



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis de la función del gen MADS-Box  
AGL21 usando líneas de sobre-expresión en  
*Arabidopsis thaliana*.**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :

**Anidia Blanco Jarvio**

Directora de tesis. Dra. Maria Elena Alvarez-Buylla Roces

2004



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis de la función del gen MADS-box AGL21 usando líneas de sobre-expresión en Arabidopsis thaliana".

realizado por Anidia Blanco Jarvio

con número de cuenta 9520504-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de:Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis

Propietario Dra. María Elena Alvarez-Buylla Roces

Propietario M. en C. Rosalinda Tapia Lopez

Propietario Biol. Enrique Ortiz Moreno

Suplente Dra. Alicia Gamboa de Buen

Suplente M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz

**Consejo Departamental de Biología**

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS

Antes que a los demás gracias a mis padres por apoyarme a lo largo de mi vida. A mi mamá por escucharme y entenderme. A mi papá porque además de ser mi padre es una persona que admiro en todos los aspectos.

A mis hermanos Indira y Aldo quienes han sido mis primeros y mejores amigos.

A mi abuelita Catalina† por haber estado conmigo. A mis abuelitos Basilisa y Serafín por compartir parte de sus experiencias.

A la familia Blanco Pinacho y a la familia Jarvio Gonzáles (en especial a mis cómplices Rosi y Joya).

A Hiram por todo lo que representa y ha significado en mi vida.

A los amigos por estar cuando se les necesita. A Carlos por apoyarme en todos mis atinos y desatinos desde que comenzamos la carrera. A Vanesa (*Vaneska*), Arturo (*Brodito*), Juan, Lucy, Aldo (*Parejita*), Gabriela, Sergio (*Search*), Alfredo (*Alfred*), Edgardo, Hugo, Rocio, Rodrigo, Eduardo (*Lalo*), Jorge, Saul, Edgar, Ernesto, Gabriel, Leonardo y Ezequiel.

De manera especial a mi directora de tesis Elena Alvarez-Buylla por apoyarme en todos los aspectos de mi formación académica.

A mis sinodales, Elena Alvarez-Buylla, Rosalinda Tapia, Enrique Ortiz, Alicia Gamboa y Rigoberto Pérez.

A las gentes que me apoyaron durante mi estancia en el laboratorio, Elena, Ignacio, Elda, Arturo, María, Rosalinda, Enrique, Leon, Alma, Carlos, Tania, Alicia, Francisca, Caroline, Amanda, Sun, Mitzi, Esther, Elizabeth, América, Barbara, Úrsula, Francisco, Rigoberto, Armando y Fernan.

Gracias al laboratorio de microscopía electrónica de barrido de la facultad de Ciencias (en especial a Silvia Espinosa).

Gracias a los maestros de la carrera y sobre todo a la más grande institución pública del país, la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue apoyado por becas de la UNAM (PROBETEL) y CONACYT.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG	<i>AGAMOUS</i>
ANR1	<i>ARABIDOPSIS NITRATE REGULATOR 1</i>
API	<i>APETALA 1</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CO	<i>CONSTANS</i>
DEF A	<i>DEFICIENS A</i>
EtOH	Etanol (alcohol etílico)
MCM1	<i>MINICHROMOSOME MAINTENANCE1</i>
MS	Murashige & Skoog
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reverso transcriptase – Reacción en cadena de la polimerasa
SOCI	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1</i>
SRF	<i>SERUM RESPONSE FACTOR</i>
TFL1	<i>TERMINALA FLOWER 1</i>
UNS	<i>UNSHAVEN</i>
WT	Tipo silvestre

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología del desarrollo.....	1
1.2 Genes MADS en plantas.....	3
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo.....	7
1.4 Organización de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	9
1.5 Características de la fase vegetativa y reproductiva de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
1.6 Actividad meristemática.....	13

### 2. ANTECEDENTES.....14

### 3. OBJETIVOS.....16

### 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....17

4.1 Análisis de los patrones de expresión de los genes MADS-box pertenecientes a los clados <i>ANR1</i> y <i>SOCI</i> en <i>A. thaliana</i> .....	17
4.1.1 Análisis mediante RT-PCR el patrón espacio-temporal de expresión de los genes MADS-box <i>AGL17</i> , <i>AGL21</i> , <i>ANR1</i> , <i>AGL16</i> , <i>AGL19</i> , <i>AGL14</i> y <i>SOCI</i> . ....	17
4.1.2 Análisis del patrón de expresión de <i>AGL21</i> en <i>A. thaliana</i> mediante hibridación tipo Northern.....	19
4.2 Obtención de líneas homocigas con la construcción de sobre-expresión de <i>AGL21</i> .....	20
4.2.1 Selección de líneas resistentes a kanamicina.....	20
4.2.2 Comprobación por Northern blot de los niveles de expresión de ARN del <i>AGL21</i> en las líneas homocigas con la construcción 35S:: <i>AGL21</i> . ....	22

4.3	Análisis comparativos de los fenotipos de las líneas de sobre-expresión y las silvestres.....	23
4.3.1	Estudio del crecimiento de la raíz .....	23
4.3.2	Análisis de la transición a la floración .....	23
4.3.3	Análisis de la flor.....	24

## 5. RESULTADOS

5.1	Análisis de los patrones de expresión de los genes MADS-box pertenecientes a los clados <i>ANR1</i> y <i>SOC1</i> en <i>A. thaliana</i> .....	25
5.1.1	Análisis mediante RT-PCR el patrón espacio-temporal de expresión de los genes MADS-box <i>AGL17</i> , <i>AGL21</i> , <i>ANR1</i> , <i>AGL16</i> , <i>AGL19</i> , <i>AGL14</i> y <i>SOC1</i> . .....	25
5.1.2	Análisis del patrón de expresión de <i>AGL21</i> en <i>A. thaliana</i> mediante hibridación tipo Northern.....	28
5.2	Obtención de líneas homocigas con la construcción de sobre- expresión del <i>AGL21</i> .....	29
5.2.1	Selección de las líneas resistentes a kanamicina.....	29
5.2.2	5.2.2 Expresión de ARNm de <i>AGL21</i> en las líneas homocigas con la construcción 35S:: <i>AGL21</i> .....	30
5.3	Análisis comparativos de los fenotipos de las líneas de sobre-expresión y las silvestres.....	31
5.3.1	Estudio del crecimiento de la raíz primaria en diferentes concentraciones de medios de cultivo.....	31

5.3.2	Efecto de la sobre-expresión de <i>AGL21</i> en el tiempo de floración.....	36
5.3.3	Efecto de la sobre-expresión de <i>AGL21</i> en otros aspectos del fenotipo del vástago aéreo y en la morfogénesis floral.....	39
6.	DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	44
7.	CONCLUSIONES.....	46
8.	REFERENCIAS.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Organización modular de los dominios de las proteínas MADS en plantas.....	3
2. Árbol filogenético obtenido por análisis Bayesiano para los genes MADS tipo II.....	6
3. Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	9
4. Organización de los verticilos florales.....	11
5. Flor de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
6. Esquema de los patrones de expresión de ARNm de los genes <i>AGL12</i> , <i>AGL17</i> , <i>AGL19</i> y <i>AGL21</i> , en meristemo apical y primordio lateral de raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	14
7. Esquema del plásmido pBIN19.....	20
8. Extracciones de ARN de diferentes órganos de la planta.....	24
9. Patrón de expresión de ARNm de genes MADS-box de los clados de <i>SOC1</i> y <i>ANR1</i> en diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i> mediante RT-PCR.....	25
10. Expresión de <i>AGL21</i> a nivel de mRNA en diversos órganos de <i>A. thaliana</i> mediante hibridación tipo Northern.....	27
11. Expresión del mensajero de <i>AGL21</i> en raíz y hoja de <i>A. thaliana</i> mediante análisis de hibridación tipo Northern blot en líneas de la generación T3.....	30
12. Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5, pRT19.3.3, pRT16.3.2 y pRT2.2.14 en medio de cultivo con sacarosa al 1% y sales al 0.5X.....	32
13. Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5, pRT19.3.3, pRT16.3.2 y pRT2.2.14 en medio de cultivo con sacarosa al 0.5% y sales al 2X.....	33
14. Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5 y pRT19.3.3 en medio de cultivo con sacarosa al 2% y sales al 0.2X.....	34
15. Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5 y pRT19.3.3 en medio de cultivo con sacarosa al 0.5% y sales al 0.5X.....	34
16. Tiempo de emergencia del escapo de la inflorescencia en plantas de la línea de sobre-expresión de <i>AGL21</i> , pRT23.8.5 y en wt.....	36

17. Comparación del número de hojas de roseta y caulinares entre la línea de sobre-expresión de <i>AGL21</i> , pRT23.8.5 y wt al momento de emergencia del escapo de la inflorescencia. ....	36
18. Comparación del tiempo de floración de la línea de sobre-expresión pRT23.8.5 y wt. Se registró el día en el que abrió el primer boton floral de las plantas.....	36
19. Análisis de expresión de mRNA de <i>AGL21</i> mediante RT-PCR en líneas de sobre-expresión de este gen (pRT9.3, pRT17.15, pRT25.8.8 y pRT23.8.5).....	38
20. Fenotipo floral de las líneas de sobre-expresión de <i>AGL21</i> .....	39
21. Fenotipo de flor y tallo de wt y de las líneas de sobre-expresión pRT9.3, pRT23.8.5 y pRT25.8.8.....	40
22. Células de la superficie abaxial de sépalos de flores antes de la antesis.....	41
23. Células de la superficie abaxial del sépalo en flores maduras de wt y la línea de sobre-expresión pRT25.8.8 .....	41
24. Células de la superficie adaxial del sépalo en flores maduras de wt y la línea de sobre-expresión pRT25.8.8.....	42
25. Células de la superficie adaxial en hoja de roseta.....	42
26. Región adaxial del pétalo en flores maduras de wt y la línea de sobre-expresión pRT25.8.8.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Oligonucleótidos específicos y condiciones de temperatura para cada uno de los genes de los clados <i>ANR1</i> y <i>SOCI</i> . ....	18
2. Segregación de las líneas transgénicas con un inserto en la generación T2.....	21
3. Concentraciones de sales y sacarosa de los medios de cultivo utilizados.....	22
4. Patrones de expresión del los genes MADS-box de los clados <i>SOCI</i> y <i>ANR1</i> en los diferentes órganos de <i>A. thaliana</i> .....	27
5. Relación del número de insertos en líneas transgénicas llevadas a la generación T3.....	29

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biología del desarrollo

La diversidad de formas de los seres vivos es el resultado de mecanismos de desarrollo, que conectan la variación genética con las características morfológicas y fisiológicas de los seres vivos (Álvarez-Buylla, 2000a). Por lo tanto, para entender como se originan las estructuras morfológicas y sus variantes es necesario comprender los mecanismos de desarrollo. Son cambios en estos los responsables de la aparición de estructuras nuevas en los seres vivos debido a que la evolución es producto de cambios heredables en el desarrollo (Vergara-Silva et al., 2001). Gracias al avance en las técnicas usadas en la biología molecular y en bioinformática se ha avanzado en el estudio acerca de la relación que mantienen la biología del desarrollo y la biología evolutiva desde estos puntos de vista. Por ejemplo, la participación de genes ortólogos en la formación de ciertas estructuras parecidas en diferentes especies, permite suponer mecanismos de desarrollo equivalentes y homología a nivel molecular en estas estructuras.

Los genes MADS controlan distintos aspectos del desarrollo e interactúan formando redes de regulación génica (Álvarez-Buylla et al., 2000b; Burgeff et al., 2001b; Burgeff, 2001a; Vergara-Silva et al., 2002), de modo, que ninguna característica es producto de la actividad aislada de un solo gen. Por lo tanto, es importante descubrir las redes de regulación que controlan los distintos aspectos del desarrollo.

Se ha demostrado que los reguladores transcripcionales tienen una participación fundamental en los procesos del desarrollo. Estas proteínas se unen a secuencias cis-regulatorias del ADN, lo que en combinación con otros interactores activa o reprime la expresión de los genes blanco. Por lo tanto, alteraciones en las secuencias cis-regulatorias de genes blanco pueden cambiar los patrones de expresión espacio temporales de los genes a los que regulan y causar la generación de cambios en los planos corporales que rigen la aparición de fenotipos novedosos (Davidson et al. 2002), sobre los cuales puede actuar la selección natural (Dobley y Lukens, 1998).

El método clásico de estudio de la biología del desarrollo consiste en el análisis genético de mutantes que tienen alteraciones fenotípicas en su desarrollo (Wolpert et al. 1998). Estas mutantes son caracterizadas y se ubica la posición y la identidad del locus afectado, para con esto reconocer el gen que está involucrado en la formación de la estructura alterada. Para una mutante con pérdida de función, se puede confirmar el fenotipo a través de la transformación de la mutante con una versión silvestre del gen afectado. Si con esto se consigue recuperar el fenotipo silvestre, entonces se confirma que la alteración se debe a la pérdida de función del gen. Este es el enfoque directo o clásico de análisis en la genética molecular del desarrollo.

Actualmente ya se cuenta con la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Esto ofrece una ventaja para implementar un enfoque alternativo al anterior que es el conocido con el nombre de "genética inversa". Este enfoque se basa en el análisis de genes de interés cuya secuencia y pertenencia a alguna familia génica es conocida, para el cual es posible postular algunas hipótesis funcionales con base en los conocimientos de los genes de la misma familia.

## 1.2 Genes MADS-BOX en plantas

Los genes de la familia MADS codifican para factores transcripcionales que son importantes en el desarrollo de eucariontes y en particular de *Arabidopsis thaliana*. Los miembros de esta familia codifican para proteínas que comparten un dominio de unión a ADN denominado MADS. Este dominio consta de alrededor de 60 aminoácidos (Coen y Meyerowitz, 1991). El nombre de esta familia es un acrónimo que se debe a las iniciales de los primeros genes aislados: *MCMI* de levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*), *AG* de plantas (*Arabidopsis thaliana*), *DEFA* de otra planta (*Antirrhinum majus*) y *SRF* de animales (*Homo sapiens*) (Yanofsky y Meyerowitz, 1991).

