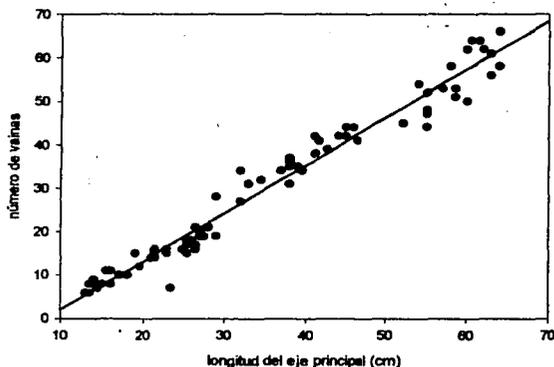
También se hicieron conteos del número de vainas en el eje principal, ya sea que fueran o no estériles; para mutantes y controles, con el objetivo de ver si la mayor longitud del eje principal observada en las mutantes *flor1* (Gráfica 3 y Tabla 9) es debida a la presencia de un mayor número de internodos (la hipótesis alternativa es que es debido a la elongación de los internodos y no a un crecimiento por adición de estos). Los resultados se muestran en la Gráfica 4, donde se graficó longitud del eje principal contra el número de vainas individuo por individuo con una simbología diferente para cada línea. Los puntos que representan cada línea mutante y control se unieron para comparar las diferencias entre la longitud del eje principal para cada línea. En esta gráfica se observa que, aun que las plantas mutantes tienen los valores de longitud del eje principal mayores, también poseen un mayor número de vainas, lo cual indica que hay una correlación entre ambos parámetros.



Gráfica 4. Longitud del eje principal contra el número de vainas para plantas control y mutantes. Obsérvese como a mayor longitud del eje principal hay un mayor número de vainas, independientemente de la línea de que se trate y de las condiciones de iluminación de crecimiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

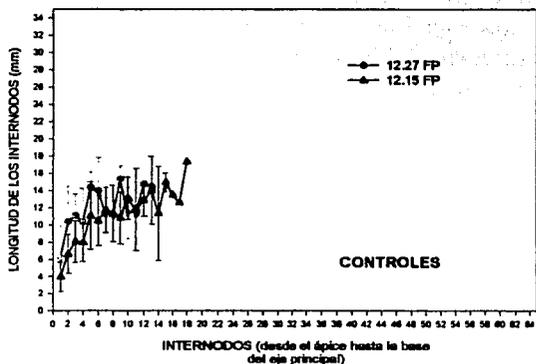
Para corroborar la correlación entre longitud del eje principal y número de vainas se hizo la regresión lineal para los datos de la gráfica anterior. Los resultados se muestran en la Gráfica 5. Los resultados del coeficiente $r^2= 0.9635$ reflejan una buena correlación de los datos.



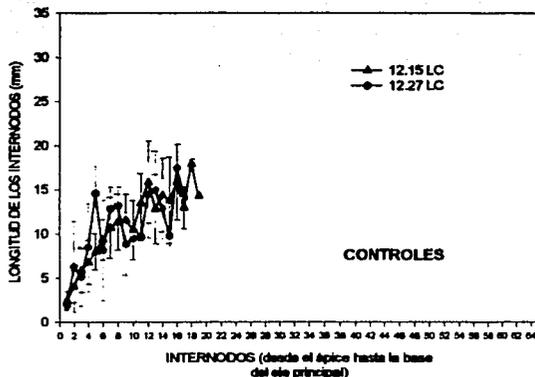
Gráfica 5. Regresión lineal para los datos de longitud contra número de vainas para plantas control y mutantes de ambas líneas. El coeficiente $r^2= 0.9635$ y $m=0.611$

Longitud internódica

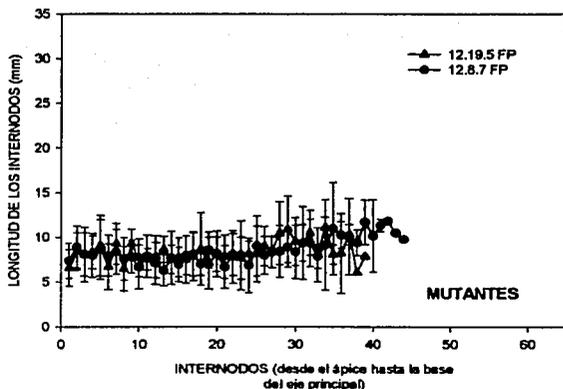
Para continuar con el análisis de los internodos se midió la longitud de cada internodo en el eje principal para las líneas mutantes *flor1* y controles, con el objetivo de hacer una comparación y corroborar que la mayor longitud del eje principal (y como extrapolación en todas las ramas) en las mutantes es ocasionada por la adición de internodos y no por la elongación de éstos. En todos los casos se anotaron las longitudes internódicas empezando desde el ápice hasta la base del eje principal y se promediaron según su posición. Las Gráficas 6 y 7 muestran los resultados para las líneas control crecidas en FP y LC; y las Gráficas 8 y 9 para las líneas mutantes *flor1* crecidas en FP y LC. En estas gráficas no se aprecian diferencias en los promedios de las longitudes internódicas (pues se observa como las barras de desviación estándar se sobrelapan), por lo que en adelante se analizará el promedio de las líneas 12.15 y 12.27 en FP, de las líneas 12.15 y 12.27 en LC, de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 en FP y de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 en LC.



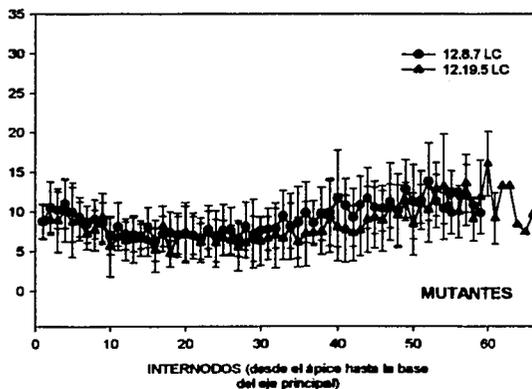
Gráfica 6. Longitudes internódicas para líneas control crecidas en FP. Las barras muestran la desviación estándar. No se aprecian diferencias considerables entre ambas líneas.



Gráfica 7. Longitudes internódicas para líneas control crecidas en LC. Las barras muestran la desviación estándar. No se aprecian diferencias considerables entre ambas líneas.

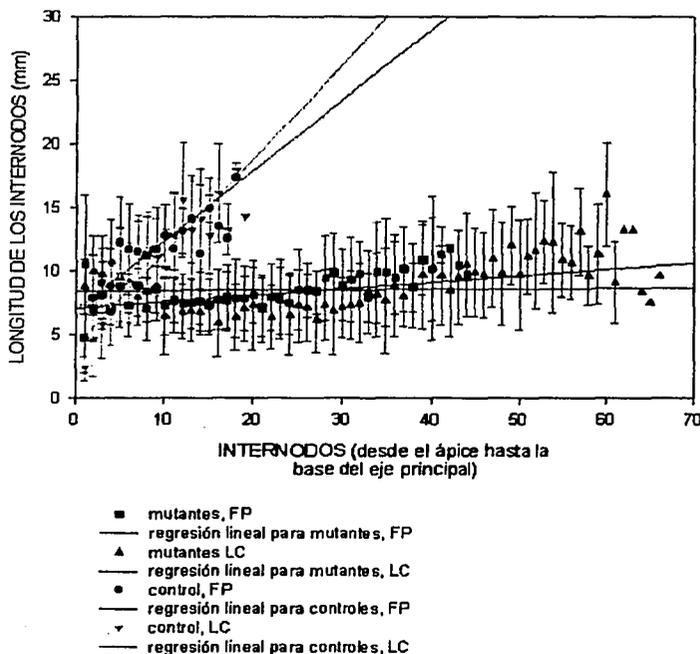


Gráfica 8. Longitudes internódicas para líneas mutantes *flor1* crecidas en FP. Las barras muestran la desviación estándar. No se aprecian diferencias considerables entre ambas líneas.



Gráfica 9. Longitudes internódicas para líneas mutantes *flor1* crecidas en LC. Las barras muestran la desviación estándar. No se aprecian diferencias considerables entre ambas líneas.

En la Gráfica 10 se muestra el promedio de las longitudes internódicas para las líneas mutantes *flor1* y controles. No se aprecian diferencias considerables entre las mutantes crecidas en luz continua y fotoperiodo ni entre las controles crecidas en luz continua y fotoperiodo, sin embargo el comportamiento del tamaño de los internodos a lo largo del eje principal es diferente entre las plantas mutantes y las plantas control. Para corroborar esto y para mayor claridad se hizo la regresión lineal para los cuatro grupos de datos (mutantes FP, mutantes LC, controles FP, controles LC) que se muestra en la misma gráfica (Gráfica 10). Se observa como la pendiente resultante de la regresión lineal para las plantas control es mayor en ambos casos (FP y LC), indicando como los internodos tienden a hacerse más grandes hacia la base del tallo, mientras que en las plantas mutantes la pendiente es menor en ambos casos (FP y LC), lo que indica la longitud de los internodos a lo largo del eje es más homogénea, sin presentar la tendencia a la elongación hacia la base del tallo. La filotaxia en las vainas y flores secundarias no parece estar alterada en las plantas mutantes.



Gráfica 10. Longitud de los internodos para líneas mutantes *flor1* y controles. Las mediciones se hicieron desde el ápice hasta la base del tallo. También se muestran las rectas resultantes de la regresión lineal. En todos los casos la regresión lineal se hizo con 95% de confianza los coeficientes r^2 son: $r^2=0.2919$ para líneas control FP (azul), $r^2=0.5092$ para líneas control LC (verde), $r^2=1.6826$ para líneas mutantes *flor1* LC (rojo), y $r^2=0.0523$ para líneas mutantes *flor1* FP (amarillo). Las pendientes (m) son 0.5, 0.7, 3.9 y 0.05 respectivamente. Las barras muestran la desviación estándar para el promedio de los datos.

E. Construcciones en plásmidos recombinantes

T-DNA

Se clonó el fragmento amplificado con los oligos OLIGO31 y OLIGO87 en el vector pGEMT-Easy. La secuenciación mostró que se obtuvo un fragmento de 431pb , ubicado en el extremo derecho o *right border* del T-DNA.