En los eucariontes esta familia se divide en dos clados principales, que son el resultado de una duplicación génica ancestral anterior a la divergencia de animales y plantas (Álvarez-Buylla et al., 2000a). Uno de estos clados agrupa a los genes tipo I (SRF-like) y el otro a los genes tipo II (MEF-like). Los integrantes del tipo I aún no han sido caracterizados funcionalmente en plantas (Álvarez-Buylla et al., 2000a). Las proteínas MADS- tipo II presentan una estructura modular denominada MIKC (Ver figura 1), este nombre está dado por sus cuatro regiones características, que se describen a continuación.

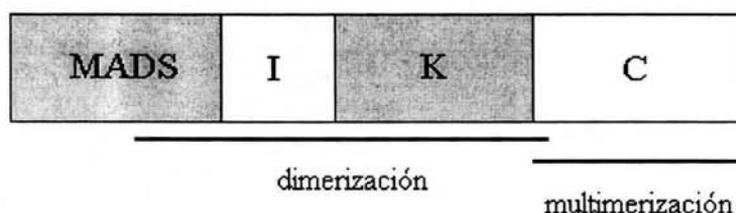


Figura modificada de Jack T, 2001

**Figura 1. Organización modular de los dominios de las proteínas MADS en plantas.** La región denominada caja MADS de alrededor de 60 aminoácidos y la región K (keratin-like) de unos 70 aminoácidos se encuentran unidas por la región denominada I, esta última está moderadamente conservada, al final se localiza la región C que es más variable entre proteínas (Jack, 2001 ; Ng y Yanofsky, 2001).

La región MADS participa en la dimerización y unión al ADN de genes blanco. El dominio K interviene en las interacciones proteína-proteína mediante la formación de estructuras helicoidales, y la región I parece también estar relacionada con interacciones

proteína-proteína. Por último está la región C, la cual es considerada como el dominio de transactivación (Reichmann and Meyerowitz, 1997; Vergara-Silva et al. 2000; Jack, 2001; Ng y Yanofsky, 2001), pero probablemente también es importante en determinar la especificidad de interacción con otras proteínas.

El papel funcional de estos genes se ha estudiado principalmente durante el desarrollo floral. Estos genes son esenciales durante la morfogénesis de la flor, ya que actúan desde estadios muy tempranos de la determinación de identidad de meristemas florales y durante la especificación de la identidad de primordios de órganos florales (Rounsley et al., 1995). En la flor de *Arabidopsis thaliana* el análisis de fenotipos mutantes de estos genes dió como consecuencia un modelo denominado ABC. Este describe cómo la actividad combinatoria de cinco genes (de los cuales cuatro son de la familia MADS-box) regulan la identidad de los órganos florales. La activación de genes A (*APETALA1* y *APETALA2*) da como resultado la diferenciación de sépalos, de A y B (*APETALA3* y *PISTILLATA*) de pétalos, de B y C (*AGAMOUS*) de estambres y C únicamente de carpelos. (Bowman et al., 1993; Meyerowitz, 1994).

Existen indicios de que el modelo ABC podría estar conservado en todas las angiospermas debido a que se ha demostrado la actividad de genes de clase B en *Zea mays* (una especie de monocotiledónea relativamente lejana a las especies modelo *A. thaliana* y *Antirrhinum majus* que son dicotiledóneas), pues la pérdida de función de un gen ortólogo a los genes de clase B en *Arabidopsis* ocasiona resultados similares en maíz, pero con las estructuras características de el maíz (Ambrose et al., 2000). Además se ha observado la expresión de genes ortólogos a genes B en estructuras reproductivas masculinas y de genes ortólogos a genes C en estructuras femeninas incluso en gimnospermas (Winter et al., 2000).

La propuesta del modelo ABC ha constituido una hipótesis de trabajo para poner a prueba la base molecular de la conservación del patrón floral en angiospermas, lo que ha permitido un gran avance en el entendimiento de la morfogénesis floral. Es por eso que sería deseable encontrar modelos parecidos en otros sistemas, que permitieran elaborar marcos conceptuales parecidos para entender el desarrollo de otras estructuras vegetales. Es probable que en efecto ocurra esto ya que : 1) hay otros grupos de genes MADS expresándose en otras regiones de la planta (Burgueff et al., 2001b) y 2) muchos sistemas de desarrollo se determinan por la actividad combinada de factores de transcripción (Theissen 1995).

La redundancia funcional parece ser muy importante entre miembros de esta familia de genes. Dentro del modelo ABC, se encontró que la actividad B y C necesitan, además, a los genes MADS-box *SEPALLATA 1*, *SEPALLATA 2* y *SEPALLATA 3*, los cuales son redundantes funcionalmente. El estudio aislado de cada una de estas mutantes no arrojó datos claros, pero, la construcción de una mutante triple (*sep1 sep2 sep3*) evidencia la importancia de estos genes, ya que el mutante triple tiene sépalos en todos los verticilos de la flor (Pelaz et al., 2000). Otro caso de redundancia funcional lo encontramos en Silicuas, donde dos genes de la familia MADS: *SHATTERPROOF 1* y *SHATTERPROOF 2* son funcionalmente redundantes y ambos son importantes en controlar el desarrollo de la zona de dehiscencia del Silicuas (Liljegren et al., 2000).

El primer gen MADS encontrado en *Arabidopsis* fue *AG* así que los genes de esta misma familia que fueron aislados posteriormente recibieron el nombre de *AGAMOUS LIKE (AGL)* y con una numeración progresiva a medida que se fueron describiendo (Smyth, 2000; Martínez-Castilla y Alvarez-Buylla 2003). Estudios evolutivos recientes de la familia de genes MADS-box en *Arabidopsis thaliana* han encontrado que los genes de esta familia se encuentran agrupados en distintos clados monofiléticos, cuyos integrantes comparten funciones y patrones de expresión similares. Estos grupos incluyen tanto genes florales, como genes que preferencialmente se expresan en estructuras vegetativas.

Análisis de la familia MADS sugieren que su evolución ha involucrado una diversificación funcional rápida y simultánea, tanto en estructuras vegetativas como reproductivas (Álvarez-Buylla et al 2000a). Se ha visto que algunos genes MADS-box tienen un papel muy importante en el control del tiempo de floración; ejemplo de esto son genes como *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Lee et al., 2000; Samach et al 2000).

Mediante análisis de hibridación tipo Northern se encontró que los genes MADS-box *AGL12*, *AGL14*, *AGL17*, *ANR1*, *AGL16*, *AGL19* y *AGL21* se expresan preferencialmente en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Rounsley et al., 1995; Zhang y Forde, 1998; Burgeff 2001). En un árbol consenso obtenido por análisis Bayesiano (figura 2) se observa que los miembros de esta familia específicos de raíz se pueden agrupar en dos clados. El primero está conformado por *SOC*, *AGL14*, *AGL19*, *AGL17* y *AGL21* el segundo clado contiene a *AGL17*, *ANR1*, *AGL16*, y *AGL21*. En este último *AGL 17* y *AGL21* comparten un alto número de nucleótidos.

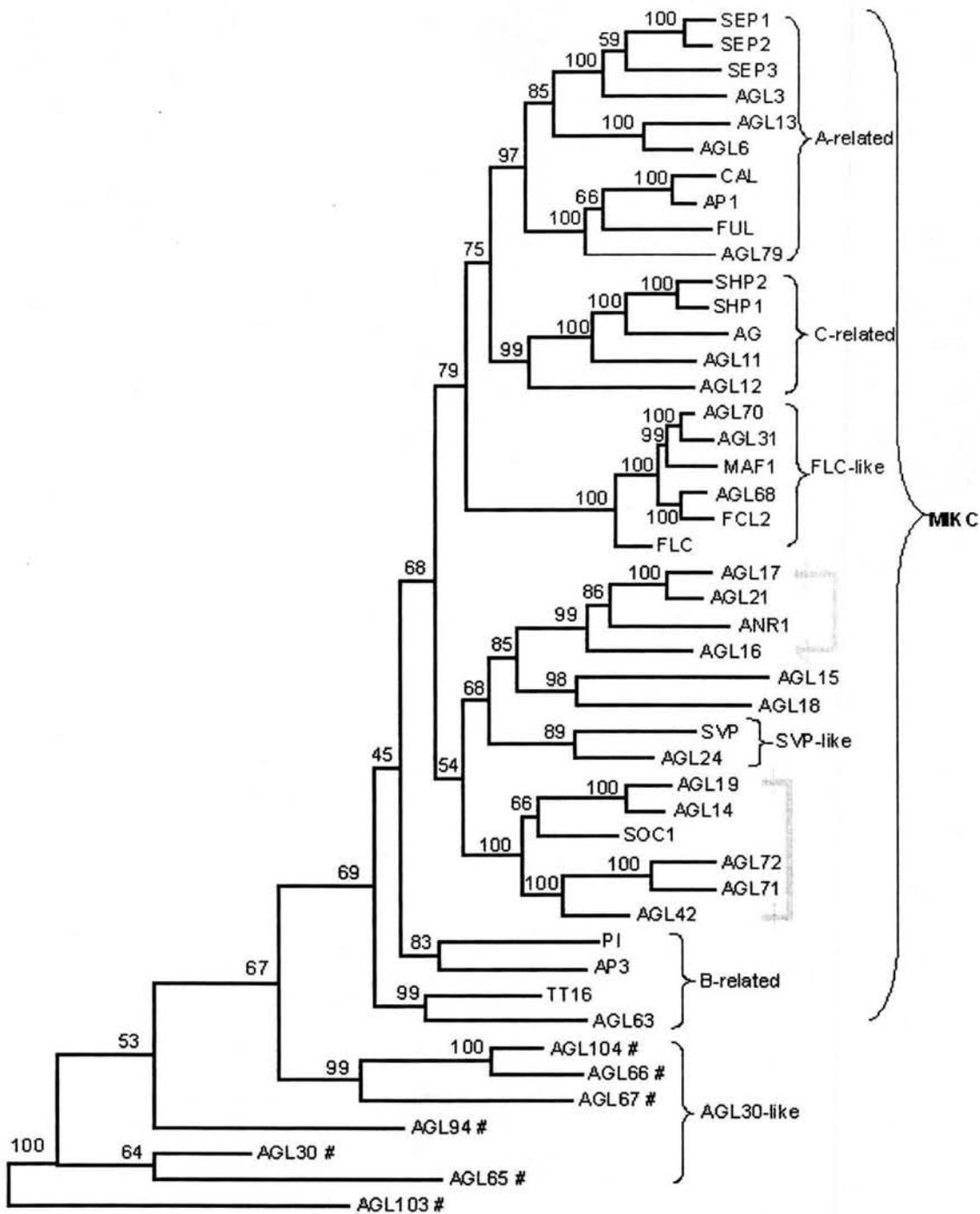


Figura 2. Árbol filogenético obtenido por análisis Bayesiano para los genes MADS tipo II. Con flechas de color gris se indican los clados en donde se sitúan los genes que se expresan preferencialmente en raíz (tomado de: Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla 2003)

### 1.3 *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo.

*A. thaliana* es un organismo que dentro de las plantas se ha utilizado como sistema modelo para estudios de genética clásica. Esta planta es una angiosperma, miembro de la familia de las Brassicaceae. Al principio de su crecimiento mantiene hojas que forman una roseta que oscila entre 2-5 cm de diámetro. En medio de esta roseta surge un tallo o escapo de inflorescencia que puede alcanzar una altura de entre 20-70 cm. Las flores se forman en los meristemos aéreos y estas miden aproximadamente 3mm de largo por 1mm de ancho. El ciclo de vida oscila entre 6 y 8 semanas, esto permite producir varias generaciones en poco tiempo y además como su tamaño es pequeño es posible crecerla en espacios relativamente pequeños (Wilson, 2000), lo que facilita el manejo de grandes poblaciones para análisis genéticos.

Esta planta produce estructuras florales que se autofecundan, esto permite la obtención de líneas puras y la realización de cruza controladas si se evita la autofecundación. Cada planta produce varias vainas que pueden contener hasta 50 semillas cada una. El tamaño tan pequeño de estas semillas permite su almacenamiento y una óptima esterilización. Además es posible germinar y crecer a estas plantas en luz fluorescente, tanto en suelos como en medios de cultivo estériles (Meyerowitz, 1989; Wilson, 2000). Finalmente, el estudio molecular en esta planta se ha facilitado porque tiene un genoma pequeño y solamente 5 cromosomas, con pocas secuencias repetidas (Meyerowitz, 1994).

*A. thaliana* se puede transformar genéticamente a través de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* (Anderson y Wilson, 2000), utilizando un plásmido Ti en el, estos vectores recombinantes se pueden introducir al genoma de la planta por la acción infecciosa de esta bacteria (Meyerowitz, 1989). Gracias a este método es posible alterar el genoma para obtener plantas transgénicas. Así es como se han realizado muchos estudios de desarrollo a nivel molecular, donde se han descrito y caracterizado genes como los miembros de la familia MADS que están involucrados en el desarrollo de flores y silicuas (Rounsley et al. 1995; Gu et al. 1998; Ng y Yanofsky 2001). La mayor parte de los estudios funcionales de genes MADS-box se han hecho durante el desarrollo reproductivo. En particular, se ha prestado especial atención al desarrollo de la flor. En el laboratorio de Genética molecular, desarrollo y evolución de plantas (Instituto de Ecología, UNAM) se quiere estudiar la base molecular del desarrollo de la raíz, que es

un órgano muy sencillo a nivel celular y que, a diferencia del vástago aéreo, puede permitir integrar los estudios celulares y moleculares para comprender los mecanismos de desarrollo en plantas. Por los antecedentes antes planteados, se piensa que estos genes MADS-box pueden convertirse en herramientas moleculares importantes para entender las bases moleculares del desarrollo y por esto se decidió enfocar esfuerzos en caracterizar funcionalmente a genes de esta familia que se expresen preferencialmente en tejido vegetativo, en particular en raíz.