Este fragmento clonado servirá posteriormente para la síntesis de sondas marcadas radioactivamente para experimentos tipo Southern-blot de corroboración del número de inserciones de T-DNA en las mutantes para *FLOR1*.

Gen FLOR1 completo (con región promotora e intrón)

También se logró obtener al menos una clona del gen completo *FLOR1*, la cual incluye su región promotora, el exón I, el intrón y el exón II; lo cual se corroboró al hacer un *blast* de la secuencia obtenida en la base de datos de GenBank.

Este fragmento clonado en el vector pGEMT-Easy puede ser transferido a un vector de transformación para *Agrobacterium* para realizar experimentos de transformación de plantas y recuperación de fenotipo.

VI. Discusión

Luz, Hormonas y Transducción de Señales.

Un completo entendimiento del funcionamiento de genes reguladores de aspectos importantes del desarrollo como los genes de la familia MADS-Box incluye un entendimiento de cómo es que operan las vías de transducción de señales que regulan a estos genes, y que hacen que diferentes aspectos del desarrollo como la organogénesis floral y el desarrollo vegetativo estén íntimamente relacionados tanto con el medio en que habita el organismo como con procesos internos a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo de la planta. La interacción *in vitro* de la proteína FLOR1 con el factor de transcripción AGAMOUS*, las coincidencias en la espacio-temporalidad de la expresión de ambos (expresión de FLOR1 en núcleo y citoplasma) y las características potenciales de FLOR1 como una LRR sugieren que esta proteína podría intervenir en vías de transducción de señales relacionadas con la regulación de la actividad de AGAMOUS, y hacen de esta proteína un interesante objeto de estudio.

Para poder estudiar el papel que FLOR1 pudiera tener se requiere de la búsqueda, caracterización molecular y análisis funcional del fenotipo de una mutante para el gen que la codifica. En este trabajo se corroboró la presencia de la inserción de T-DNA en el gen *FLOR1* para plantas de las líneas 12.19.5 y 12.8.7, y se hizo un análisis preliminar de ciertos aspectos de su desarrollo en relación a variables ambientales, en particular su respuesta a diferentes condiciones de iluminación.

A. Caracterización molecular

Las inserciones de T-DNA son más estables que las inserciones con trasposones (Krysan et al., 1999), y por ello se decidió hacer la búsqueda de una mutante para *FLOR1* hecha con este método. En este trabajo se corroboró la mutación por inserción de T-DNA en el gen *FLOR1*, localizada en el intrón del gen; para las plantas homocigas derivadas de la línea 12 (12.19.5 y 12.8.7) por medio de la amplificación por PCR del fragmento que corresponde al extremo derecho del T-DNA. El método de mutagenesis por inserción de T-DNA implica que las inserciones ocurren azarosamente (Glick y Thompson, 1993; Krysan et al., 1999), por lo tanto y aunque la probabilidad es baja, puede haber más de una inserción en cada mutante. Para corroborar que solo hay una inserción se pueden hacer

* o, como se mencionó en los Antecedentes, la posible interacción de FLOR1 con otras proteínas tipo MADS que coincidan en la espacio-temporalidad de su expresión

experimentos de hibridación tipo *Southern-blot* del genoma completo de las plantas mutantes digerido con enzimas de restricción contra una sonda (oligonucleótido marcado radioactivamente) hecha con parte de la secuencia de T-DNA. La construcción del plásmido con el fragmento del extremo derecho o *right border* del T-DNA hecho en el presente trabajo servirá para ese propósito.

La caracterización molecular de las plantas 12.8.7 y 12.19.5 mutanes para *FLOR1* implica determinar las alteraciones que pudieran presentarse en la expresión del gen a consecuencia de la inserción de T-DNA. La regulación de la expresión génica que da lugar a la síntesis de proteínas de manera diferencial en los tipos celulares de organismos eucariontes se lleva a cabo en varios niveles (Orphanides y Reinberg, 2002). La concentración celular de una proteína esta determinada por un delicado balance de al menos siete procesos (Nelson y Cox, 2000), cada uno de los cuales tiene diversos puntos de regulación (ver Tabla 10).

La concentración celular de una proteína esta determinada por un delicado balance de al menos siete procesos (Nelson y Cox, 2000), cada uno de los cuales tiene diversos puntos de regulación:
<ol style="list-style-type: none">1.- Síntesis de RNA primario (RNA mensajero)2.- Procesamiento postranscripcional (maduración o <i>splicing</i>) de mRNA3.- Degradación del mRNA4.- Síntesis de proteína5.- Modificación postraduccional de proteínas6.- Degradación de proteínas7.- Señalización de proteínas y transporte

Tabla 10. Tomada y modificada de Nelson y Cox, 2000

Como primer punto en la regulación de la expresión de un gen, la prueba de presencia de RNA mensajero en plantas mutantes es una metodología relativamente sencilla para determinar mutaciones nulas. Si la mutación en un gen es nula y si la planta es homóciga para el loci mutagenizado, la transcripción se interrumpe, lo cual impide la síntesis de RNA mensajero y por lo tanto de proteína. Las pruebas de retrotranscripción (RT-PCR) para mRNA de *FLOR1* en las líneas homócigas mutantes 12.8.5 y 12.19.7 de este trabajo resultaron positivas y por tanto podemos decir que la mutante no es nula.

Otro punto importante de la regulación de la expresión de un gen que puede monitorearse experimentalmente por secuenciación es el procesamiento postranscripcional del RNA mensajero. Durante este proceso los intrones en el RNA primario transcrito son editados rápidamente, y los exones se unen para conformar el RNA mensajero maduro y funcional (Nelson y Cox, 2000). La manera en que la edición del mRNA ocurre puede variar: algunos intrones pueden auto-editarse por medio de reacciones de transesterificación; otros requieren de la

acción de complejos RNA-proteína específicos llamados snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) que se unen a secuencias específicas en el intrón, y existe otro tipo de intrones que requieren de la acción de endonucleasas específicas (Nelson y Cox, 2000). La secuencia de T-DNA con la que se realizó la inserción en las mutantes (pD991-AP3) es relativamente grande (5, 938pb) si consideramos el tamaño del gen *FLOR1* (1310pb), y más aún si consideramos el tamaño del intrón (333pb), por lo cual se consideró la posibilidad de una alteración en la edición del mRNA de *FLOR1* encontrado en las mutantes. La secuencia del cDNA obtenido a partir del mRNA de *FLOR1* en las líneas mutantes estudiadas reveló que no había tal alteración, pues fue idéntica a la reportada previamente (Gamboa et al. 2001). Con esto podemos decir que la edición del RNA mensajero para *FLOR1* no está alterada y por tanto se exploró la hipótesis de una posible alteración en la regulación de la expresión de *FLOR1* debida a la inserción de T-DNA.

B. Búsqueda de motivos regulatorios en las regiones no codificantes de FLOR1

Aunque la mutante *flor1* que se encontró no es nula y la secuencia del mRNA para *FLOR1* es la misma que para el cDNA del tipo silvestre (la edición no está afectada), se observaron alteraciones considerables en su fenotipo las cuales pudieron haber sido provocadas por la alteración de la expresión génica de *FLOR1* debido a la inserción de T-DNA en el intrón.

Se ha postulado que el paso de mRNA a RNA maduro (la edición o *splicing* del mRNA) es un importante punto de regulación de la expresión génica, pues el equilibrio relativo entre las concentraciones de mRNA maduro e inmaduro puede determinar los niveles de expresión de las proteínas (Nelson y Cox, 2000; Orphanides y Reinberg, 2002; Luehrsen y Walbot, 1991). Tanto en plantas como en animales se ha correlacionado la presencia del primer intrón a elevados niveles de expresión y por tanto de concentración de mRNA (Sieburth y Meyerowitz, 1997; Jeon et al., 2000; Virts y Raschke, 2001). Ejemplos de ello los encontramos en el gen *Adh1* en maíz (Callis et al., 1987; Luehrsen y Walbot, 1991 citados en Jeon et al., 2000), en el gen *Sh1* (Vasil et al., 1989; Maas et al., 1991 citados en Jeon et al., 2000) y *Ubi1* también en maíz (Christensen et al., 1992); en el gen *Act1* de arroz (McElroy et al., 1990), y en el gen *PAT1* de *Arabidopsis thaliana* (Rose y Last, 1997). La inserción de T-DNA en el intrón de *FLOR1* puede estar dificultando la edición y alterando este delicado equilibrio, conservando una correcta edición, pero produciendo alteraciones en las concentraciones de mRNA maduro, inmaduro y proteína.

Además, estudios recientes han mostrado que las secuencias intrónicas pueden contener elementos reguladores de la expresión génica y no solo secuencias que permiten su correcta edición o que promueven elevados niveles de expresión. En

Drosophila melanogaster se han estudiado algunos casos en los que se logran localizar elementos regulatorios en los intrones. Por ejemplo, el primer intrón de gen 1 de la tropomiosina contiene elementos *cis*-regulatorios tanto activadores como represores que confieren su expresión temporal y músculo-específica característica (Gremke et al., 1993; citado en Sieburth y Meyerowitz, 1997). De manera similar, el gen de la tubulina $\beta 3$ contiene secuencias *enhancer* o promotoras de altos niveles de expresión en el primer intrón, las cuales regulan la expresión a lo largo del eje antero-posterior (Hinz et al., 1992; citado en Sieburth y Meyerowitz, 1997).

En plantas, experimentos de transformación con construcciones producto de la fusión de secuencias intrónicas e intragénicas de *AGAMOUS* (*AG*) con el gen reportero *GUS* en *Arabidopsis thaliana* han demostrado que características cuantitativas y espacio-temporales de la expresión de *AG* están dadas por dichas secuencias (secuencias intragénicas, que incluyen el primer y segundo intrón de *AG*) en específico la represión de la expresión vegetativa de *AG*. Dichas secuencias conforman los sitios "blanco" de genes reguladores de la expresión de *AG* como *AP1*, *LFY* o *CLF* (Sieburth y Meyerowitz, 1997). Otro ejemplo lo constituye el efecto de la inserción del trasposon *TAM3* en el segundo intrón (el más grande) del gen *PLENA* (*PLE*), homólogo para *AG* en *Antirrhinum majus*; ya que produce en el alelo mutante recesivo (*ple*) un fenotipo tipo *ag-*, con flores indeterminadas compuestas de sépalos y pétalos; mientras que en el alelo semidominante (*ovulata*) se presenta un fenotipo homeótico de conversión de sépalos a carpelos y de pétalos a estambres; y ambas observaciones son consistentes con un fenotipo de expresión ectópica de *PLE* en dichos verticilos externos (y partes vegetativas de la planta) (Bradley, et al., 1993). *PLENA* tiene una organización genómica prácticamente idéntica a *AGAMOUS* (Bradley, et al., 1993). Tanto para *AG* como para *PLE* se ha demostrado que son las secuencias intrónicas y no la influencia de las secuencias de inserción de los trasposones utilizados para la mutagenización las que provocan los patrones de expresión alterados (Bradley et al., 1993; Deyholos y Sieburth, 2000).

Otro ejemplo lo encontramos en el caso del gen *OsTubA1*, que codifica para la tubulina- α en arroz consiste de cuatro exones y tres intrones, y se expresa fuertemente en tejidos muy activos en cuanto a división celular (ápice de raíces, hojas jóvenes y flores jóvenes). En este gen el intrón 1 tiene un papel importante en la regulación de la expresión tejido-específica además de que es posible que intervenga en los mecanismos que dan lugar a una edición eficiente del mRNA dependiente del sitio de expresión (Jeon et al., 2000).

Es posible que la inserción de T-DNA en el intrón de *FLOR1* este provocando una pérdida de regulación y en consecuencia una expresión afectada (posiblemente

provocando una expresión ectópica) que cause las alteraciones observadas en el fenotipo de las líneas mutantes *flor1*.

Debido a la importancia de las secuencias intrónicas como reguladores de la expresión génica, puede considerarse la posibilidad de que las alteraciones encontradas en el fenotipo de las plantas mutantes 12.19.5 y 12.8.7 estén dadas por posibles alteraciones en la expresión de *FLOR1* ya sea por la pérdida de regulación intrónica provocada por la inserción como por la posible aportación de nuevos elementos regulatorios contenidos en la secuencia de T-DNA. En este trabajo se construyó un plásmido que contiene la secuencia del gen completo de *FLOR1*, incluida su región promotora e intrónica, el cual servirá para hacer más fácilmente otras construcciones que permitan hacer experimentos de transformación de plantas y monitoreo de la expresión, que permitan verificar si la espacio-temporalidad de la expresión de *FLOR1* en las mutantes *flor1* de estas líneas esta alterada considerablemente.

Por las consideraciones anteriores, durante este trabajo se realizó una búsqueda de motivos en la secuencia del intrón de *FLOR1* que puedan estar involucrados en la regulación de la expresión del gen por dos métodos: primero se hizo una búsqueda en el programa RSA-tools, que busca palabras cuya frecuencia esperada en el genoma no codificante de *Arabidopsis* sea mucho menor que la observada. Posteriormente estos resultados se compararon con la búsqueda realizada en a base de datos para motivos o secuencias cortas regulatorias en plantas PLACE Database. El programa de esta base de datos muestra todas las palabras encontradas que tienen antecedentes de otorgar algún tipo de regulación en otros genes de plantas. Por su naturaleza, el método de RSA-tools puede arrojar muchos falsos negativos, y el método de PLACE Database puede arrojar muchos falsos positivos. Para la secuencia intrónica se encontraron varios posibles sitios de regulación de la expresión tejido-específica y de regulación por luz. De ser positivos algunos de estos sitios como importantes motivos de regulación, a pesar de que la inserción de T-DNA no interrumpe ninguno de ellos, su función regulatoria pudo haber sido alterada por la presencia de la inserción.

De la misma manera se llevó a cabo una búsqueda de motivos en un fragmento del T-DNA (apéndice VIII) en donde también se encontraron muchos sitios de regulación de la expresión génica. Este fragmento contiene parte de la secuencia del promotor del gen AP3. Es posible que ésta secuencia al insertarse otorgara nuevos motivos de regulación en el intrón que también pudieron haber alterado la expresión de *FLOR1* en las líneas 12.19.5 y 12.8.7.

Se pueden llevar a cabo experimentos de transformación con construcciones hechas a partir de la fusión de los fragmentos clonados en este trabajo (cDNA de *FLOR1*, gen completo *FLOR1*, y fragmento de T-DNA) que permitan verificar si la espacio-temporalidad de la expresión de *FLOR1* en las mutantes de estas líneas está

alterada considerablemente y si las secuencias insertadas con el T-DNA en el intrón son las responsables de las alteraciones.

C. Análisis funcional preliminar de las mutantes flor1. Comparación de plantas mutantes vs. plantas control

Para todos los parámetros analizados en el fenotipo de las líneas mutantes se utilizaron como controles plantas de las líneas 12.27 y 12.15, las cuales resultaron negativas para la inserción de T-DNA en *FLOR1*. Estos controles son provisionales, ya que una comparación más adecuada para este tipo de estudios debe hacerse contra el tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* del mismo ecotipo que las mutantes (ecotipo Wassilewskija) ya que las líneas 12.27 y 12.15 pueden tener inserción de T-DNA en otra parte del genoma, introduciendo en el estudio la posibilidad de que esta inserción pueda afectar (aunque mínimamente) su desarrollo.

C.1. Desarrollo reproductivo

La reproducción en las líneas 12.8.7 y 12.19.5 mutantes *flor1* se verificó comparando el número de vainas bien desarrolladas y con semillas entre el número de vainas estériles y mal desarrolladas entre las plantas de líneas mutantes y las plantas de líneas control. Aunque la elevada esterilidad en las mutantes era evidente a simple vista, los resultados mostrados en la Gráfica 1 reflejan la drástica disminución de vainas viables en las mutantes. Este mal desarrollo de las vainas puede considerarse como una consecuencia del mal desarrollo floral, pues como se ve en la Figura 13 las flores en las líneas 12.19.5 y 12.8.7 también se encuentran visiblemente alteradas. Una adecuada descripción anatómica de las alteraciones en las estructuras florales de estas mutantes requiere de un análisis cuidadoso y a detalle, con técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido.

Durante los análisis del fenotipo de la mutante *flor1*, el UWBC publicó y dio más detalles acerca de la secuencia completa de la inserción de T-DNA pD991-AP3 que utilizan para la mutagenización de las plantas así como información al respecto de observaciones previas. Ellos notaron desde etapas tempranas del proyecto de creación del banco de mutantes, que había un pequeño porcentaje (ca. 10%) dentro de la población de 60,400 líneas mutagenizadas que podían exhibir problemas de esterilidad. Sugieren que la infertilidad puede estar relacionada con la presencia de secuencias del promotor del gen *APETALA3* (*AP3*) en la construcción de T-DNA utilizada para la mutagenización (UWBC, <http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis>), sin embargo decidieron continuar con el proyecto debido a la consideración de que el

porcentaje de plantas infértiles era pequeño. La esterilidad de la mutante *flor1* puede entonces estar dada por dichas secuencias. Una adecuada interpretación de la esterilidad en las mutantes de estas líneas podría obtenerse de nuevas observaciones en diferentes líneas mutantes para el gen *FLOR1*, además de que, para facilitar la interpretación sobre la función de esta proteína es importante obtener y analizar una mutante nula. El UWBC ofreció el servicio de realizar nuevamente y de manera gratuita la búsqueda de las líneas mutante deseadas si el investigador encuentra esterilidad en sus mutantes. La nueva búsqueda fue solicitada y está en proceso.

Además de la reproducción, se analizaron otros aspectos del desarrollo en las mutantes. Al graficar el promedio de la longitud del eje principal (Gráfica 3), la longitud del eje principal contra el número de vainas (Gráfica 4) y el número de ramas (Gráfica 2) se observan claramente las considerables diferencias entre las líneas 12.19.5 y 12.8.7 y las líneas controles, lo cual se corroboró después al hacer la prueba estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney. Además el comportamiento del tamaño de los internodos a lo largo del eje principal resultó diferente al hacer la regresión lineal (Gráfica 10).

C.2. Desarrollo vegetativo

Respuesta diferencial a las condiciones de luz en las plantas mutantes

En la búsqueda de motivos regulatorios en la secuencia del promotor y del intrón en *FLOR1* se encontraron diferentes motivos con secuencias que han sido encontradas anteriormente en genes cuya transcripción está regulada por la luz. En especial en el intrón, dos de estos sitios se encontraron en RSA-tools con una frecuencia observada muy alta (en comparación con la esperada) y coinciden de manera estricta con los resultados en PLACE-Database. Estos resultados sugieren la importancia de estas secuencias en la regulación de la expresión de este gen por la luz, y debido a que la inserción de T-DNA se encuentra en el intrón, se decidió crecer las líneas mutantes en diferentes condiciones de iluminación para probar si había una respuesta diferencial. Específicamente se decidió crecer las plantas en condiciones de luz continua y de fotoperiodo debido a la accesibilidad de las cámaras.

Para considerar las diferencias en los parámetros medidos entre las plantas crecidas en luz continua y fotoperiodo se utilizó la prueba estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney, de tal manera que se nos permitiera hacer una comparación de estas diferencias entre las plantas mutantes y control. Estas diferencias solo resultaron considerables en cuanto al número de ramas, lo cual puede indicar que en las líneas mutantes *flor1* 12.19.5 y 12.8.7 hay un comportamiento diferencial durante el crecimiento en las diferentes condiciones de luz (luz continua y

fotoperiodo) ya que el número de ramas aumentan en las plantas crecidas en fotoperiodo. A pesar de que no hay pérdida de la dominancia apical, pudimos encontrar diferencias considerables para la longitud del eje principal entre las plantas crecidas en luz continua y fotoperiodo. Este dato puede correlacionarse con el número de ramas: en las plantas mutantes crecidas en fotoperiodo hay un mayor número de ramas, pero una menor longitud del eje principal, mientras que cuando son crecidas en luz continua, el número de ramas disminuye y la longitud del eje principal aumenta. De esta manera las diferencias en el número de ramas y tamaño del eje principal podrían interpretarse como una disminución de la dominancia apical en las plantas mutantes cuando crecen en fotoperiodo, como una respuesta diferencial de las plantas mutantes *flor1* a las diferentes condiciones de luz.