## 1.4 Organización de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

La raíz se puede dividir a lo largo de su eje longitudinal en tres zonas. La zona de diferenciación que es donde se encuentra el tejido maduro y las células dejan de crecer, además se caracteriza por ser el lugar donde se producen los pelos radiculares y las raíces laterales. La zona de elongación que como su nombre lo indica es en donde las células continúan su crecimiento y dejan de dividirse y la zona meristemática que es en donde ocurre una división celular constante (Dolan 1993; Leyser y Day 2003). La raíz de *A. thaliana* tiene una estructura claramente "organizada", al verla en un corte transversal (figura 3) es fácil distinguir los tipos celulares que la conforman.

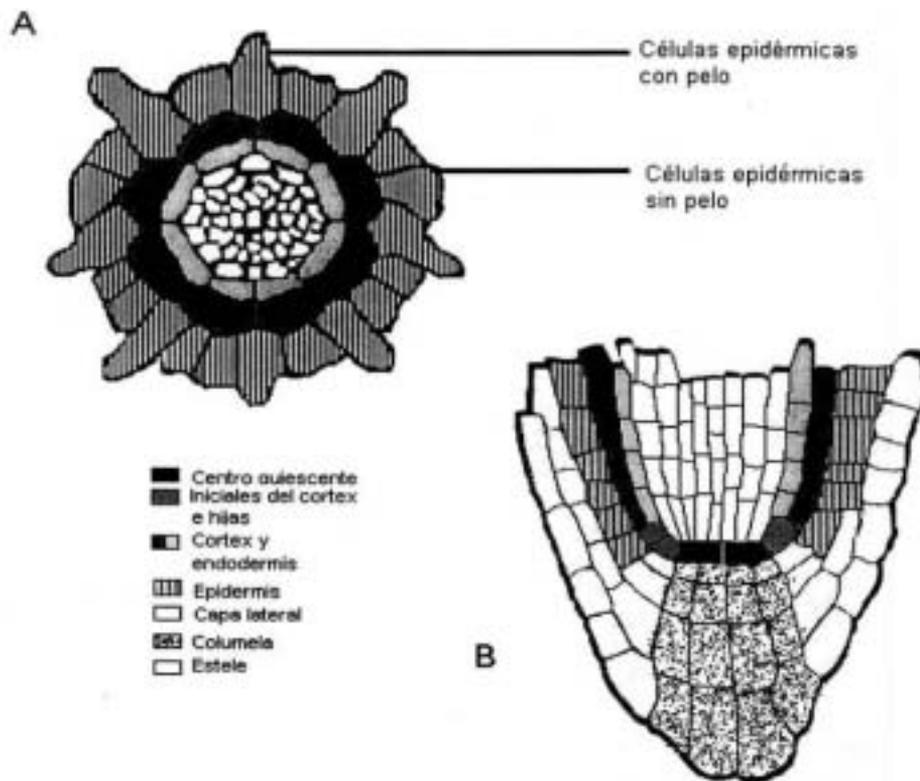


Figura 3 . Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. En la figura A (modificadas de Mendoza y Álvarez-Buylla 2000) se muestra un corte transversal de la raíz de *Arabidopsis*. Figura B (modificada de Van den Berg et al., 1998) distribución de las capas celulares que conforman la raíz.

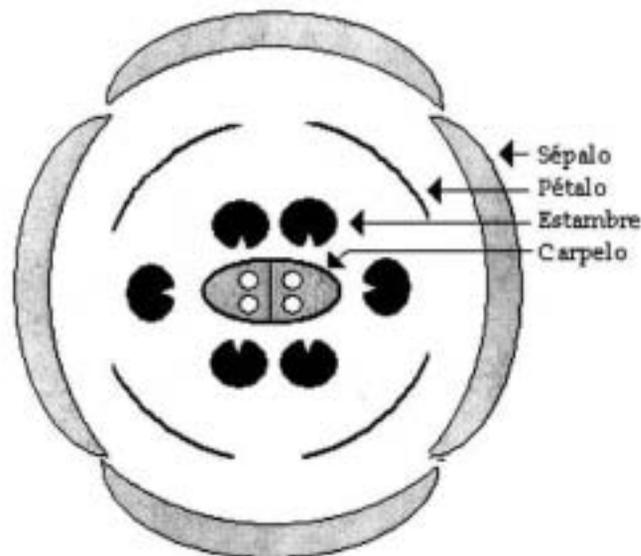
En la parte más externa está la epidermis, la cual consta de dos tipos celulares: células con pelo, denominadas tricoblastos, y células sin pelo, llamadas atricoblastos, y

mas internamente se localizan el cortex y la endodermis. El cortex es importante para la determinación de identidad de las células de la epidermis ya que, si una célula epidérmica esta adyacente a una sola célula del cortex será nombrada atricoblasto, mientras que si esta célula colinda con dos células corticales será denominada tricoblasto. Después de la endodermis se encuentra el periciclo, el cual cubre al cilindro central el cual está conformado por los tejidos del xilema y el floema y tejidos acompañantes (Dolan et al., 1993; Scheres et al., 1994; Dolan y Okada, 1999).

La organización de la raíz está bien estudiada a nivel celular y se han estudiado los patrones de cada tejido que la conforman, por lo que cambios fenotípicos producidos por mutantes pueden ser caracterizados a nivel celular. Esto ha sido más difícil en el vástago aéreo en donde la estructura celular es más complicada.

## 1.5 Características de la fase vegetativa y reproductiva de *Arabidopsis thaliana*.

Las fases vegetativa y reproductiva de *Arabidopsis* están separadas temporalmente. La fase vegetativa se caracteriza por la producción de hojas de roseta y hojas caulinas dispuestas en filotaxia espiral, con pequeños internodos entre hojas sucesivas (Bowman, 1994). Ambos tipos de hojas presentan tricomas compuestos en la superficie abaxial y adaxial. La transición de estadio vegetativo a reproductivo está controlado por factores tanto endógenos como ambientales que determinan el momento en el cual el meristemo apical que produce 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).

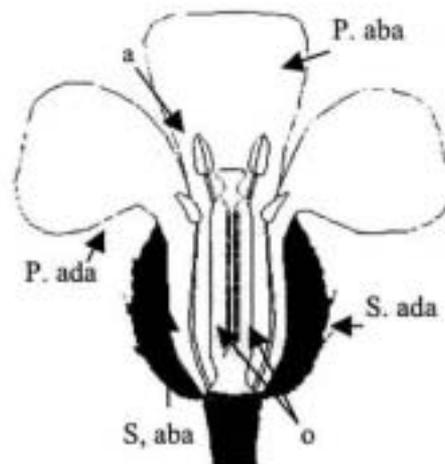


**Figura 4. Organización de los verticilos florales.** En plantas silvestre de *Arabidopsis thaliana* se conserva esta organización que rodea a los dos carpelos fusionados.

Las flores maduras de *Arabidopsis* tienen una estructura simple típica de las Brassicaceae (figura 4). Las flores tienen un cáliz con cuatro sépalos y una corola con cuatro pétalos los cuales tienen una posición alternada en el interior de la flor con respecto a los sépalos. Estos últimos al igual que las hojas presentan tricomas pero estos son sencillos y sólo se localizan en la superficie adaxial. Los estambres se localizan

rodeado al gineceo el cual se localiza en el centro de la flor y está compuesto por dos carpelos (Bowman 1994).

Cada uno de los cuatro tipos de organos florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) de *A. thaliana* tienen características morfológicas distintivas en la epidemis, como el tamaño de las células, la forma y la textura. Los pétalos tienen un color blanco debido a altas magnificaciones céricas la cuales cubren las superficies abaxiales y adaxiales (figura 5), la cutícula gruesa de las células sobre la superficie adaxial esta organizada a lo largo de ejes cónicos de las células. Ambas superficies en el pétalo no presentan estomas. La superficie de los sépalos maduros tiene a lo largo de su epidermis diversos tipos celulares, este presenta células con formas irregulares las cuales tienen diferentes tamaños, pueden ser chicas ó alargadas, células guarda y estomas. Las anteras tienen una epidermis con células rugosas con formas irregulares pero con un tamaño uniforme. El gineceo presenta en la parte superior papilas estigmaticas, células largas, estomas en el estilo y pequeñas células epidérmicas en las dos valvas del ovario (Bowman 1994)



**Figura 5. Flor de *Arabidopsis thaliana*.** En el centro de la planta se localiza el gineceo en el cual se localizan los ovulos, este presenta dos ovarios fusionados (o). Después rodeando al gineceo están los estambres, en los cuales se encuentran la parte superior a las anteras (a) que es el sitio donde se localiza el polen. Los pétalos son el tercer verticilo y tienen dos superficies la abaxial (P. aba) y la adaxial (P. ada). El último verticilo son los sépalos, que al igual que los pétalos tienen una superficie adaxial (S. ada) y otra abaxial (S. aba).

## 1.6 Actividad meristemática

En los animales, tanto sus órganos como sus formas características se generan al principio de su vida, en la embriogénesis. En cambio en las plantas, la base corporal se establece en la embriogénesis, pero la organogénesis perdura durante toda la vida de la planta como resultado de la actividad de los meristemas (Di Laurenzio et al., 1996; Meyerowitz, 1997). Las plantas tienen dos meristemas apicales, el aéreo y el de raíz. Ambos están conformados por células indiferenciadas que a lo largo de la vida de la planta se diferencian para dar lugar a las estructuras de la parte aérea (eje aéreo, hojas, flores, botón floral, etc) y de la raíz que conforman el cuerpo completo de las plantas.

Los meristemas son regiones que se distinguen porque en ellos hay un control del desarrollo de los órganos de las plantas a través de un balance de proliferación y diferenciación celular (Van den Berg et al., 1995). Actualmente se desconoce como se orquestan la diferenciación y la división celular en el meristemo, pero a través de estudios genéticos se ha demostrado la relevancia del balance entre estos dos procesos (Van den Berg et al., 1997).

La raíz primaria se forma a partir de una división que se da en el embrión de la planta, donde se forman dos células, una basal y otra apical. La primera da lugar al centro quiescente y la región de la columela, la segunda da origen a parte del meristemo de la radícula que es el cuerpo de la raíz (Hamann, 1999 ; Scheres et al., 1994). Aún se desconocen los procesos que rigen la iniciación y el establecimiento del patrón radial durante la embriogénesis, pero análisis clonales y experimentos de ablación celular han demostrado que el destino de una célula se rige por mecanismos de señalización posicional y no por la pertenencia de esta a un linaje celular dado. De esta forma el destino final de una célula del meristemo puede modificarse si ésta es desplazada hacia una nueva posición. (Scheres et al., 1994; Van den Berg et al., 1995; Scheres, 1996 ;Scheres y Wolkenfelt, 1998). De tal manera que se sugiere que hay un mecanismo de señalización que proviene de las células ya diferenciadas que determina el tipo celular durante el desarrollo de la raíz. También se ha demostrado la existencia de un mecanismo de señalización de corto alcance que parte del centro quiescente y que mantiene el status de células 'madre' en las células del promeristemo de la raíz (Scheres et al., 1999). Es probable que los genes MADS-box sean parte de estos mecanismos de señalización. Los patrones de expresión de estos genes en raíz sugieren, de hecho, que podrían ser parte de mecanismos de señalización que parten de los tejidos diferenciados.

## 2. ANTECEDENTES

Los miembros de la familia MADS-box hasta ahora caracterizados nos muestran como juegan papeles importantes en el desarrollo de plantas. Los esfuerzos dirigidos a identificar a los distintos miembros de la familia MADS-box, llevaron al descubrimiento de genes MADS con expresión fuera de los tejidos florales. Además en general se ha visto que el sitio de expresión de ARNm muestra una relación con el sitio en donde la función del gen es importante (Rounsley et al., 1995; Zhang y Forde, 1998; Álvarez-Buylla, 2000b; Zhang y Forde 200, Burgeff et al 2001b). Por lo tanto, como un primer paso para explorar la función de genes MADS-box en el desarrollo, se exploraron los patrones de expresión de un conjunto de genes de esta familia que se expresan preferencialmente en tejidos vegetativos, en particular en la raíz de *A. thaliana*.

En el laboratorio se realizaron análisis de hibridación *in situ* de raíz para los genes *AGL17*, *AGL19*, *AGL12*, *AGL21* (Burgeff et al., 2001b) *AGL 14* y *ANR1* (Datos aún no publicados).

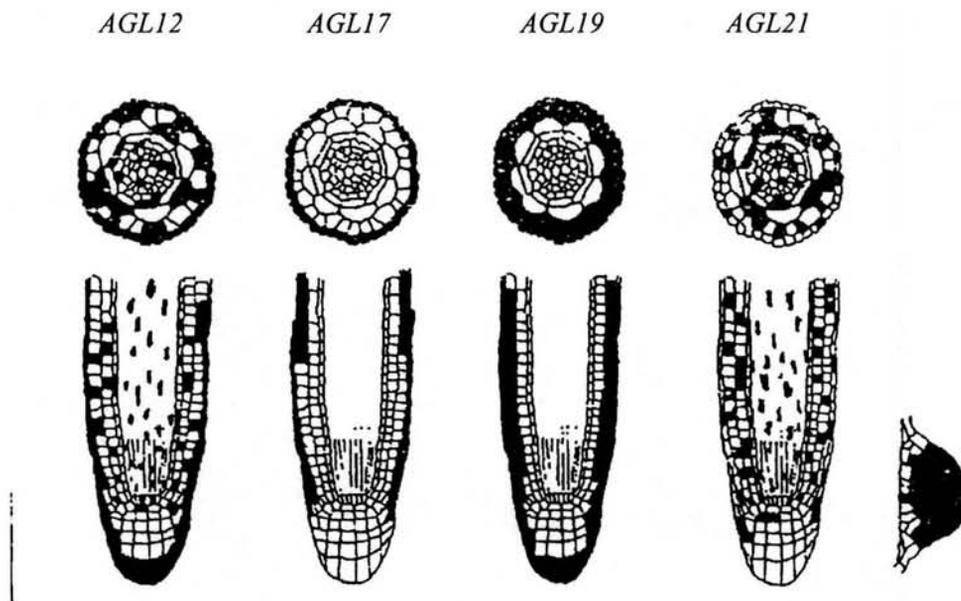


Figura 6. Esquema de los patrones de expresión los genes *AGL12*, *AGL17*, *AGL19* y *AGL21*, en meristemo apical y primordio lateral de raíz de *Arabidopsis*. (tomada de Burgeff 2001a).

En cortes histológicos de la raíz de *Arabidopsis* se realizaron hibridaciones *in situ* del ARNm (Burgeff, 2001a; Burgeff et al., 2001b). Con base en este trabajo se sabe que los genes *AGL21* (figura 6) y *ANR1* se expresan durante la formación de raíces laterales. Para *AGL21* la expresión se observa continua desde estadíos tempranos de la raíz lateral

y cuando esta emerge de la raíz primaria la marca se sitúa principalmente en el ápice de la raíz lateral, mientras que para *ANR1* la expresión es punteada. A medida que la raíz lateral crece, el gen *AGL21* se expresa en el meristemo, en donde adopta un patrón punteado, similar al que se observa en los meristemos primarios de la raíz. En la zona de diferenciación de la raíz se expresa en células del cilindro central al igual que los genes *ANR1* y *AGL12*. Durante la embriogénesis la expresión de *AGL21* se localiza desde el estadio globular hasta el de torpedo, la marca sigue un gradiente decreciente desde el apice hasta la base del embrión (Burgeff et al., 2001). *AGL12* y *ANR1* también se expresan durante la embriogénesis, el primero presenta un patrón de expresión punteado desde el estadio globular hasta el de torpedo.

*AGL17* es el gen que filogenéticamente está mas cercano a *AGL21* (figura 2) pero no comparte un patrón de expresión similar, su expresión de ARNm se localiza en la capa de la cofia lateral que recubre el meristemo apical (figura 6). El gen se expresa en las células de la epidermis cerca del límite basal del meristemo y en el inicio de la zona de elongación. En la zona diferenciada se expresa en células del periciclo.

La cercanía filogenética y el parecido en cuanto a la expresión *in situ* del ARNm de *AGL21* con otros genes MADS nos permite creer que este gen puede tener algún tipo de redundancia génica con uno o mas miembros de esta familia. El patrón de expresión *in situ* del RNAm de *AGL21* nos indica que este gen es importante en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.

Mediante el análisis de Northern blot se encontró que la expresión de *AGL21* era específica de raíz, pero empleando la técnica de RT-PCR se vio la presencia del transcrito en Silicuas (Burgeff et al., 2001). Estos resultados preliminares deben ser corroborados para determinar en que otros órganos *AGL21* puede estar desempeñando funciones.

El análisis individual de cada uno de los miembros de la familia MADS es importante para posteriormente hacer una integración de la función de estos genes en el desarrollo de *Arabidopsis*. Con el objetivo de analizar la función del gen *AGL21* en el laboratorio de la Dra. Álvarez-Buylla se hicieron construcciones de la secuencia del ADNc de *AGL21* unido a un cassette que lleva dos copias del promotor 35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor), esta construcción da como resultado una expresión constitutiva, que nos ayudará a entender la función de este gen en el desarrollo de *A. thaliana*.

### 3. OBJETIVOS

#### Generales:

- Analizar la expresión espacio-temporal mediante RT-PCR de los genes MADS-box *AGL17*, *AGL21*, *ANRI*, *AGL16*, *AGL19*, *AGL14* y *SOCI*.
- Analizar líneas de sobre-expresión del gen MADS-box *AGL21* para ayudar en la inferencia de su función durante el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.

#### Particulares:

- Analizar mediante RT-PCR la expresión de los genes MADS *AGL17*, *AGL21*, *ANRI*, *AGL16*, *AGL19*, *AGL14* y *SOCI*
- Corroborar el patrón de expresión de *AGL21* en *A. thaliana* mediante hibridación tipo Northern.
- Aislar líneas homocigas con la sobre-expresión de *AGL21*.
- Analizar la expresión del gen *AGL21* en diferentes tejidos de líneas silvestres y las líneas seleccionadas arriba.
- Hacer análisis comparativos de los fenotipos de las líneas de sobre-expresión y las silvestres.
  - Analizar la raíz.
  - Analizar el tiempo de floración.
  - Analizar las estructuras florales.

## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 4.1 Análisis de los patrones de expresión de genes MADS-box pertenecientes a los clados *ANR1* y *SOC1* en *A. thaliana*.

#### 4.1.1 Análisis mediante RT-PCR el patrón espacio-temporal de expresión de los genes MADS-box *AGL17*, *AGL21*, *ANR1*, *AGL16*, *AGL19*, *AGL14* y *SOC1*.

Se esterilizaron y vernalizaron por 2 días (ver protocolo en el anexo) semillas de plantas silvestres de *A. thaliana*, posteriormente se sembraron en suelo (metro-mix 200) y en medio de cultivo sólido (MS) y se crecieron en fotoperíodo de días largos (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una temperatura de 21°C. A partir de la 3er semana se colectó tejido de flor, botón floral, hoja de roseta, hoja caulinar y silicuas de las plantas que se sembraron en suelo. De las plantas que se sembraron en medio de cultivo sólido se colectó la raíz después de 2 semanas. Posteriormente se extrajo ARN total utilizando el reactivo TRIZOL (ver protocolo en el anexo) y se cuantificó la concentración en un espectrofotómetro (PERKIN ELMER Lambda Bio) de las muestras para hacer los cálculos correspondientes y utilizar la misma concentración en todos los casos.

Posteriormente se utilizó la técnica de RT-PCR (ver anexo), esta consiste en sintetizar ADNc a partir de ARNm mediante la enzima "reverso transcriptasa" (RT) y un cebador (oligonucleotido) que se une a la cola polyA característica del ARNm. Posteriormente cuando el ADNc está sintetizado se realiza un PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y se amplifica el gen de interés. Para hacer los genes pertenecientes a los clados *ANR1* y *SOC1* se utilizaron oligonucleótidos (tabla 1) específicos para cada gen y todas las amplificaciones se realizaron en el mismo termociclador (PERKIN ELMER 9600). Los PCR se realizaron con diferentes números de ciclos para determinar en cuál la reacción se saturaba, y poder hacer comparaciones semicuantitativas entre los amplificadores. Se escogieron 35 ciclos debido a que el PCR no se satura con este número de ciclos y es posible hacer un análisis semicuantitativo.

Gen	Oligonucleótidos	Programa
<i>AGL14</i>	EOMF1 EOMR2	94° 5 min 94° 1 min 55° 1 min 72° 2 min 72° 5 min } 35 ciclos
<i>AGL19</i>	OEAB 158 OEAB 171	94° 5 min 94° 40 seg 60° 1 min 72° 1.30 min 72° 5 min } 35 ciclos
<i>SOC1</i>	OABJ F7 OABJ R7	94° 5 min 94° 1 min 58° 1 min 72° 3 min 72° 5 min } 35 ciclos
<i>ANR1</i>	ANR3 ANR5	94° 2 min 94° 40 seg 63° 1 min 72° 2 min 72° 2 min } 35 ciclos
<i>AGL16</i>	IT-OE16F IT-OE16R	94° 2 min 94° 40 seg 60° 1 min 72° 3 min 72° 5 min } 35 ciclos
<i>AGL17</i>	OEAB154 OEAB156	94° 2 min 94° 40 seg 63° 1 min 72° 2 min 72° 2 min } 35 ciclos
<i>AGL21</i>	OEAB163 OEAB165	94° 2 min 94° 40 seg 63° 1 min 72° 2 min 72° 2 min } 35 ciclos
Ubiquitina	Ubi F Ubi R	94° 2 min 94° 40 seg 63° 1 min 72° 2 min 72° 2 min } 35 ciclos

**Tabla 1. Oligonucleótidos específicos y condiciones de temperatura para cada uno de los genes de los clados ANR1 y SOC1.**

#### 4.1.2 Análisis del patrón de expresión de *AGL21* en *A. thaliana* mediante hibridación tipo Northern.

Se colectó tejido de flor, botón floral, hoja de roseta, hoja caulinar, silicua y raíz (mismo procedimiento que en el apartado 4.1.1). Se extrajo el ARN total con el reactivo TRIZOL (ver anexo) y se realizó el Northern blot. Para comenzar la electroforesis desnaturante del Northern blot (protocolo completo en el anexo) se preparó un gel de agarosa al 1% con formaldehído, este fue sumergido en un buffer de corrida MOPS 1X. Las muestras de ARN se prepararon (se desnaturalizaron, se les agregó bromuro de etidio y buffer de carga) y se colocaron en el gel de formaldehído. Este gel se dejó correr hasta que el colorante migró tres tercios del gel. Después se hizo la transferencia del material genético del gel a una membrana de nylon.

El fragmento utilizado para la síntesis de la sonda fue amplificado por PCR (tabla 1) con los oligonucleótidos OEAB163 y OEAB165 los cuales son específicos para amplificar el ADNc de *AGL21* y dan un fragmento de 650 pares de bases. Esta sonda se marcó radioactivamente utilizando [ $\alpha^{32}$ P]dCTP. Posteriormente se hibridó con la membrana de nylon.

Secuencia de los oligonucleótidos:

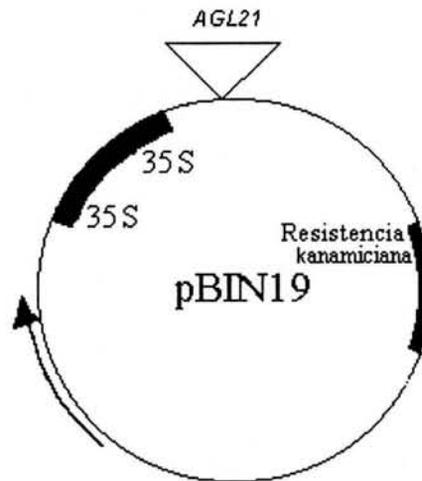
OEAB 163 5' GTC GGT TAT TGA TAG ATA CAA CAA GAG C 3'

OEAB 165 5' TGG AGT GTT CTT CAA CAT CAT GGT ATC T 3'

## 4.2 Obtención de líneas homocigas con la construcción de sobre-expresión de *AGL21*.

### 4.2.1 Selección de líneas resistentes a kanamicina

Para generar líneas de sobre-expresión se utilizó el plásmido pBIN19 (trabajo realizado por R. Tapia) que cuenta con un cassette de un doble promotor 35S (virus del mosaico de la coliflor), el cual confiere una expresión constitutiva. Unido a este promotor se insertó la secuencia del ADNc del gen *AGL21* el cual fué amplificado con los oligonucleotidos CB 15F y CB 16R (figura 7). Después con esta construcción (35S::AGL21) se transformaron cultivos de *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria con la cual se infectaron plantas silvestres (wt) de *A. thaliana* ecotipo columbia.



**Figura 7. Esquema del plásmido binario pBIN19.** El plásmido contiene dos promotores del 35S que están río arriba de la secuencia de *AGL21*. Tiene un cassette de resistencia a la kanamicina que se localiza después de la inserción del fragmento de *AGL21*.

De las plantas transformadas se colectó la semilla y fué sembrada en medio MS con kanamicina (concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ ). ya que las plantas resistentes a este antibiotico tienen la construcción del 35S::AGL21 (figura 7) y crecen saludables y de color verde, mientras que las plantas del tipo silvestre son albinas al germinar en el medio MS con kanamicina.

La construcción 35S::AGL21 será incorporada en el genoma de las plantas transformadas, estas plantas iniciales serán heterocigas (T1), sin embargo podrán entrar

uno o mas insertos de esta construcción. Para determinar el número de insertos se hicieron análisis de segregación.

	WT	T
WT	WT WT	WT T
T	WT T	T T

**Tabla 2. Segregación de las líneas transgénicas con un inserto en la generación T2.** Cuando las plantas tienen un inserto el 25% serán albinas y el 75% verdes. Por lo que 25% serán homocigas para el transgen (T T), 25% homóigas para wt (WT WT) y 50 % heterocigas (WT T)

Cuando las plantas tienen dos insertos el 6.25% (1/16)serán albinas y el 93.75% (15/16) verdes. Por lo que el 6.25 % serán homocigas para el transgen, el 6.25% homóigas para wt y 87.5 % heterocigas.

La generación de las primeras semillas de las plantas trasformadas se denominó T2. En esta generación se vio la segregación de plantas verdes y albinas y se realizaron los porcentajes que nos determinaron la cantidad de insertos del transgen. Se colectaron las semillas por individuo (reproducción por autocruza) de las plantas iniciales donde se introdujo la construcción 35S::AGL21 (plantas T1). Posteriormente las semillas de estas plantas (T2) fueron esterilizadas (ver anexo ) y vernalizadas a 4°C por 2 días para después ser sembradas en cajas de petri con medio “fisiológico” sólido a una concentración de sales de 0.2X (sales Murashige & Skoog) y con sacarosa al 2%. Las cajas de petri se colocaron en forma horizontal en un cuarto de crecimiento con condiciones de fotoperíodo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) y una temperatura constante de 21°C. Aproximadamente 12 días después de que germinaron, se separaron las plántulas verdes de las albinas y las primeras se transplantaron a tierra. Estas plantas se dejaron crecer hasta que dieron semillas (T3), las cuales se coleccionaron. En la generación T3 las plantas se consideraron homóigas cuando tienen el 100% de plantulas verdes en presencia de kanamicina.