Debemos considerar que la densidad de flujo fotónico por día recibida por las plantas en las cámaras fue diferente entre las cámaras de crecimiento de luz continua y de luz-oscuridad. La densidad de flujo fotónico recibida por las plantas por día fue mayor para las plantas crecidas en fotoperiodo (el total por 16 horas es $2.304 \times 10^7 \mu\text{moles/m}^2/\text{seg}$) y menor en la cámara de luz continua (el total por 24 horas es de $1.382 \times 10^7 \mu\text{moles/m}^2/\text{seg}$) y es posible que estas diferencias hayan provocado las diferentes tendencias de crecimiento observadas en las gráficas pero que no resultaron considerables en el análisis estadístico (en general para todas las líneas una menor producción de vainas viables, un mayor número de ramas y un menor tamaño del eje principal crecidas en fotoperiodo).

La luz regula diversos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal. La calidad y cantidad de luz son posiblemente los factores ambientales que afectan de manera más significativa el desarrollo de las plantas (Fosket, 1994). Las plantas son sumamente sensibles a las condiciones lumínicas, y responden a las diferentes intensidades de luz que reciben alterando su crecimiento o desarrollo.

Existen numerosos efectos de la luz que son independientes de la fotosíntesis, y que controlan el desarrollo y morfogénesis de la planta. Al control de la morfogénesis por la luz en las plantas se le llama fotomorfogénesis (Salisbury y Ross, 1985). Es importante diferenciar entre la acción de la luz como causante de la fotomorfogénesis y la acción de la luz como causante de la fotosíntesis. En la fotosíntesis la luz provee de toda la energía para llevar a cabo el proceso, mientras que en la fotomorfogénesis la luz actúa como activador o modulador de procesos del desarrollo (Salisbury y Ross, 1985). Bajo condiciones naturales, las plantas por lo general crecen más en altura durante la noche si es que la temperatura no es muy baja, sin embargo, la razón de esta observación puede estar dada por un mayor suplemento de agua (Öpik y Street, 1984). Las diferencias en el número de ramas entre las plantas de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 crecidas en luz continua y fotoperiodo (siendo que en las líneas control no hay diferencias) indican que éstas

no son debidas a las diferencias en la disponibilidad de carbohidratos debido al aumento en las tasas fotosintéticas durante el crecimiento en luz continua o a un mayor suplemento de agua durante las etapas de oscuridad. Como se mencionó anteriormente, las diferencias en las longitudes del eje principal pueden estar relacionadas (de manera inversa) al número de ramas, y ser solo reflejo de una disminución mayor de la dominancia apical en las plantas crecidas en fotoperiodo (comparar gráficas 5 y 7). El aumento en el número de vainas parece estar más correlacionado con el aumento en la longitud de las ramas.

Diversos estudios han dado evidencia de que las secuencias posteriores o "rio abajo" (*downstream*) del sitio de inicio de la transcripción (5'→3'), que incluye secuencias codificantes y no codificantes, son importantes para aspectos de regulación de la expresión génica en respuesta a las diferentes condiciones de luz. La abundancia del mRNA del gen Ferredoxina 1 (Fed-1) en chícharo está modulada por elementos regulatorios que responden a la luz localizados en las secuencias 3' del inicio de la transcripción (Dickey et al., 1994). En otro gen de chícharo, plastocianina E (*PetE*), cuya expresión está regulada por la luz, se ha visto que se requieren tanto las regiones codificantes 3' del inicio de la transcripción como las regiones 5' no codificantes para la regulación luminico-dependiente (Helliwell et al., 1997). Algunos elementos regulatorios que actúan en respuesta a la luz en el gen *psaDb* de *Nicotiana glauca* se han localizado también en las regiones codificantes (Yamamoto et al., 1997).

Sin embargo son pocos los estudios que correlacionan la respuesta diferencial en la expresión de los genes en respuesta a la luz con elementos regulatorios en las secuencias intrónicas. Por ejemplo, la expresión del gen *PsaD* de espinaca está regulada por las condiciones lumínicas, y se ha demostrado que las secuencias intrónicas contribuyen a dicha expresión dependiente de la luz (Bolle, et al., 1996). No puede descartarse la posibilidad de que la respuesta diferencial a las condiciones lumínicas en las líneas mutantes 12.19.5 y 12.8.7 *flor1* este dada por alteraciones en la expresión de esta proteína dadas por la inserción de T-DNA en el intrón.

Alteraciones en el fenotipo de las mutantes flor1.

Las alteraciones encontradas en las plantas mutantes *flor1* 12.19.5 y 12.8.7 en cuanto al crecimiento y la dominancia apical podrían sugerir la participación de *FLOR1* en las vías de señalización que integran aspectos que regulan el crecimiento, como son la percepción y respuesta a las condiciones de luz y la regulación del crecimiento y desarrollo por fitohormonas, con los aspectos que subyacen a la regulación de la morfogénesis y desarrollo floral.

Es desde hace tiempo conocido y bien documentado que las hormonas vegetales afectan la división y la elongación celular (Kende y Zeevaart, 1997), regulando así el crecimiento vegetal. Las auxinas están bien identificadas como las moléculas señalizadoras principales para el fototropismo, y son definidas principalmente por su papel de promoción del crecimiento celular por elongación, regulando la elongación de los internodos y de las hojas jóvenes; además de que son importantes en el mantenimiento de la dominancia apical (Fosket, 1994). Otro tipo de hormonas que afectan el crecimiento vegetal son las giberelinas. Se han descrito muchas mutantes que afectan la altura de las plantas en maíz relacionadas con giberilinas, sobre todo mutantes enanas llamadas *dwarf* (Howell, 1998). El fenotipo de estas mutantes puede recuperarse con tratamientos con ácido giberélico (GA). En *Arabidopsis* se ha identificado una mutante "insensible" a GA: *GA insensitive* (*gai*), que tiene un fenotipo enano, un mayor número de ramificaciones y hojas más delgadas y verdes, además de que algunas de estas mutantes no producen flores fértiles en luz continua (Howell, 1998). Otras mutantes relacionadas con GA que afectan la estatura de las plantas debido a un incremento en la función GA pertenecen a diferentes alelos del gen *spindly* (*spy*) en *Arabidopsis*, los genes *la* y *cry* en chícharo, *pro* en tomate y *sln* en cebada (Howell, 1998). Todas estas mutantes, además de tener internodos elongados tienen otras características como esterilidad de los estambres y altos niveles de α -amilasa en germinados.

Las plantas crecen en altura ya sea por la adición de internodos o por la elongación de los internodos. El crecimiento de los tallos ocasionado por exceso de auxinas o giberilinas en una plantas se observa, además del mayor tamaño, en los internodos más grandes. Para verificar si el mayor tamaño en el eje principal de las plantas 12.19.5 y 12.8.7 estaba dado por un mayor número de internodos o por la elongación de los mismos se hicieron varias observaciones. Se midió el tamaño de los internodos del eje principal desde el ápice hasta la base del tallo en las plantas mutantes y en las plantas control, y se observó que el tamaño de los internodos entre ellas no es considerablemente mayor (aunque como se discutirá más adelante, el comportamiento es diferente, pues en las plantas control el tamaño de los internodos aumenta conforme se acercan a la base del tallo, mientras que en las mutantes no), además de que se hicieron observaciones de cortes de tallo en los internodos al microscopio (estos datos no se muestran) en los cuales no se observaron diferencias considerables en el tamaño de las células; todo lo cual indica que el mayor tamaño en el eje principal encontrado en las mutantes *flor1* se debe a la adición de internodos por la presencia de un mayor número de células y no a la elongación de las ya existentes y una consecuente elongación de los internodos.

Citocininas y respuesta diferencial a las condiciones luminicas.

Las citocininas son fitohormonas que se han relacionado con el crecimiento y elongación por división celular, aumentando el número de células. Las citocininas son consideradas generalmente como reguladores del crecimiento que afectan diversos procesos como división celular, inducción de tallo, inhibición de la senescencia y crecimiento de la raíz (Mok et al., 2000), además de que promueve organogénesis en callos producto de cultivo de tejidos (Salisbury y Ross, 1985). La aplicación de citocininas al medio de crecimiento de plantas resulta en un fenotipo de reducción de la dominancia apical y de la longitud internódica, además de senescencia retardada (Medford, et al., 1989). El mayor número de ramas en las líneas 12.19.5 y 12.8.7 puede interpretarse como una disminución de la dominancia apical, y aunque los internodos no son considerablemente mas grandes que en las líneas control, su comportamiento en la Gráfica 10 de regresión lineal indica que, a diferencia de las plantas control, no se hacen más grandes hacia la base del tallo; todo lo cual podría ser congruente con una sobreproducción o alta sensibilidad a citocininas y hace de esta hormona un buen candidato para enfocar esfuerzos futuros en el estudio y análisis de estas mutantes.