#### **4.2.2 Comprobación por Northern blot de los niveles de expresión de ARN del *AGL21* en las líneas homocigas con la construcción 35S::*AGL21*.**

Se sembraron en placas de petri con medio fisiológico semillas de plantas de la generación T3 de la construcción 35S::*AGL21*, se colectó tejido de hoja y raíz para aislar el ARN total (método del TRIZOL ver anexo A). Después estas extracciones fueron corridas en un gel de agarosa al 1% para corroborar que el ARN no se encontrara degradado. Para realizar este protocolo se siguió la misma metodología que en el apartado 4.1.2.

### 4.3 Análisis comparativos de los fenotipos de las líneas de sobre-expresión y las silvestres.

#### 4.3.1 Estudio del crecimiento de la raíz.

Se esterilizaron y vernalizaron (anexo) semillas de las líneas homocigas pRT23.8.5, 19.3.3, 16.3.2, 2.2.14 y semillas del tipo silvestre. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con diferentes medios de cultivo (tabla 3) con mezcla de sales tipo Murashige & Skoog (a partir de aquí se denominara sales a esta mezcla).

	Sacarosa 0.5 %	Sacarosa 1 %	Sacarosa 2 %
Sales 0.2 X			***
Sales 0.5 X	***	***	
Sales 1 X	***		
Sales 2 X	***		

**Tabla 3. Concentraciones de sales y sacarosa de los medios de cultivo utilizados.** En los experimentos posteriores solo se utilizaron los medios que están señalados con asteriscos.

En las placas de petri se colocaron 5 semillas de tipo silvestre y 5 semillas transgénicas, se completaron 10 placas por línea. Las placas se colocaron en posición vertical dentro de una cámara de crecimiento con fotoperíodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad) a 20°C. En cada medio se midió la longitud aproximada de las raíces sembradas en cada placa. Posteriormente se calculó y se graficó (se usó el paquete Sigma plot 5.0) el promedio por día de la longitud alcanzada para cada raíz.

#### 4.3.2 Análisis de la transición a la floración.

Se esterilizaron y vernalizaron 30 semillas de la línea transgénica 23.8.5 y 30 semillas del tipo silvestre. Ambas líneas se sembraron en suelo (medio metro-mix 200) y posteriormente fueron colocadas en una cámara de crecimiento con fotoperíodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura constante de 20°C.

Posteriormente se hicieron análisis registrando el día en el cual el tallo de las plantas llegó a 1cm de longitud (tiempo de emergencia del escapo). En este día también se contaron el número de hojas de roseta y hojas caulinas que tenía la planta. El último registro que se realizó fue el día en el cual abrió la primer flor. Con estos datos se hicieron comparaciones entre las plantas transgénicas y las silvestres. Se graficaron los promedios (programa Sigma plot versión 5.0).

### 4.3.3 Análisis de la flor.

Se seleccionaron nuevas líneas resistentes a kanamicina (pRT25.8.8 y pRT9.3). En estas plantas se realizó RT-PCR de hoja caulinar para comprobar la sobre-expresión del mensajero del gen *AGL21*.

Debido a que en estas línea se observó un fenotipo característico en la flor se tomaron fotografías con microscopio estereoscópico. Se esterilizaron y vernalizaron (ver anexo) semillas de las línea transgénicas y el tipo silvestre. Posteriormente se sembraron en suelo (medio metro-mix 200) y fueron colocadas en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura constante de 21°C. Cuando las flores abrieron se colectaron para tomar las fotografías en un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZ-PT). Para conocer con mas detalle las alteraciones en las células de los órganos florales de estas plantas también se realizaron fotografías con microscopía de barrido (Trabajo realizado con Silvia Espinosa en el Laboratorio de microscopía electrónica de barrido). Para esto el tejido (flores y botones florales) fué colectado y fijado en FAA, posteriormente se deshidrató (cuando las muestras estuvieron en alcohol al 70% se disectaron) hasta alcohol absoluto, el cual fué sustituido por CO<sub>2</sub> con un desecador de punto crítico (BAL-TEC CPD030), posteriormente las muestras fueron montadas y sometidas a baño de oro mediante una ionizadora (Densovacuum. Desk 11). Posteriormente se tomaron las fotografías a diferentes aumentos (1000X, 500X) con un microscopio electrónico de barrido (JEONE JSM-5310 LV).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis de los patrones de expresión de genes MADS-box pertenecientes a los clados *ANR1* y *SOC1* en *A. thaliana*.

#### 5.1.1 Análisis mediante RT-PCR el patrón espacio-temporal de expresión de los genes MADS-box, *AGL17*, *AGL21*, *ANR1*, *AGL16*, *AGL19*, *AGL14* y *SOC1*.

Con el objetivo de determinar la expresión espacio-temporal de los genes MADS se procedió a la extracción de ARN de los diferentes órganos de *A. thaliana* donde las concentraciones de las muestras fueron estandarizadas (figura 8).

Flor    B.F.    Silicuas    H.R    H.C.    Raíz



Figura 8. Extracciones de ARN de diferentes órganos de la planta. Se corrió un gel con 1% de agarosa y 0.35  $\mu$ g de cada muestra de ARN.

En los experimentos de RT-PCR se utilizó como control positivo la amplificación de ubiquitina, la cual se expresa constitutivamente en todos los tejidos de *A. thaliana* y durante todas las etapas de desarrollo.

La expresión de los genes *ANR1*, *AGL16*, *SOC1*, *AGL42* (este gen no se expresa en silicuas) y *AGL17* se observan en todos los órganos de la planta (figura 9). Sin embargo la variaciones del nivel de expresión son diferentes, unicamente *ANR1* presenta patrones de expresión similiares para todos los tejidos. *AGL19* también tiene altos niveles de

transcrito en todos los tejidos, pero no se observa en flor. *AGL14* tiene una mayor expresión en hoja de roseta y en raíz, pero la expresión en flor, silicua y hoja caulinar es apenas perceptible.

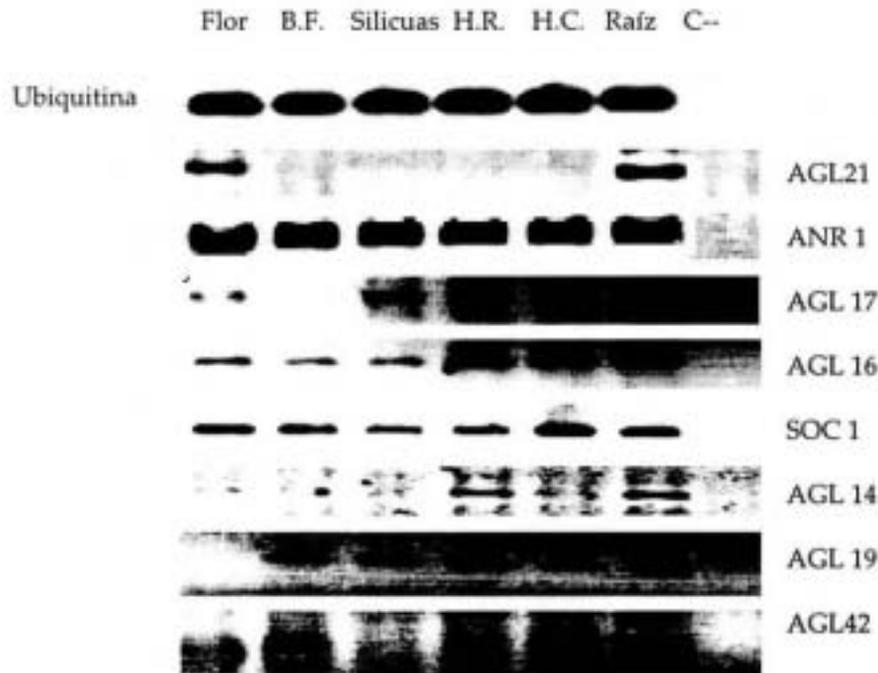


Figura 9. Patrón de expresión de ARNm de genes MADS-box de los clados de *SOC1* y *ANR1* en diferentes tejidos de *A. thaliana* mediante RT-PCR. Amplificación de ADNc en diferentes órganos de la planta de los genes *AGL21*, *ANR1*, *AGL17*, *AGL16*, *SOC1*, *AGL14*, *AGL19* y *AGL42*. El control negativo contiene agua en lugar de ADNc.

Los genes *AGL21*, *ANR1*, *AGL17*, *AGL16*, *AGL14*, *AGL19* y *AGL42*, a pesar de expresarse en otros órganos mantienen una expresión preferencial en raíz (tabla4).

*AGL21* mantiene una expresión específica en flor y raíz (figura 9), sin embargo en análisis de RT-PCR's de Burgeff y colaboradores (2001) reportan la expresión de este gen en raíz y silicuas, esto se puede deber a que la expresión de *AGL21* no es constante en la formación del embrión y en el desarrollo de la flor.

Este estudio de RT-PCR nos permitió observar la expresión en los tejidos donde el nivel de expresión es bajo, lo que ayudará en la formulación de nuevas hipótesis de la función de estos genes MADS.

	<i>AGL21</i>	<i>ANR1</i>	<i>AGL17</i>	<i>AGL16</i>	<i>SOC1</i>	<i>AGL14</i>	<i>AGL19</i>	<i>AGL42</i>
Flor	+++	+++	++	++	++	+	-	+
Botón floral	-	+++	+	+	+	+	++	++
Silicuas	-	+++	++	+	+	+	++	-
Hoja Roseta	-	+++	++	+++	+	++	++	+
Hoja Caulinar	-	+++	++	+++	++	+	+	++
Raíz	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++

**TABLA 4. Patrones de expresión del los genes MADS-box de los clados *SOC1* y *ANR1* en los diferentes órganos de *A. thaliana*.** Los niveles de expresión se resumen como: "+" Poca expresión, "++" expresión moderada, "+++ " mucha expresión y como "-" ausencia de expresión.

Los genes MADS-box catalogados por su expresión preferencial en raíz (Rounsley et al., 1995) también pueden estar llevando a cabo funciones en otros tejidos ya que en este análisis se encontró la expresión de estos genes en otros órganos de *A. thaliana*.

### 5.1.2 Análisis del patrón de expresión de *AGL21* en *A. thaliana* mediante hibridación tipo Northern.

La localización de la expresión de *AGL21* es importante para poder inferir donde interactúa este gen, por tal motivo se corroboró el patrón de expresión mediante una hibridación tipo Northern. En estos resultados la expresión del gen *AGL21* se mantiene específica para raíz y flor (figura 10).

En el Northern blot reportado por Burgeff y colaboradores (2001) la expresión de *AGL21* solo se detectó en raíz. Una hibridación tipo Northern blot con frecuencia no permite determinar la expresión de transcritos bajos, pero en este caso la intensidad en el nivel del transcrito de *AGL21* en flor y raíz es alto. Esta diferencia en el resultado se puede deber a que se colectaron flores en distintos estadios y se ha visto mediante análisis *in situ* (Bugeff et al., 2001) de raíz y embrión que la expresión de *AGL21* es diferencial en los diferentes estadios de desarrollo.

Este análisis de Northern blot es consistente con los resultados de patrones de expresión de *AGL21* mediante RT-PCR.



B.F. Silicuas H.R. H.C. Raíz Flor

**Figura 10.** Expresión de *AGL21* a nivel de ARNm en diversos órganos de *A. thaliana* mediante hibridación tipo Northern. La sonda con la que se hibridó la membrana fue obtenida por PCR a partir de ADNc usando los oligonucleotidos OEAB163 y OEAB165.

Los patrones de expresión hasta ahora reportados indican que este gen puede desempeñar funciones importantes en el desarrollo de la raíz y flor de *Arabidopsis thaliana*.

## 5.2 Obtención de líneas homocigas con la construcción de sobre-expresión del *AGL21*.

### 5.2.1 Selección de las líneas resistentes a kanamicina.

Se obtuvieron 25 líneas independientes resistentes a Kanamicina de las cuales 12 fueron llevadas hasta la generación T3 (tabla 5).

Línea	Un inserto	Mas de un inserto
pRT2.2.14		***
pRT6.2.1	***	
pRT8.6.1	***	
pRT9.3	***	
pRT11.7.1		***
pRT12.2.1		***
pRT16.3.2		***
pRT17.15.3		
pRT19.3.3		***
pRT22.4.1		***
pRT23.8.5		***
pRT25.8.8		***

**Tabla 5. Relación del número de insertos en líneas transgénicas llevadas a la generación T3.** Debido a que se contaba con muy poca semilla de algunas líneas en la generación T1 no fue posible hacer el análisis de segregación para determinar el número de insertos .

Las líneas que se muestran en la tabla 6 mostraron en la generación T3 (n=100) todas las plantas verdes en presencia de kanamicina. Lo que nos indica con análisis de segregación que son homocigas. Es importante realizar un Southern blot, para corroborar el número de insertos en cada una de estas líneas.

### 5.2.2 Expresión de ARNm de *AGL21* en las líneas homocigas con la construcción 35S::*AGL21*.

Para determinar si las líneas seleccionadas presentaban la sobre-expresión de *AGL21* se elaboró un Northern blot el cual nos permitió determinar el nivel de expresión en raíz y hoja en comparación con wt de *AGL21* en líneas de la generación T3.

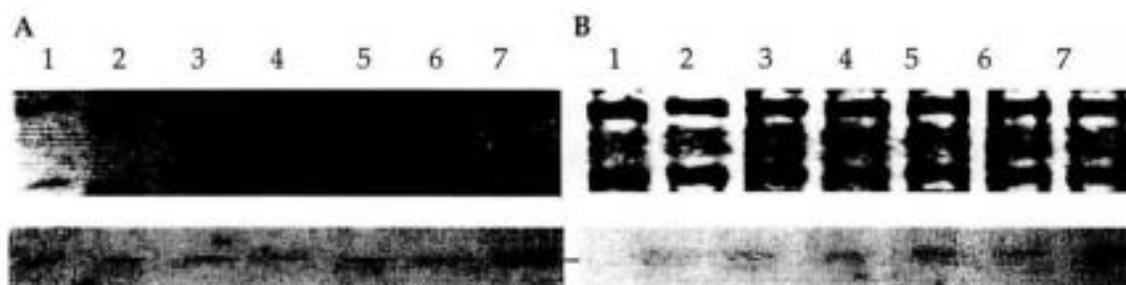


Figura 11. Expresión del mensajero de *AGL21* en raíz y hoja de *A. thaliana* mediante análisis de hibridación tipo Northern blot en líneas de la generación T3. En la parte superior se encuentran la foto del gel antes de la transferencia y abajo su placa correspondiente del Northern blot. carril 1-wt; 2-pRT2.2.14, 3-pRT12.2.1, 4-pRT16.3.2, 5-pRT19.3.3, 6-pRT22.4.1, 7-pRT23.8.5. A) Muestras de raíz, el control positivo de la hibridación es la muestra wt. B) Muestras de hoja, el control negativo para la expresión en hoja del gen *AGL21* es la muestra wt de hoja en donde normalmente no se expresa .

Las líneas pRT23.8.5 y pRT19.3.3 presentan una mayor expresión de *AGL21* en raíz en comparación con wt (figura 11).

Los resultados de los estudios de patrones de expresión revelaron que el ARN de este gen se localiza en raíz y flor, el encontrar expresión de *AGL21* en hoja de las líneas de la generación T3 nos comprueba que la construcción 35S::*AGL21* es de sobre-expresión debido a que las líneas presentan expresión ectópica. En las muestras de la figura 11 B se puede apreciar que todas las líneas transgénicas tienen la presencia del transcrito de *AGL21* en hoja. Esto nos indica que hay sobre-expresión de este gen en todas las líneas seleccionadas para el Northern blot.

### **5.3 Análisis comparativos de los fenotipos de las líneas de sobre-expresión y las silvestres.**

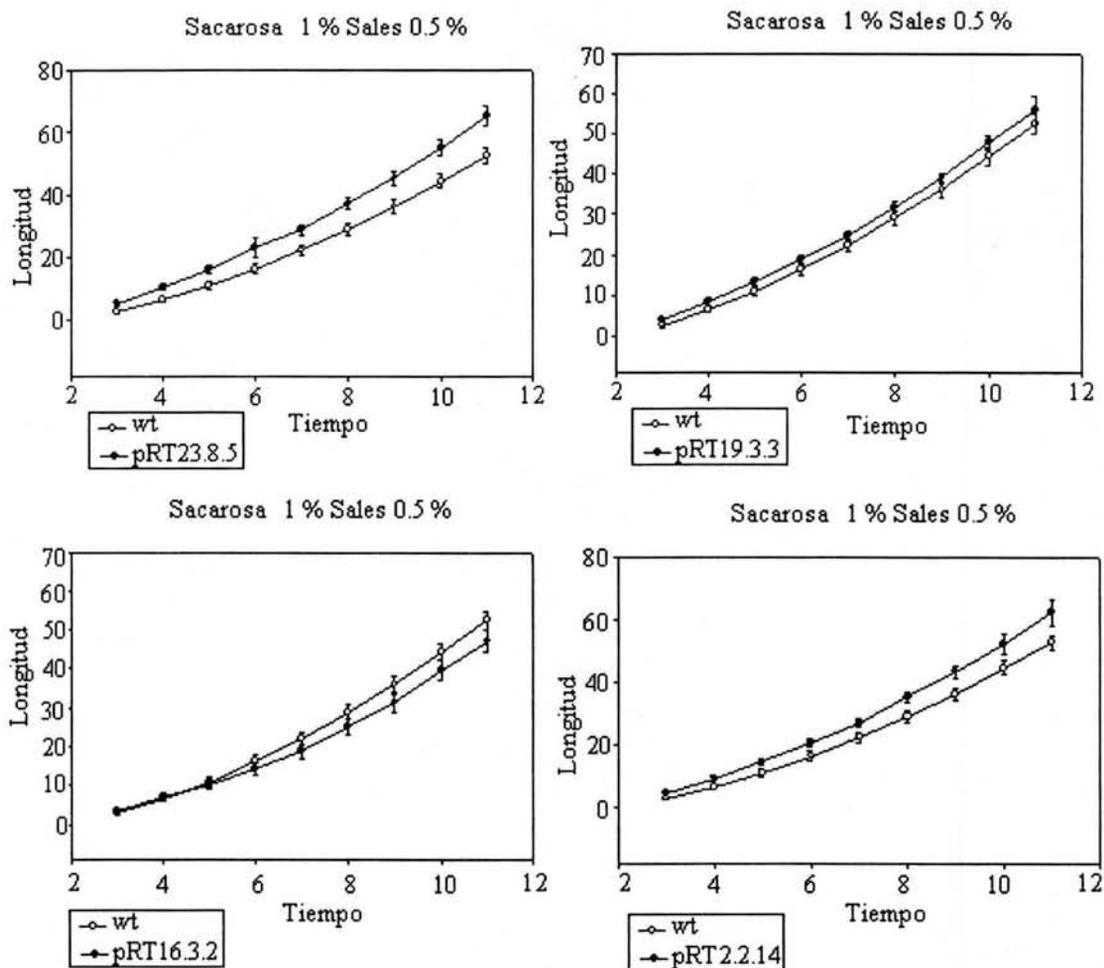
#### **5.3.1 Estudio del crecimiento de la raíz primaria en diferentes concentraciones de medios de cultivo.**

Una vez comprobada la sobre-expresión de las líneas homocigotas se procedió a analizar el crecimiento de la raíz en diferentes medios de cultivo, para determinar si se mantenía alguna diferencia con plantas silvestres. Para esto se escogieron las líneas pRT23.8.5, pRT19.3.3, pRT16.3.2 y pRT2.2.14, ya que estas presentaron en ensayos preliminares se vio un mayor crecimiento comparado con plantas silvestres.

Se encontró una tendencia clara en que la raíz de las líneas que sobre-expresan *AGL21* crece más que la raíz de plantas silvestres. El primer medio que se escogió (sacarosa 1% y sales 0.5X) para hacer las cinéticas de crecimiento fue uno con una concentración de sales y azúcar moderadas (figura 12). En este medio se pueden observar diferencias significativas entre el crecimiento radicular de las líneas pRT23.8.5 y 2.2.14 comparado con las plantas silvestres. Sin embargo la longitud de la raíz de la línea pRT23.8.5 llegó a los 11 días a medir aproximadamente 70 mm, mientras que la 2.2.14 llegó a 60mm.

Las gráficas de la pRT19.3.3 y la pRT16.3.2 se repitieron con un mayor número de muestras debido a que en una primer gráfica los errores se sobrelapan y no se podía discernir si realmente había una diferencia significativa o no (datos no mostrados). Al repetir las gráficas se observó que aunque las barras de error disminuían la diferencia en el crecimiento seguía sin ser significativa para ambas.

Posteriormente se disminuyó la cantidad de sacarosa y se aumentó la concentración de sales (figura 13). Con esto se buscaba ver si aún se mantenía una diferencia significativa de las líneas pRT2.2.14 y pRT23.8.5. Al someterlas a una situación de mayor estrés no se vio una diferencia clara entre las transgénicas y las silvestres. Pero aún en estas condiciones las raíces de la línea pRT19.3.3 crecieron significativamente más que las silvestres.

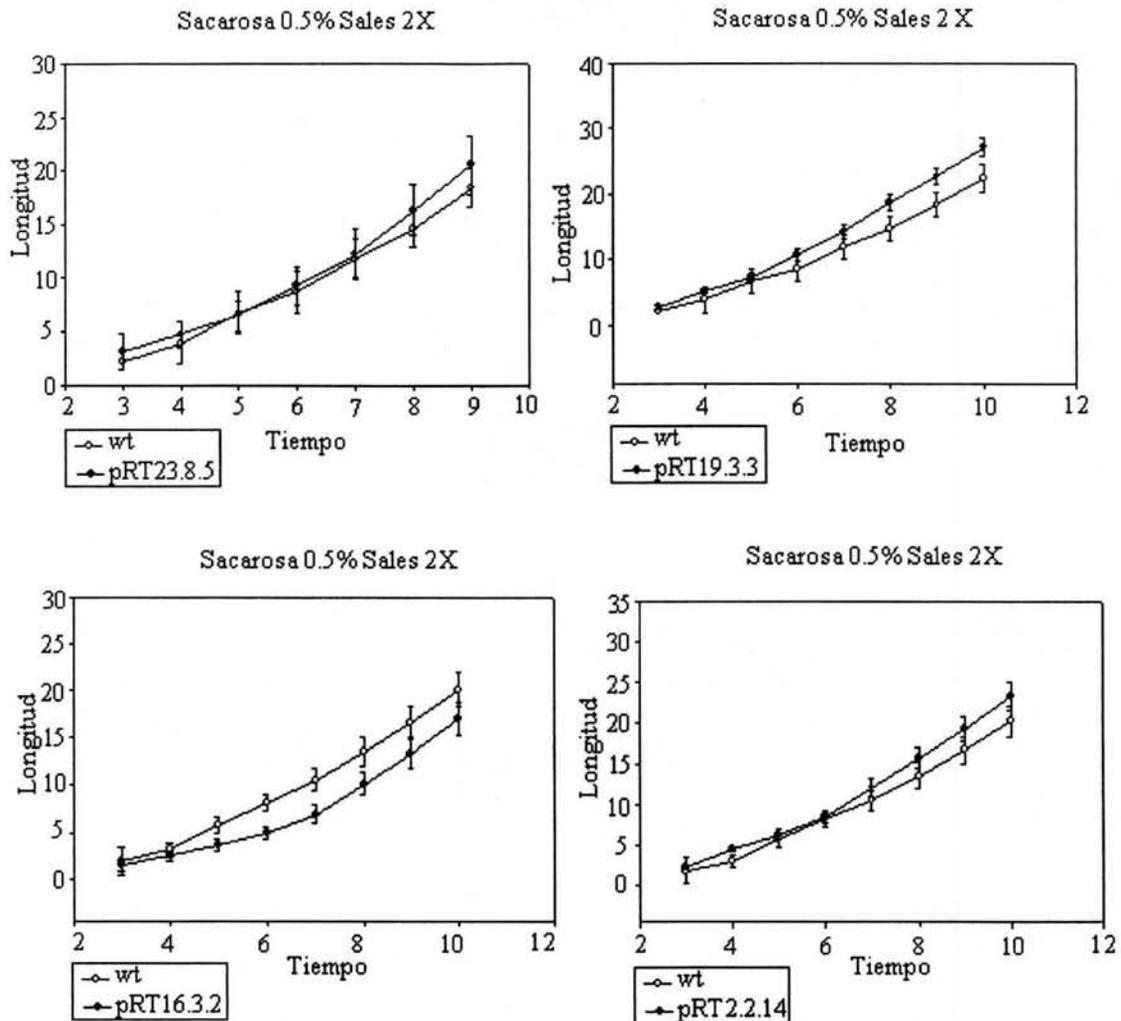


**Figura 12.** Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5, pRT19.3.3, pRT16.3.2 y pRT2.2.14 en medio de cultivo con sacarosa al 1% y sales al 0.5X. Se crecieron 20 plantas de cada línea por 11 días, a partir del 3<sup>er</sup> día se registro diariamente y a la misma hora la longitud en mm. de la raíz por 9 días. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

Debido a que las líneas pRT23.8.5 y la pRT19.3.3 tenían un comportamiento similar en el crecimiento y mantenían diferencias significativas con wt se escogieron para hacer otras cinéticas de crecimiento. Además en estas líneas se observó mayor intensidad de la expresión de *AGL21* en el Northern blot.

El primer medio que se escogió (sacarosa 1% y sales 0.5X) no tenía altas concentraciones de sales y azúcar. En este medio se pueden observar diferencias significativas para las líneas pRT23.8.5 y pRT2.2.14 (aunque en esta última la diferencia de tamaño de la raíz con respecto a las plantas silvestres no es muy grande). Las gráficas de la pRT19.3.3 y la pRT16.3.2 se repitieron con un mayor número de muestra pero la

diferencia en el crecimiento seguía sin ser significativa en ambos casos sugiriendo que la cantidad de transcrito del gen *AGL21* está correlacionada con la velocidad de crecimiento radicular.



**Figura 13.** Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5, pRT19.3.3, pRT16.3.2 y pRT2.2.14 en medio de cultivo con sacarosa al 0.5% y sales al 2X. En cada caso, se crecieron 20 plantas de cada línea por 10 días, a partir del 3<sup>er</sup> día se registró la longitud en mm. de la raíz diariamente y a la misma hora por 8 días. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

Se comparó el crecimiento de las transgénicas y las silvestres en un medio con una alta concentración de azúcar en donde se ha visto que las raíces wt crecen más rápido. Las líneas pRT23.8.5 y pRT19.3.3 también crecieron significativamente más que las silvestres en este medio (figura 14) lo que indica que la diferencia en el desarrollo de la raíz producida por la mayor cantidad de mensajero de *AGL21* es independiente de

varios medios de cultivo. Aunque no se detecta diferencia cuando se crecen en medios en donde la disponibilidad de carbono es baja y sales alta.