Un fenómeno que correlaciona la concentración de fitohormonas con los estímulos luminosos es el fenómeno de etiolación. Las semillas que germinan en la oscuridad tienen características diferentes a las de las semillas que germinan a la luz: presentan una rápida y extensiva elongación de los internodos, no ocurre expansión y crecimiento de las hojas, los cloroplastos no se desarrollan y la planta tiene una coloración amarilla y el hipocotilo permanece con forma de gancho y se elonga rápidamente (Fosket, 1994). Se dice que las semillas que tienen estas características por haber germinado en la oscuridad están etioladas (Fosket, D. 1994). Cuando una semilla germina y emerge a la superficie del suelo, comienza a estar expuesta a la luz; y entonces se activa el programa de desarrollo llamado fotomorfogénesis, y las semillas comienzan a de-etiolarse (los cotiledones adquieren color verde y comienzan a crecer como una semilla normal crecida en luz) (Howell, 1998). La fotomorfogénesis o de-etiolación ha sido estudiada intensamente como un proceso del desarrollo que ofrece un contexto para investigar las vías de transducción de señales de respuesta a la luz (Howell, 1998). El fenómeno de etiolación indica que la luz tiende a suprimir el crecimiento por elongación, a promover la expansión de las hojas y la diferenciación celular (Öpik y Street, 1984). Se han identificado varios mutantes fotomorfogénicos del desarrollo en *Arabidopsis*. La mayoría de los mutantes *hy* (*long hypocotil*) tienen defectos en los fotorreceptores, pero no en otros pasos de la vía de transducción de señales para la luz. Al germinar sus semillas a la luz, los hipocótilos se elongan rápidamente (como si estuvieran en la oscuridad) (Koorneef, et al. 1980). En *Arabidopsis*, la fotomorfogénesis puede ser activada por diferentes regiones del espectro lumínico, activando diferentes fotorreceptores; sin embargo, los mutantes para los diferentes fotorreceptores tienen el mismo fenotipo durante su etapa de

germinación (hipocótilos elongados), lo cual indica que los diferentes fotorreceptores canalizan sus señales hacia la misma ruta de fotorrecepción (Howell, 1998). La apicación externa de citocininas puede producir un fenotipo de-etiolado en semillas creciendo en la oscuridad. Se han encontrado una serie de mutantes en las cuales la fotomorfogénesis se activa incluso en la oscuridad. Estas mutantes llamadas de-etioladas o mutantes *det* tienen hipocótilos cortos y cotiledones abiertos cuando crecen en oscuridad (características típicas de las semillas que germinan a la luz) (Chory et al., 1989). Se han aislado otro tipo de mutantes similares a *det*; los mutantes *cop* (*constitutive photomorphogenic*) que además de presentar hipocótilos cortos y cotiledones abiertos, presentan diferenciación de cloroplastos cuando se germinan en oscuridad (Deng y Quai, 1992). En una de estas mutantes; *DET1*, se expresan genes que requieren la presencia de luz para ello, como los que codifican para la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo), y a pesar de que se piensa que *DET1* controla la expresión específica de estos genes en respuesta a la luz, no es una proteína de unión al DNA (Pepper, et al. 1994).

Durante este trabajo se hicieron experimentos de germinación de semillas de mutantes *flor1* en oscuridad (estos datos no se muestran), con la finalidad de analizar la posibilidad de sobreproducción de citocininas o alteraciones en la fotorrecepción, y se observaron las características de fenotipo etiolado típico. La germinación de las semillas de las líneas mutantes *flor1* en oscuridad no resultó diferente a la de tipo control. Si correlacionamos este resultado con las mutaciones tipo *hy* (y suponiendo que la expresión de *FLOR1* esta alterada en las líneas estudiadas), puede afirmarse que las diferencias observadas en las plantas de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 no son debidas a alteraciones en la percepción de la luz, siendo que las alteraciones son posteriores (río abajo o *downstream*), posiblemente en las vías de señalización que regulan la concentración de fitohormonas y factores de crecimiento en respuesta a la luz. Aunque se descarta el efecto de la sobreexpresión de citocininas a este nivel, no puede descartarse la posibilidad de una sobreproducción de esta hormona de manera muy local (por ejemplo en regiones particulares del meristemo donde *FLOR1* se expresa) o posterior a la germinación. Se han encontrado dos mutantes de sobreproducción de citocininas en *Arabidopsis*: *amp1* y *cri1* (Catterou, et al. 2002) de los cuales se ha identificado y caracterizado el gen y su papel en el desarrollo, y se ha visto que no están relacionados con las rutas metabólicas de la citocinina (Catterou, et al. 2002). No se han encontrado mutantes del metabolismo de citocininas que tengan una concentración disminuida de la hormona. Se han hecho estudios de reducción de la concentración de citocininas por ingeniería genética de la citocinin-oxidasa en tabaco (Werner, et al. 2001). El fenotipo resultante en estas plantas es antagónico a las líneas *flor1* 12.19.5 y 12.8.7 en cuanto a que son "enanás" a causa de una menor tasa de división celular (Werner, et al. 2001).

La inhibición de la elongación por la luz puede implicar un efecto en la cantidad de hormonas en la planta y en la sensibilidad de las células a estas hormonas (Öpik y Street, 1984). El funcionamiento de las hormonas vegetales es complejo y solo esta parcialmente conocido, comprendiendo una compleja regulación del desarrollo por concentraciones diferenciales de las distintas hormonas. Basta considerar los descubrimientos clásicos de Skoog y Miller (1957) de que un alto nivel de citocinina y un bajo nivel de auxina promoverán la formación de tallo, mientras que bajos niveles de citocinina y altos niveles de auxina promoverán el desarrollo de raíces. Resulta difícil interpretar la posibilidad de la alteración de concentraciones hormonales como las citocininas en las líneas 12.19.5 y 12.8.7 con base solo en las características fenotípicas observadas en este trabajo.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

VII. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se corroboró la inserción de T-DNA en el intrón del gen *FLOR1* para las plantas 12.19.5 y 12.8.7. Esta inserción no produce que la mutante sea nula pues se encontró presencia de RNA mensajero de *FLOR1*. La secuenciación del mRNA mostró que la edición o *splicing* no estaba alterada. Se requieren de análisis de hibridación tipo Southern-blot para la verificación de una sola inserción en estas líneas. La construcción del plásmido que contiene el fragmento del extremo derecho del T-DNA hecha en este trabajo servirá para la síntesis de la sonda necesaria para dicha hibridación.

A pesar de que la edición del mRNA no está alterada, se encontraron diferencias considerables y significativas según la prueba estadística utilizada al comparar diversos aspectos del desarrollo entre las líneas mutantes *flor1* y las plantas control como son:

- Drásticos niveles de esterilidad
- Longitud mayor en el eje principal
- Mayor número de ramificaciones
- La longitud de los internodos no se hace más grande hacia la base del talo

El número mayor de vainas o flores secundarias en el eje principal tanto en plantas mutantes *flor1* como controles está correlacionado con el tamaño del eje.

Las alteraciones en cuanto al crecimiento y disminución de la dominancia apical que responde de manera diferencial a las condiciones de luz continua y fotoperiodo, así como los antecedentes de *FLOR1* sugieren que esta proteína podría estar involucrada en las vías de señalización que integran la transducción de señales hormonales y de fotorrecepción con el desarrollo tanto vegetativo como reproductivo en *Arabidopsis thaliana*.

Estas diferencias pueden deberse a alteraciones en los patrones normales de expresión de *FLOR1* debido a la inserción de T-DNA. Para detectar los posibles cambios en los niveles y sitios de expresión pueden hacerse análisis de reverso-transcripción del mRNA de *FLOR1* en los diferentes tejidos y en diferentes etapas del desarrollo y cuidadosos experimentos de hibridación tipo Northern-blot.

La construcción del plásmido con la secuencia del gen completo de *FLOR1*, incluida su región promotora y su intrón así como el plásmido con la secuencia de T-DNA servirán para hacer experimentos de transformación de plantas en los que

se analice el papel que tiene la inserción y secuencia de T-DNA en las alteraciones fenotípicas observadas así como las posibles alteraciones en la expresión génica de *FLOR1* en las líneas mutantes 12.19.5 y 12.8.7.

Se requiere de una mutante nula para poder hacer un mejor análisis funcional y una adecuada interpretación del papel que tiene *FLOR1* durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. También se requiere de un control más adecuado para la comparación y análisis del fenotipo de las líneas 12.19.5 y 12.8.7 como serían plantas de *A. thaliana* tipo silvestre del mismo ecotipo de las plantas mutantes

VIII. Bibliografía

Alvarez-Buylla, E., Pelaz, S., Liljegen, S.J., Gold, S.E. S.E., Burgueff, C., Ditta, G.S., Rivas de Pouplana Ll., Martinez Castilla, L., & Yanofsky, M.F. (2000). **An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals.** *Proc. Nac. Acad. Sci.* 97: 5328-5333.

Alvarez-Buylla, E., Liljegen, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgueff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F., & Yanofsky, M.F. (2000). **MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes.** *Plant Journal.* 24: 457-466

Alvarez, J. & Smyth, DR. (1999). **CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS.** *Development* 126, 2377-2386

Angenent, G.C. & Colombo, L. (1996). **Molecular control of ovule development.** *Trends Plant Sci.* 1:228-232

Arthur, W. (2001) **The emerging conceptual framework of evolutionary development.** *Nature* 415(6873):757-64.

Ausubel FM, Katagiri F, Mindrinos M, Glazebrook J. (1995) **Use of Arabidopsis thaliana defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9:92(10):4189-96.

Bassett CL, Nickerson ML, Cohen RA, Rajeevan MS. (2000) **Alternative transcript initiation and novel post-transcriptional processing of a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase gene that responds to short-day photoperiodic floral induction in morning glory (Ipomoea nil).** *Plant Mol Biol.* 43(1):43-58.

Baudino S, Hansen S, Bretschneider R, Hecht VF, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky PM. (2001) **Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family.** *Planta.* 213(1):1-10.

Blázquez, M. A. (2000). **Flower development pathways.** *J. Cell Science.* 113: 3547-3548.

Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N., & Coen, E. (1993). **Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*.** *Cell* 72: 85-95

Bolle, C., Herrmann, R.G., and Oelmüller, R. (1996). **Intron sequences are involved in the plastid- and light- dependent expression of the spinach *PsaD* gene.** *Plant J.* 10(5): 919-924.

Bowman, J. (1994) ***Arabidopsis*. An Atlas of Morphology and Development.** Spinger-Verlag. New York. 450 pp.

Busch, M., Bomblies, K. and Weigel, D. (1999) **Activation of a Floral Homeotic Gene in *Arabidopsis*.** *SCIENCE*. 285:585-587.

Callis J, Fromm M, Walbot V. (1987). **Introns increase gene expression in cultured maize cells.** *Genes Dev* 1: 1183-1200.

Carroll, S.B., Grenier, J.K. & Weatherbee, S.D. (2001). **From DNA to Diversity. Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design.** *Blackwell Science, USA*.

Catterou, M., Dubois, F., Smets, R., Vaniet, S., Kichey, T., Onckelen, H., Sangwan-Norrel, B.S., & Sangwan, R.S. (2002) ***hac*: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high *in vitro* organogenic capacity.** *The Plant Journal*. 30(3):273-287

Chory, J., Peto, C., Fienbaum, R., Pratt, L., and Ausubel, F. (1989). ***Arabidopsis thaliana* mutant develops as a light-grown plant in the absence of light.** *Cell* 58: 991-999

Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). **Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplast by electroporation.** *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.

Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM. (1997) **The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*.** *Cell*. 16;89(4):575-85

Coen, E. S. & Meyerowitz, E.M. (1991) **The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development.** *Nature*. 353: 31-37.