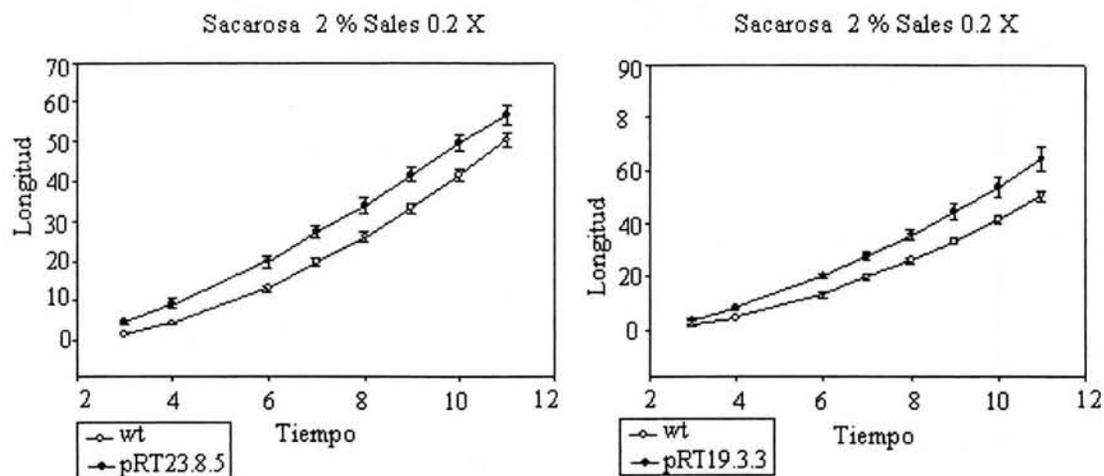


Figura 14. Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5 y pRT19.3.3 en medio de cultivo con sacarosa al 2% y sales al 0.2X. Se crecieron 20 plantas de cada línea por 10 días, a partir del 3<sup>er</sup> día se registró la longitud en mm. de la raíz diariamente y a la misma hora durante 9 días. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

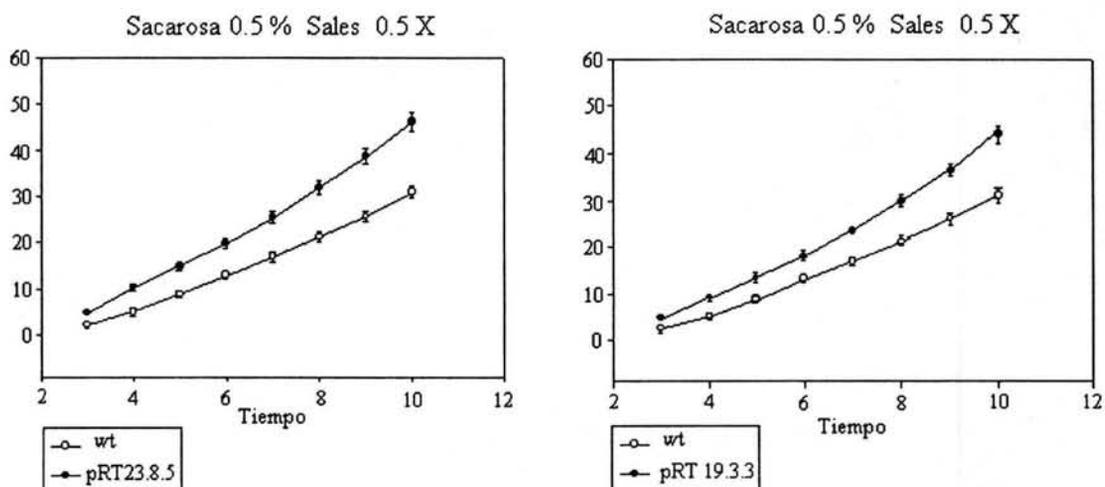


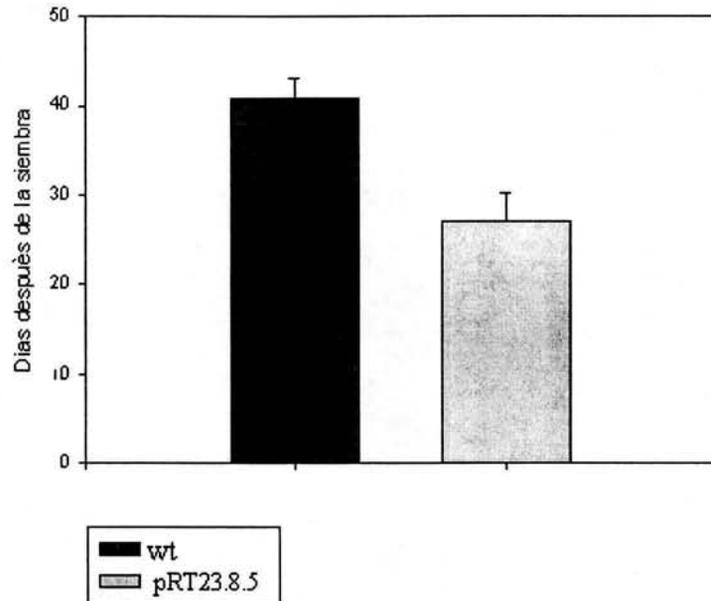
Figura 15. Curvas de crecimiento de la raíz de las líneas de sobre-expresión pRT23.8.5 y pRT19.3.3 en medio de cultivo con sacarosa al 0.5% y sales al 0.5X. Se crecieron 20 plantas de cada línea por 10 días, a partir del 3<sup>er</sup> día se registro diariamente y a la misma hora la longitud en mm. de la raíz por 9 días. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

Finalmente en un medio con concentraciones de sacarosa al 0.5% y sales al 0.5X se encontró una mayor diferencia entre las transgénicas que sobreexpresan *AGL21* y las silvestres (figura 15). Es interesante que la línea con mayores niveles de transcrito del gen bajo estudio (pRT23.8.5) es la que presenta un mayor crecimiento radicular y una mayor diferencia con respecto al tipo silvestre. Es importante hacer análisis a nivel celular para entender las bases de los fenotipos de crecimiento de raíz en las líneas de sobre-expresión de *AGL21*.

Las raíz de las líneas pRT23.8.5 y pRT19.3.3 responden a la disponibilidad de nutrientes en el medio, ya que cuando la concentración de sales y azúcar es baja (figura 14) la raíz crece mas. Sin embargo cuando se mantiene la misma concentración de sal (5X) y se aumenta la concentración de azúcar (figura 12) las diferencias en el crecimiento con wt es poca en la línea pRT23.8.5 y no significativa para pRT19.3.3 . De igual manera, si la concentración de azúcar se mantiene baja (0.5%) y se aumenta la concentración de sal las diferencias con wt no son perceptibles en la línea pRT23.8.5.

### 5.3.2 Efecto de la sobre-expresión de *AGL21* en el tiempo de floración

La sobre-expresión de *AGL21* aceleró de manera significativa el tiempo de floración (medido como el tiempo transcurrido hasta la emergencia del escapo de la inflorescencia) con respecto a las plantas silvestres (figura 16).



**Figura 16. Tiempo de emergencia del escapo de la inflorescencia en plantas de la línea de sobre-expresión pRT23.8.5 y wt.** Se sembraron en tierra 20 semillas por línea, se crecieron en tierra en un cuarto con fotoperiodo de días largos y se registró el día en el cual el tallo principal de la planta se elongaba a un cm de longitud (emergencia del escapo). Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

Los fenotipos de número de hojas de roseta, hojas caulinares (figura 17) y tiempo a la producción de la primera flor (figura 18) coinciden con el fenotipo de tiempo de producción del escapo. En todos los casos, la línea de sobre-expresión de *AGL21* (pRT23.8.5) adelanta la transición a la floración con respecto al tipo silvestre y acorta la fase vegetativa. El único caso que no fue significativo fue el de las hojas caulinares, pero en este caso se explica porque esta característica no está directamente relacionada con la transición a la floración, sino con la tasa de acumulación de entrenudos en el escapo de la inflorescencia en la línea que sobreexpresa *AGL21*.

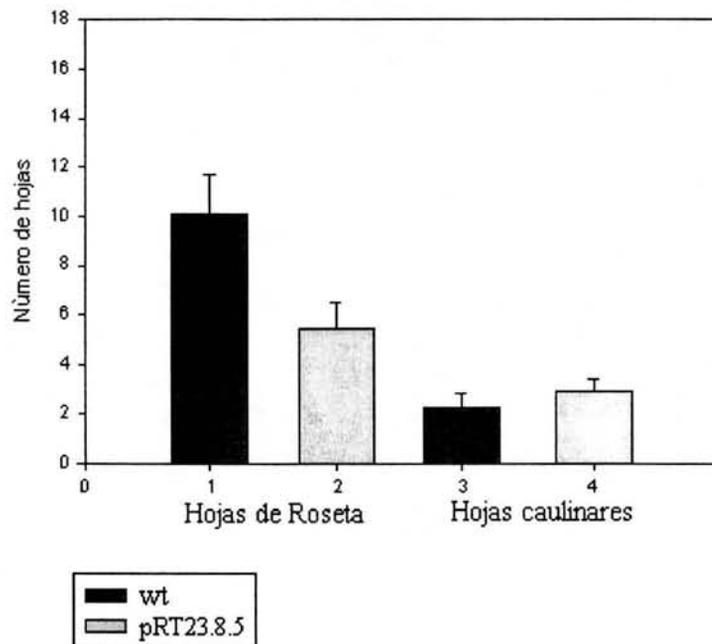


Figura 17. Comparación del número de hojas de roseta y caulinares entre la línea de sobre-expresión pRT23.8.5 y wt al momento de emergencia del escapo. Se registró el día en el que el tallo floral tenía 1 cm. de longitud. Las plantas se crecieron en fotoperiodo de días largos. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

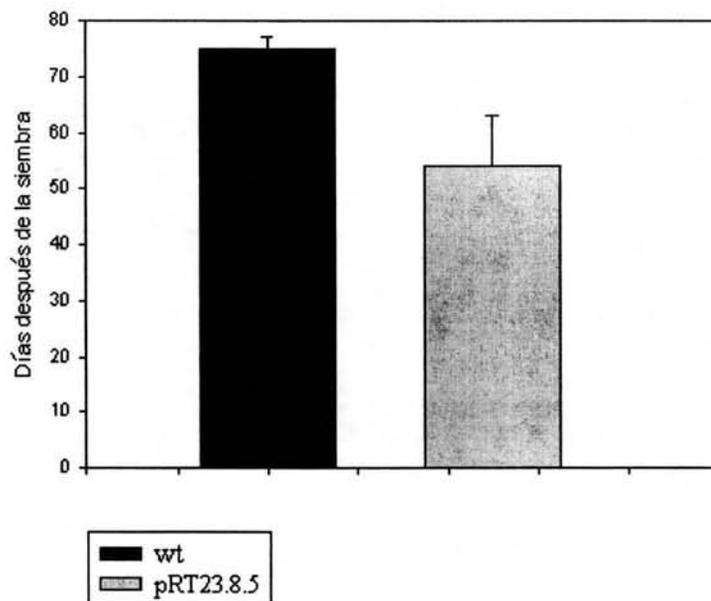


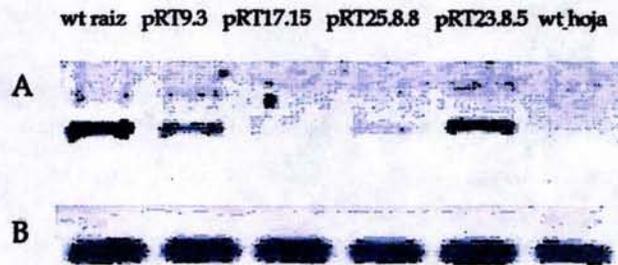
Figura 18. Comparación del tiempo de floración de la línea de sobre-expresión pRT23.8.5 y wt. Se registró el día en el que abrió el primer botón floral de las plantas. Las plantas se crecieron en fotoperiodo de días largos. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

Esta última gráfica (figura 18) tiene una diferencia muy amplia de el tiempo de emergencia del escapo a la aparición de la primer flor para el tipo silvestre, esto se puede deber a factores ambientales externos, sin embargo su diferencia con la línea de sobre-expresión es significativa.

Los resultados preliminares mostrados en este trabajo indican que el gen *AGL21* podría estar involucrado en los procesos de floración, sin embargo es importante repetir estos experimentos con condiciones ambientales estandarizadas y un mayor número de plantas, ya que de las 20 semillas que se sembraron solo germinaron 14 plantas para la pRT23.8.5 y 12 para la wt. También se deben usar líneas que ya estén caracterizadas en las vías de control de la transición a la floración.

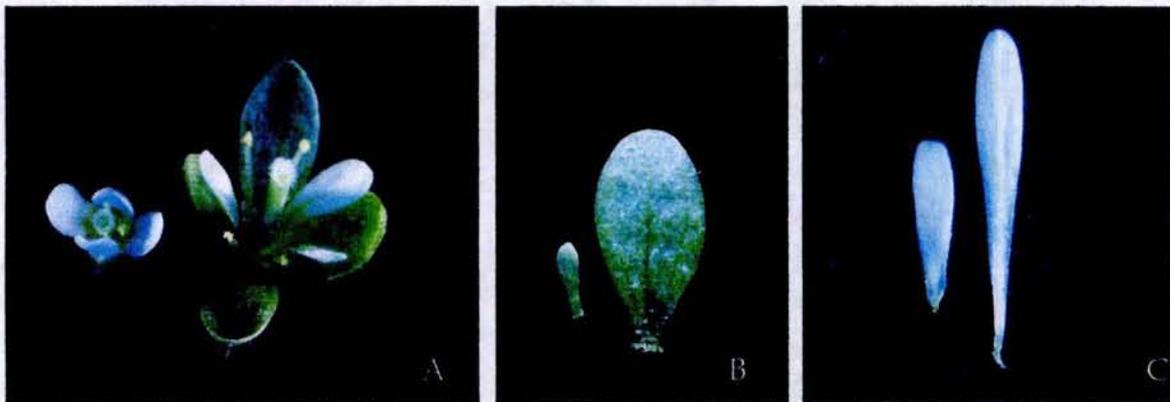
### 5.3.3 Efecto de la sobre-expresión de *AGL21* en otros aspectos del fenotipo del vástago aéreo y en la morfogénesis floral.