Conner, J. & Liu, Z. (2000). **LEUNIG**, a putative transcriptional corepressor that regulates **AGAMOUS** expression during flower development. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 97(23),12902-12907

Cronquist, A. (1968) **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. Thomas Nelson Printers. London 396pp.

Cronquist, A. (1971). **Introducción a la Botánica**. Editorial Continental, México. 848 pp.

Davies, B. y Shwarz-Sommer, Z. (1994) **Control of Floral Organ Identity by Homeotic MADS-Box Transcription Factors**. *Results Probl. Cell Differ.* 20: 235-58

Deng, X. W. & Quail, P.H. (1992). **Genetic and phenotypic characterization of cop-1 mutants of *Arabidopsis thaliana***. *Plant J.* 2: 83-95.

Deyholos, M.K. & Sieburth, L.E. (2000). **Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the AGAMOUS second intron**. *Plant Cell* 12(10): 1799-1810.

Dickey, L.F., Nguyen, T.T., Allen, G.C. and Thompson, W.F. (1994). **Light modulation of ferredoxin mRNA abundance requires an open reading frame**. *Plant Cell.* 6(8): 1171-1176

Doerner, P. (2000). **Plant stem cells: The only constant thing is change**. *Current Biology*, 10(22)R826-R829

Ellis, J., Dodds, P. & Pryor, T. (2000) **The generation of plant disease resistance gene specificities**. *Trends Plant Sci*; Sept;5(9):373-379

Endress, P.K. (2001). **Origins of flower morphology**. *Journal of Exp. Zool. (Mol Dev Evol)* 291:105-115

Fletcher, J. (2002) **Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem**. *BioEssays*, 24: 27-37

Fosket, E. D. (1994) **Plant Growth and Development, A Molecular Approach**. Academic Press. California. 580pp.

Freund, J.E. y Sinon, A.G. (1992). **Estadística Elemental, Octava Edición**. Prentice-Hall, Inc. México. 566 pp.

Gamboa, A., et al. (2001). **Floral Transcription Factor AGAMOUS interacts *in vitro* with a Leucine-Rich Repeat and Acid Phosphatase Protein Complex.** *Bioch. Biophys. Res. Com.* 288, 1018-1026

Glick, B.R. & Thompson, J.E. (compilers) (1993). **Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology.** CRC Press, Boca Raton, Florida. 360 pp.

Gustafson-Brown, C., Savidge, B. & Yanofsky, M.F. (1994). **Regulation of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene APETALA1.** *Cell* 76:131-143

Hake, SB., Masternak, K., Kammerbauer, C., Janzen, C., Reith, W. & Steimle, V. (2000) **CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization, *in vivo* recruitment to the major histocompatibility complex (MHC) class II enhanceosome, and MHC class II gene transactivation.** *Mol Cel Biol*, Oct.20(20):7716-7725

Helliwell, C.A., Webster, C.I. and Gray, J.C. (1997). **Light-regulated expression of the pea plastocyanin gene is mediated by elements within the transcribed region of the gene.** *Plant J.* 12(3): 499-506.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M & Korenaga T. (1999) **Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database.** *Nucl Ac. Res.* 27(1):297:300

Hipskind JD, Nicholson RL, Goldsbrough PB. (1996). **Isolation of a cDNA encoding a novel leucine-rich repeat motif from Sorghum bicolor inoculated with fungi.** *Mol Plant Microbe Interact.* 9(9):819-25.

Howell, S. H. (1998). **Molecular Genetics of Plant Development.** Cambridge University Press. UK. 365pp.

Immink, R.G., et al. (2002). **Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells.** *PNAS* 99(4):2416-2421

Jack, T. (2000) **Plant development going MADS.** *Plant Mol. Biol.* 46(5):515-20

Jack, T. (2002). **New members of the floral organ identity AGAMOUS pathway.** *TRENDS in Plant Science.* 7(7):286-287

Jarvis, E. E., Clark, K. L. & Sprague, G. F. 1989. **The yeast transcription activator PRTF, a homolog of the mammalian serum response factor, is encoded by the MCM1 gene.** *Genes Dev.* 3:936-45

Jeon, J-S., Lee, S., Jung, K-H., Jun, S-H., Kim, C. and An, G. (2000). **Tissue-Preferential Expression of a Rice α -tubulin gene OsTubA1, mediated by the first intron.** *Plant Phys.* 123: 1005-1014.

Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE. (1999) **The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase.** *Plant Cell.* 11(10):1925-34.

Kajava, A. V. (1998). **Structural Diversity of Leucine-rich Repeat Proteins.** *J. Mol.Biol.* 277:519-527

Kende, H. & Zeevaart J. (1997). **The Five "Classical" Plant Hormones.** *The Plant Cell.* 9: 1197-1210

Koorneef, M., Rolff, E., and Spruit, C.J.P. (1980). **Genetic control of light-inhibited hypocotil elongation in Arabidopsis thaliana L Heynh.** *Z. Pflanzenphysiol.* 100: 147-160

Koorneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A., & Soppe, M. (1998). **Genetic control of flowering time in Arabidopsis.** *Annu. Rev. Plant Physiol.,* 49:345-70

Kobe, B. & Kajava, A. (2001). **The leucine-rich repeat as a protein recognition motif.** *Curr. Op. Struc. Biol.* 11:725-732

Krysan, PJ., Young, JC. & Sussman, M.R. (1999) **T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis.** *The Plant Cell.* 11:2283-2290.

Lawton-Rauh A.L., Alvarez-Buylla, E.R. & Purugganan, M.D. (2000) **Molecular evolution of flower development.** *TREE* 15, 4

Lenhard, MAB; Jurgebs, G & Laux, T. (2001) **Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS.** *Cell,* 105:805-814

Li J, Chory J. (1997) **A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction.** *Cell.* 5;90(5):929-38.

Linhoff, M., Harton, J., Cresman, D., Martin, B. and Ting, J. (2001) **Two distinct domains within CIITA mediate self-association: involvement of the GTP-binding and leucine-rich repeat domains.** *Mol Cell Biol.* 21:3001-3011

Liu, Z. & Meyerowitz, EM. (1995) **LEUNIG regulates AGAMOUS expression in Arabidopsis flowers.** *Development*, 121, 975-991

Luehrsen K.R., & Walbot, V. (1991). **Intron enhancement of gene expression and splicing efficiency of introns in maize cells.** *Mol. Gen. Genet.* 225:81-93

Maas, C. Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., and Werr, W. (1991). **The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold.** *Plant Mol. Biol.* 24: 449-463.

Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y. (2002). **An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine.** *Science.* 24;296(5572):1470-2.

McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., and Wu, R. (1990). **Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation.** *Plant Cell.* 2: 163-171

Mendoza, L.; Thieffry, D., & Alvarez-Buylla, E. (1999). **Genetic control of flower morphogenesis in Arabidopsis thaliana: a logical analysis.** *Bioinformatics.* 15 (7/8):593-606

Mizukami, Y., & Ma, H. (1995). **Separation of AG function in floral determinancy from that in reproductive organ identity by expressing antisense AG RNA.** *Plant Mol. Biol.* 28:767-784

Mizukami, Y., & Ma, H. (1997). **Determination of Arabidopsis Floral Meristem Identity by AGAMOUS.** *The Plant Cell.* 9:393-408

Mok, M.C., Martin, R.C. & Mok, D.W.S. (2000). **Cytokinin biosynthesis, metabolism and perception.** *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant.* 36:102-107

Mutai, H., Toyoshima, Y. Sun, W, Hattori, N., Tanaka, S. and Shiota, K. (2000) **PAL31, a novel nuclear protein, expressed in the developing brain.** *Biochem Biophys Res Comm.* 274:427-433

Nelson, D. & Cox, M. (2000) **Lehninger. Principles of Biochemistry.** Worth Publishers. USA, 1152pp.

Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. & Treisman, R. (1988). **Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element.** *Cell* 55: 989-1003

Orphanides, G. & Reinberg, D. (2002) **A Unified Theory of Gene Expression.** *Cell* 108:439-451

Pelaz, S., Tapia-López, R. Alvarez-Buylla, E.R. & Yanofsky, M.F. (2000). **Conversion of leaves into petals in Arabidopsis.** *Current Biology* 11:182-184

Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D., and Chory, J. (1994). **DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in Arabidopsis, encodes a novel nuclear-localized protein.** *Cell* 78: 109-116.

Purugganan, MD. (1998). **The Molecular Evolution of Development.** *Bioessays* 20(9):700-11

Raff, R.A. (2000). **Evo-Devo: the evolution of a new discipline.** *Nature Rev. Gen.* 1: 74-79

Raven, P.H.; (1992). **Biology of Plants, Fifth Edition.** Worth Publishers. New York. 791pp.

Riechmann, J.L. & Meyerowitz, E. M. (1997). **MADS domain proteins in plant development.** *Biol. Chem.* 378: 1079-1101

Rose, A.B. & Last, R.L. (1997). **Introns act post-transcriptionally to increase expression of the Arabidopsis thaliana tryptophan pathway gene PAT1.** *Plant J.* 11: 455-464.

Rounsley, S.D., Ditta, S.G.S., & Yanofsky, F. (1995). **Diverse roles for MADS Box genes in Arabidopsis development.** *The Plant Cell* 7: 1259-1269

Sakamoto K, Tada Y, Yokozeki Y, Akagi H, Hayashi N, Fujimura T, Ichikawa N.(1999) **Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats.** *Plant Mol Biol.* 40(5):847-55.

Salisbury, F. & C.W. Ross (1985) **Plant Physiology.** Third Edition. Wadsworth Publishing Company. California. 540 pp.

Shaw, C.H. (1988) **Plant Molecular Biology.** Irl Press, Oxford. 313 pp.

Shore, P & Sharrocks, A. D. 1995. **The MADS-box family of transcription factors.** *Eur. J. Biochem.* 229:1-13

Sieburth, L & Meyerowitz, E. (1997) **Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spacial regulation are located intragenically.** *The Plant Cell*, Vol.9, 355-365.

Simpson, G.G., Gendall, A.R., & Dean, C. (1999). **When to switch to flowering.** *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 99:519-550

Sommer, H., Beltrán, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.-E., Saedler, H. & Schwarz-Sommer, Z. 1990. ***DEFICIENS*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors.** *EMBO J.* 9: 605-13

Steinmayr M, Motte P, Sommer H, Saedler H, Schwarz-Sommer Z. (1994) ***FIL2*, an extracellular Leucine-Rich Repeat protein, is specifically expressed in *Antirrhinum* flowers.** *Plant J.* 5(4):459-67.

Takemoto D, Hayashi M, Doke N, Mishimura M, Kawakita K.(2000). **Isolation of the gene for EILP, an elicitor-inducible LRR receptor-like protein, from tobacco by differential display.** *Plant Cell Physiol.* 41(4):458-64

Telfer, A. & Poeting, R.S. (1998). **HASTY: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*.** *Development* 125:645-54

The Arabidopsis Genome Initiative, (2000). **Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.** *Nature.* 408: 796-814

Theissen G., et. al. (2000) **A short history of MADS-box genes in plants.** *Plant Molecular Biology* 42: 115-149.

Theissen G., & Saedler, H. (1995) **MADS-Box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited.** *Curr. Op. Gen. Dev.* 5:628-639

Theissen G., & Saedler H. (2001) **Floral quartets.** *Nature* Vol.409. 25 January 2001. 469-471

Theissen G (2001) **Development of floral organ identity: stories from the MADS house.** *Curr Opin Plant Biol* 4:75-85.

Tong, ZB; Nelson, LM and Dean, J. (2000). **Mater encodes a maternal protein in mice with a leucine-rich repeat domain homologous to porcine ribonuclease inhibitor.** *Mamm Genome* 11:281-287

Tornero P, Mayda E, Gomez MD, Canas L, Conejero V, Vera P. (1996) **Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis.** *Plant J.*10(2):315-30.

Vasil, V., Clancy, M., Ferl, R.J., Vasil, I., & Hannah, L.C. (1989). **Increased gene expression by the first intron of maize *Shrunken-1* locus in grass species.** *Plant Physiol.* 91: 1575-1579

Virts, E.L. & Raschke, W. (2001). **The Role of Intron Sequences in High level Expression from CD45 cDNA Constructs.** *J. Biol. Chem.* 276(23):19913-19920.

Von Dassow, G., & Munro, E. (1999) **Modularity in Animal Development and Evolution: Elements of a Conceptual Framework for EvoDevo.** *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 285:307-325

Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. (1999) **The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes.** *Plant J.* 19(1):55-64

Weigel, D. (1995) **The genetics of flower development.** *Annu. Rev. Genet.* 29, 19-39

Weigel, D., and Meyerowitz, E.M. (1994). **The ABCs of floral homeotic genes.** *Cell* 78, 203-209

Worrall, D., Elias, L., Ashford, D., Smallwood, M., Sidebottom, C., Lillford, P., Telford, J., Holt, C. and Bowles, D. (1998) **A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization.** *Science* 282:115-117.

Xu, P., Mitchelhill, K., Kobe, B., Kemp, B. and Zot, H. (1997) **The myosin-I-binding protein Acan125 binds the SH3 domain and belongs to the superfamily of leucine-rich repeat proteins.** *Proc Natl acad Sci USA*, 94:3685-3690

Yamamoto, Y.Y., Kondo, Y., Kato, A., Tsuji, H. and Obokata, J. (1997). **Light responsive elements of the tobacco PSI-D gene are located both upstream and within the transcribed region.** *Plant J.* 12(2): 255-265.

Yanofsky, M.F. (1995) **Floral meristems to floral organs: genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46, 167-188

Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L. , Drews, G. N., Feldmann, K. A. & Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-40

Zar, HJ. (1974). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 620 pp.

IX. Apéndice

Protocolos

I. Extracción de DNA por el método de CTAB.

- 1.- Congelar tejido en nitrógeno líquido y moler con pistilo en un tubo eppendorf de 1.5 μ l.
- 2.- Agregar 600 μ l de buffer de extracción CTAB. (CTAB 2%, Tris pH 8.0 100mM, EDTA 20mM, NaCl 1.4M, PVP 40 2% y β -Mercaptoetanol 0.2%) Agregar el β -Mercaptoetanol al utilizar el buffer.
- 3.- Calentar 1 hora a 65°C con agitación ocasional.
- 4.- Centrifugar durante 10 minutos a 9,000 rpm. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 5.- Agregar 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamilico 24:1.
- 6.- Centrifugar 10 minutos a 9000 rpm. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 7.- Agregar 412.5 μ l de Isopropanol frío.
- 8.- Incubar por 30 minutos a 20°C.
- 9.- Centrifugar durante 5 minutos a 5,000 rpm.
- 10.- Lavar el pellet con EtOH 70%. Resuspender en 50 μ l de ddH₂O y agregar 1 μ l de RNAsa. Mantener durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C.

II. Preparación de geles de agarosa (1%) para electroforésis

Para 100ml:

- 1.- Pesar 1g de agarosa.
- 2.- Agrerar a 100ml de TBE 5%.
- 3.- Calentar con agitación ocasional hasta que el agarosa se disuelva completamente.
- 4.- Dejar enfriar. Antes de solidificar agregar 6 μ l de Bromuro de Etidio (por cada 100ml de TBE).
- 5.- Vaciar en charolas y dejar cuajar. Guardar a 4°C hasta su uso.

III. Extracción de DNA a partir del gel de agarosa por el método de fibra de vidrio siliconizada.

- 1.- En un tubo de eppendorf de 0.6ml hacer una perforación con una aguja estéril muy fina en la parte inferior.
- 2.- Llenar el tubo con fibra de vidrio siliconizada.
- 3.- Poner este tubo dentro de otro tubo eppendorf de 1.5ml (tubo colector).
- 4.- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad.
- 5.- Quitar el sobrenadante cuidando el pellet, que es muy transparente y se despegas de las paredes. Hacerlo con pipeta.
- 6.- Lavar el pellet con EtOH 70%
- 7.- Centrifugar durante 3 minutos a máxima velocidad.
- 8.- Dejar secar el pellet (se puede dejar secar durante no más de 10 minutos a 37°C).
- 9.- Resuspender en 10 μ l de TE o ddH₂O.

IV. Extracción de RNA total con Trizol (TRI REAGENT, Molecular Research Center, Inc., E.U.A. Núm. Cat. TR118).

Trabajar en condiciones estériles.

- 1.- Colocar 100 mg de tejido en un tubo eppendorf. Congelar en nitrógeno líquido y moler con pistilo.
- 2.- Agregar 1ml de TRI REAGENT y homogeneizar por pipeteo. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente.
- 3.- Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRI REAGENT. Agitar por 15 segundos. Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 4.- Centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C. En este paso se separan las fases.
- 5.- Transferir la fase acuosa, superior e incolora (alrededor de 600 μ l si comenzaste con 1ml de TRI REAGENT) a un nuevo tubo.
- 6.- Agregar 0.5 μ l de isopropanol por cada ml de TRI REAGENT empleado para precipitar. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 7.- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 8.- Remover el sobrenadante. Lavar el pellet con 1 ml de EtOH 75% por cada ml de TRI REAGENT utilizado por pipeteo. Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- 9.- Remover el EtOH y dar un spin para eliminar la mayor cantidad posible de etanol sin tocar el pellet.
- 10.- Resuspender en 30 μ l de ddH₂O y añadir 1 μ l de inhibidor de RNAsas. Guardar a -20°C hasta su uso.

V. Transformación de bacterias por choque de calor (Tomado y modificado del Manual: *pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems*, Promega)

Trabajar en presencia de mechero.

- 1.- Descongelar células competentes TOP-10 en hielo.
- 2.- Añadir 50 μ l de células competentes TOP-10 a cada tubo que contiene la reacción de ligación. (con el vector pGEM-T Easy). Mezclar suavemente por pipeteo.
- 3.- Incubar en hielo por 20 minutos.
- 4.- (Choque de calor) Incubar las células a 42°C de 45 a 50 segundos y regresar inmediatamente al hielo.
- 5.- Añadir 850 μ l de medio LB líquido a cada tubo. Incubar durante 1 ½ hora a 37°C con agitación.
(Durante ese tiempo se pueden preparar las placas de medio LB con carbenicilina previamente listas con 20 μ l de X-Gal (50 mg/ml) y 100 μ l de IPTG (0.1 M) distribuido con perlas o asa de vidrio)*
- 6.- Centrifugar durante 2 minutos a 12, 500 rpm.
- 7.- Retirar 900 μ l de sobrenadante. Resuspender el pellet en los 100 μ l de medio restantes en el tubo y plaquear con 50 μ l de esta mezcla para cada caja de petri.
- 8.- Incubar toda la noche a 37°C. Posteriormente guardar a 4°C.

*X-Gal (2ml)

100mg 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosida (num. catálogo V3941, Promega)
Disolver en 2ml N, N'-dimetil-para-mamida. Cubrir con alumini y guardar a -20°C
IPTG (0.1M)

1.2g IPTG (num. catálogo V3951, Promega)

Agregar agua a un volumen final de 50ml. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

Selección de cepas transformantes:

- 1.- EL vector pGEMT-Easy contiene un gen de resistencia a antibiótico y el operón lac, con el gen codificante para la β -galactosidasa. La inserción interrumpe la transcripción en la secuencia de la β -galactosidasa, lo que permite la selección por coloración al crecer las cepas en placas con X-Gal e IPTG.
- 2.- Las cepas seleccionadas positivamente se pican con palillos estériles en presencia de mechero, y se crecen en tubos de LB con carbenicilina durante 24 horas a 37°C con agitación.

VI. Extracción de plásmido (MINIPREPS)

- 1.- Vaciar cultivo de bacterias en LB en un tubo eppendorf de 1.5ml hasta llenar el tubo.

- 2.- Centrifugar durante 2 minutos a 5, 000 rpm.
- 3.- Tirar el sobrenadante y repetir pasos 1 y 2 en el mismo tubo.
- 4.- Tirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 150 μ l de buffer STET. Ayudarse del vórtex.
- 5.- Agregar 10 μ l de lisosima 10mg/ml, vortexear ligeramente e inmediatamente poner a baño maría (agua hirviendo) durante 40 segundos.
- 6.- Centrifugar durante 10 minutos a 10,000 rpm.
- 7.- Quitar el pellet de cada muestra con un palillo estéril y desechar. Agregar al sobrenadante 200 μ l de isopropanol frío. Mezclar por pipeteo.
- 8.- Incubar durante 30 minutos a -20°C.
- 9.- Centrifugar durante 10 minutos a 12, 500 rpm. Tirar sobrenadante.
- 10.- (Lavado del pellet) Añadir al pellet 200 μ l de EtOH al 70%. Resuspender por pipeteo y vortexear.
- 11.- Centrifugar durante 5 minutos a 12, 500 rpm. Quitar sobrenadante y dejar que seque el pellet (se puede colocar en la incubadora de 37°C durante 8-10 min para promover la evaporación o secar al vacío).
- 12.- Resuspender en 20 μ l de ddH₂O. Añadir 1 μ l de RNAsa A 10 mg/ml y guardar a 4°C hasta su uso.

VII. RT-PCR. (Tomado del manual del kit: *3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends*, LifeTechnologies)

- 1.- Combinar 1-5 μ g de RNA total con agua DEPC hasta un volúmen final de 11 μ l.
- 2.- Adicionar 1 μ l de primer unviersal 10 μ M. Mezclar suavemente y dar un spin en la centrifuga.
- 3.- Calentar a 70°C por 10 minutos. Posteriormente incubar en hielo por al menos 1 minuto. Dar un spin en la centrifuga y agregar:

Buffer de PCR 10X.....	2 μ l
25mM MgCl ₂	2 μ l
10 mM dNTP's.....	1 μ l
0.1 M DTT.....	2 μ l
- 4.- Mezclar suavemente y dar un spin en la centrifuga. Equilibrar la mezcla a 42°C por 2 a 5 minutos.
- 5.- Adicionar 1 μ l de enzima Reverso-Transcriptasa (SuperScript II RT, LifeTechnologies). Incubar a 42°C por 50 minutos.
- 6.- Terminar la reacción por incubación a 70°C por 15 minutos.
- 8.- Transferir la reacción a hielo. Dar un spin en la centrifuga y agregar 1 μ l de RNAsa H. Mezclar suavemente e incubar por 20 minutos a 37°C. Guardar a -20°C hasta su uso.

VIII. Búsqueda de motivos en la secuencia del promotor de APETALA3 incluida en la secuencia de T-DNA

Resultados de la búsqueda en RSA-Tools para la secuencia del promotor de APETALA3 que esta incluida en el T-DNA:

MOTIVO ENCONTRADO	FRECUENCIA ESPERADA	NUM. DE VECES QUE APARECE	FRECUENCIA OBSERVADA
ctcggta taacggag	0.0000139478215	2	0.14
ccgta taacgg	0.0002141090902	3	0.47
aacgga tccgtt	0.0002910597129	3	0.08
aagtg cactt	0.0020482255959	6	0.62
aacgg ccgtt	0.0008976959753	4	0.30
aagt actt	0.0111144816869	15	1.58
agtg cact	0.0056649841369	9	0.67
acgg ccgt	0.0024748664910	5	0.01

Resultados de la búsqueda en PLACE-Database para la secuencia del promotor de APETALA3 incluido en el T-DNA:

Motivo	Ubicación	Información
NNWNCCA WWWTR GWWAN	389 (+)	Secuencia consenso de unión a AGL2 en <i>Arabidopsis</i> , que se une al DNA como dimero. Expresión floral.
TTWCYAW WWWTRG WAA	390 (+) 390 (-)	Secuencia consenso de unión a AGL3 en <i>Arabidopsis</i> . AGL3 se expresa en toda la planta.
TGACG	102 (+)181 (+)	Sitio de unión ASF-1 en el promotor CaMV 35S. Encontrados en promotores que estan involucrados en la activación transcripcional de los genes por auxinas y/o ácido salicílico. Puede ser relevante para la regulación por luz.
ATAGAA	446 (-)	"Caja II" encontrada en el promotor del gen atpB de cloroplasto en tabaco. Encontrado en muchos promotores NCII de genes de cloroplasto.
CAAT	16 (+)234 (+)384 (+) 1 (-)179 (-)236 (-)	"Caja CAAT", encontrada en el gen legA de chicharo. Da expresión específica de este gen en semillas de tabaco.
CCAAT	15 (+)1 (-)	"Caja CAAT". Secuencia encontrada en las regiones 5' no-codificantes de muchos genes eucariontes.
GTTTACAT AAATGGAA AA	316 (+)	Caja CArG1, encontrada en el promotor del gen APETALA3 de <i>Arabidopsis</i> . Sitio de unión para el heterodimero AP3/PI de factores de transcripción tipo MADS-Box.
CTTTCCAT TTTTAGTA	389 (+)	Caja CArG3 encontrada en el gen APETALA3 de <i>Arabidopsis</i> . Sitio de unión para el heterodimero AP3/PI de factores de transcripción tipo MADS-

AC		Box y otros como APETALA1 y AGAMOUS.
TGAAAACT	344 (-)	Secuencia encontrada en el gen legA de chicharo. Responsable de la especificidad tisular en la expresión de este gen en tabaco.
CAANNNN ATC	78 (+) 429 (+)	Región necesaria para la expresión circadiana del gen Lhc de tomate.
AAAG	148 (+) 187 (+) 6 (-) 46 (-) 56 (-) 207 (-) 220 (-) 369 (-) 389 (-) 418 (-) 444 (-) 459 (-)	Sitio requerido para la unión de proteínas Dof en maíz. Las proteínas Dof promueven una mayor transcripción de los promotores de genes CyPPDK y PEPC.
CANNTG	88 (+) 227 (+) 234 (+) 408 (+) 88 (-) 227 (-) 234 (-) 408 (-)	Caja E del promotor del gen de la proteína napA de almacenamiento en <i>Brassica napus</i> .
GATA	336 (-) 473 (-)	Caja "GATA", encontrada en el promotor CaMV35S. Sitio de unión de ASF-2. Tres cajas GATA repetidas fueron encontradas en el promotor del gen de la proteína de unión a la corofila a/b Cab22 en <i>Petunia h</i> . Requerido para una elevada expresión, regulada por luz y tejido específica (hojas, tallos).
CATTAATT AG	373 (+)	Sitio de unión para las proteínas de zipper de leucina GmHd156 y GmHd157 de soja. Encontrado en el dominio de respuesta a fosfatos del promotor de VspB en soja.
GRWAAW	328 (+) 329 (+) 222 (-) 334 (-)	Sitio consenso GT-1 encontrado en muchos genes regulados por luz en muchas especies como PHYA en arroz, RCA y PETA en espinaca y CHS15 en chicharo.
GTGA	230 (+) 33 (-) 129 (-) 338 (-) 453 (-)	Motivo "GTGA" encontrado en el promotor del gen g10 de expresión tardía en polen de tabaco.
GATAA	335 (-)	"Caja Γ". Secuencia encontrada en las regiones 5' no codificantes d genes regulados por luz en monocotiledoneas y dicotiledoneas. Expresión en hojas, tallos.
ACGTCA	102 (-)	Motivo "hexamero" encontrado en promotores de genes de histonas H3 y H4. Sitio de unión con las proteínas nucleares HBP-1A y HBP-1B.
YTCANTYY	452 (+)	Elemento iniciados "Inr", encontrado en el promotor del gen psaDb (carente de cajas TATA) en tabaco. Indispensable para la iniciación de la transcripción en respuesta a la luz.
TGCAGG	90 (-)	"3' intron-exon splice junctions". Secuencia intronica consenso de señalización para la edición encontrada en plantas.
MAGGTAA GT	363 (-)	"5' exon-intron splice junctions". Secuencia intronica consenso de señalización para la edición encontrada en plantas.
CNGTTR	117 (+) 169 (+) 278 (+) 159 (-)	Sitio de unión para al menos dos proteínas MYB de plantas: ATMYB1 y ATMYB2 aisladas de <i>Arabidopsis</i> .
CCWACC	77 (+)	Sitio consenso de unión a l gen P (homologo de myb) en maíz. Controla pigmentación en órganos florales.
ACTTTA	55 (+)	Sitio de unión para NtBBF1 (proteína Dof de tabaco) en e gen rolB de <i>Agrobacterium</i> . Requerido para la expresión tejido específica (raíz, tallo, meristemos, tejido vascular) e inducción por auxinas.
AATAAA	174 (+)	Señal "Poli-A" emcpmtrada en el gen legA de chicharo.
AATTTAA	302 (+)	Señal "Poli-A" encontrada en la alfa-amilasa de arroz.
AGAAA	445 (-) 460 (-)	Uno de los dos elementos regulatorios co-dependientes responsables de a activación del gen lat52 en polen. <i>Lycopersicon esculentum</i> .
CACCTG	88 (+)	Sitio consenso de unión al factor de transcripción RAV1 en Arabiopsis t. Esta proteína contienen dominios similares a AP2 y B3, y sus niveles de expresión son elevados en raíz y hojas de roseta.
AACCAA	79 (+) 193 (+)	"Realfa" encontrado en el promotor del gen Lhcb21 en <i>Lemna gibba</i> . La actividad de unión a DNA (a este sitio) es alta en plantas etioladas. Requerido para la regulación por fitocromo.

ATATT	17 (-)	Motivo encontrado en promotores de roID. Expresión en raíz. Tabaco.
YTGTCWC	126 (+) 230 (-)	Sitio de unión del factor de unión (SEBF). Encontrado en promotores de genes relacionados con la patogénesis. <i>Solanum tuberosum</i> (papa).
RTTTTR	395 (+)199 (+)141 (-) 21 (-)	Sitio de unión para SEF4 en soya.
TAAAG	56 (-)418 (-)	Motivo "TAAG" encontrado en promotor del gen KST1 de <i>Solanum tuberosum</i> . Sitio de unión para la proteína StDof1, que controla la expresión específica en células guarda.
ACTTIG	147 (-)	"Caja T" encontrada en el promotor del gen GAPB en <i>arabidopsis thaliana</i> . Las mutaciones en esta caja resultan en reducción de la transcripción activada por luz.
TGACGT	102 (+)	Motivo "TGACGT" encontrado en el promotor del gen Amy. Requerido para elevados niveles de expresión de Amy en los cotiledones.
TTGAC	101 (+)180 (+)	"Caja W", encontrada en el promotor del gen NPR1 de <i>Arabidopsis</i> . Reconocido específicamente por proteínas inducidas por ácido salicílico.