Para comprobar la sobre-expresión de nuevas líneas obtenidas de la generación T3 (pRT9.3 y pRT25.8.8) se realizó un RT-PCR. En la figura 19 se puede observar que las líneas pRT9.3, pRT23.8.5 y pRT25.8.8 presentan expresión ectópica en hoja, lo que nos indica que tienen al gen *AGL21* sobre-expresado.



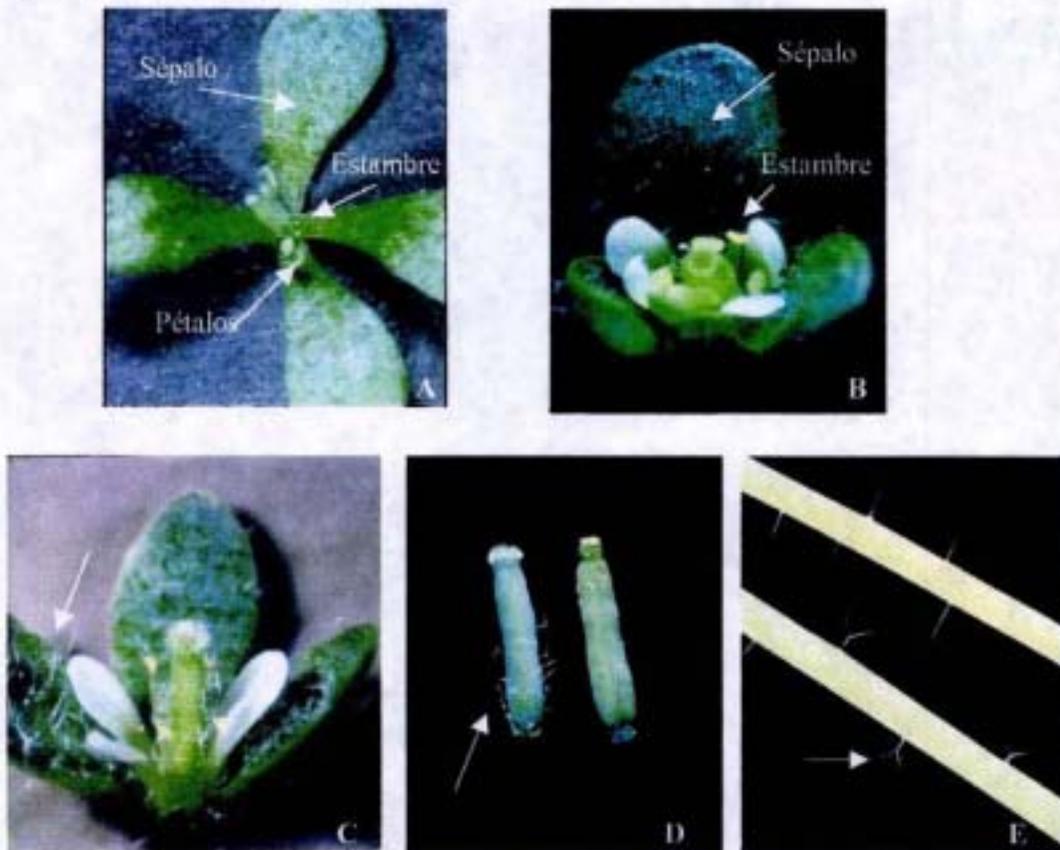
**Figura 19.** Análisis de expresión de mRNA de *AGL21* mediante RT-PCR en líneas de sobre-expresión de este gen (pRT9.3, pRT17.15, pRT25.8.8 y pRT23.8.5). A) *AGL21* y B) Ubiquitina. Se utilizaron como controles las muestra de raíz y hoja del tipo silvestre. También se utilizó como control ADNc de hoja de la línea 23.8.5 debido a que ya se había comprobado su sobre-expresión por Northern blot.

Las líneas pRT9.3, pRT25.8.8 y pRT23.8.5 presentaron un fenotipo aberrante en la flor. Las flores son mas grandes debido a que los sépalos y pétalos crecen más que en flores silvestres (figura 20).



**Figura 20.** Fenotipo floral de las líneas de sobre-expresión de *AGL21*. A la izquierda de cada panel se muestra la flor o órganos florales de plantas silvestres y a la derecha los de las líneas de sobre-expresión. A) Flores completas para silvestre y pRT23.8.5. B) Sépalos de silvestres y pRT9.3. C) Pétalos de silvestres y pRT9.3.

En algunas flores los sépalos siguen creciendo indeterminadamente (figura 21A), pero cuando esto sucede los estambres y los pétalos no se desarrollan correctamente. También se observó que había flores de ganancia de función con una tasa de maduración de los órganos florales heterogénea (figura 21B). Además las líneas de sobre-expresión presentan tricomas compuestos en las paredes del carpelo (figuras 21C y 21D) y en el tallo (figura 21E) del eje principal de la inflorescencia. Estos tricomas son característicos de hojas y tallos vegetativos en plantas silvestres. Por lo tanto, este resultado sugiere que la sobre-expresión de *AGL21* causa una reversión parcial de las células de órganos reproductivos a identidad de órganos vegetativos. Para poner a prueba esta hipótesis, se analizaron las flores de las líneas de sobre-expresión bajo el microscopio electrónico de barrido. Esto permitió establecer la identidad celular en las líneas transgénicas.



**Figura 21.** Fenotipo de flor y tallo de wt y de las líneas de sobre-expresión 9.3, pRT23.8.5 y pRT25.8.8. A) Flor de la línea pRT25.8.8. se indica la localización de diferentes órganos. B) Flor de la línea pRT23.8.5. Con las flechas se indica los órganos florales sépalo y estambre que maduran más rápido. C) Línea pRT25.8.8 con tricomas compuesto ectópicos en la parte adaxial del sépalo, se indica con la flecha. D) Comparación del carpelo wt (lado derecho) y el carpelo de la línea pRT23.8.5 (lado izquierdo), la línea de sobre-expresión presenta tricomas ectópicos compuestos, se indica con la flecha. E) El tallo de la línea pRT23.8.5 presenta tricomas compuestos (abajo) que se indican con la flecha y la wt tricomas sencillos (arriba).

En el análisis de microscopía de barrido se encontró que las células de la superficie abaxial del sépalo en el botón floral son iguales entre las líneas de sobre-expresión y las plantas silvestres (figura 22). Sin embargo, cuando la flor madura el sépalo crece más y las células adquieren una morfología aberrante que sugiere que *AGL21* es importante en mediar la identidad normal de las células de sépalos (figura 23).

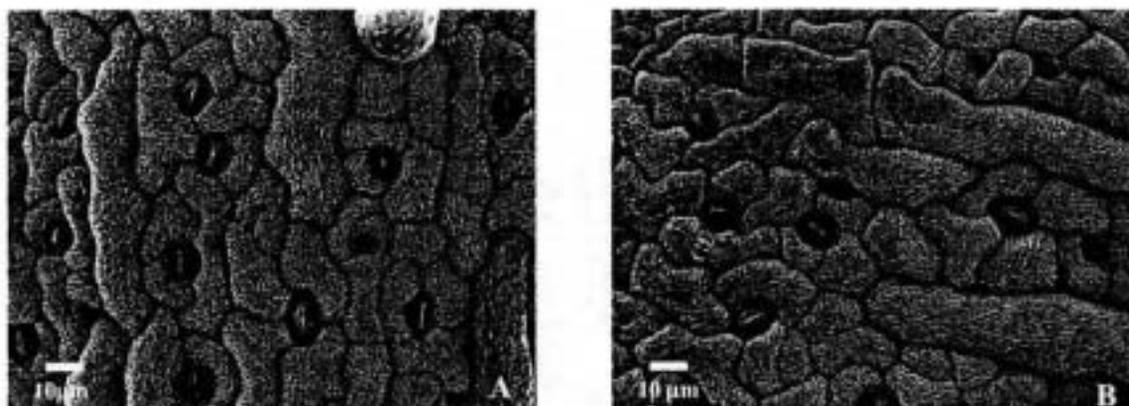


Figura 22. Células de la superficie abaxial de sépalos de flores antes de la antesis. A) silvestre B) pRT25.8.8.

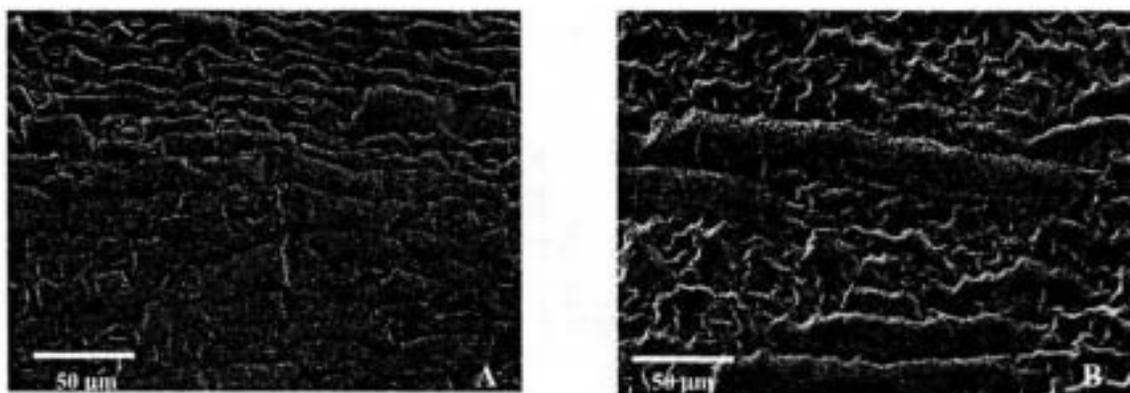


Figura 23. Células de la superficie abaxial del sépalo en flores maduras de wt y la línea de sobre-expresión 25.8.8 A) wt y B) la línea 25.8.8. Aunque estas fotos tienen el mismo aumento se puede ver que en la línea de sobre-expresión las células son más grandes.

Las células de la superficie adaxial de sépalos de flores maduras en las líneas 35S::*AGL21* son parecidas a células de hojas (figura 24 y 25)

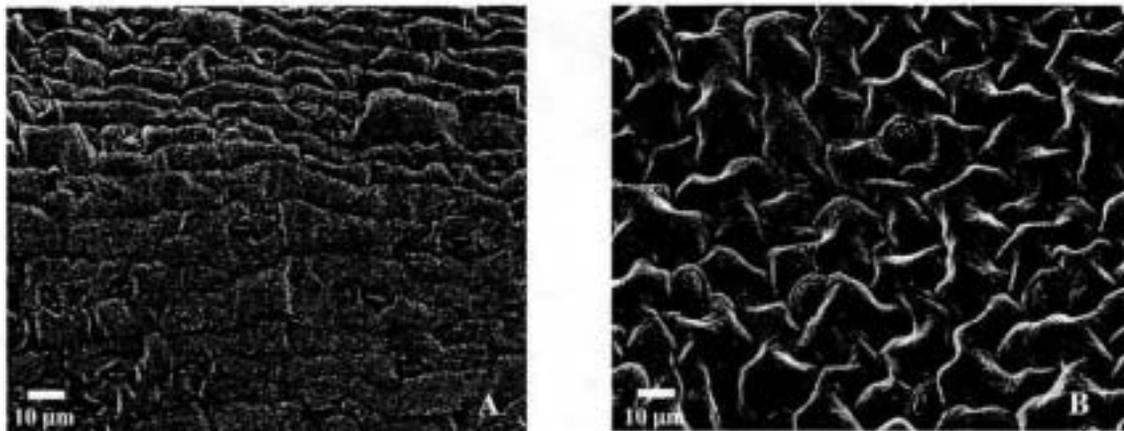


Figura 24. Células de la superficie adaxial del sépalo en flores maduras de wt y la línea de sobre-expresión pRT25.8.8. A) wt y B) la línea 25.8.8.

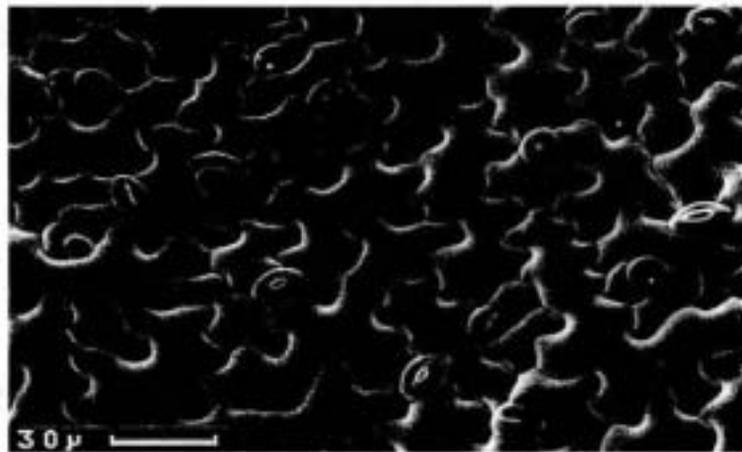


Figura 25. Células de la superficie adaxial en hoja de roseta. Fotografía tomada de Bowman 1994.

Las células de los pétalos de las líneas 35S::AGL21 también son aberrantes con respecto a las células de plantas silvestres (figura 26). En las líneas 35S::AGL21 las células son más planas y no cónicas como en las flores silvestres. Las ornamentaciones características tanto de las células de sépalos como pétalos están ausentes en las células de las flores de las líneas 35S::AGL21.

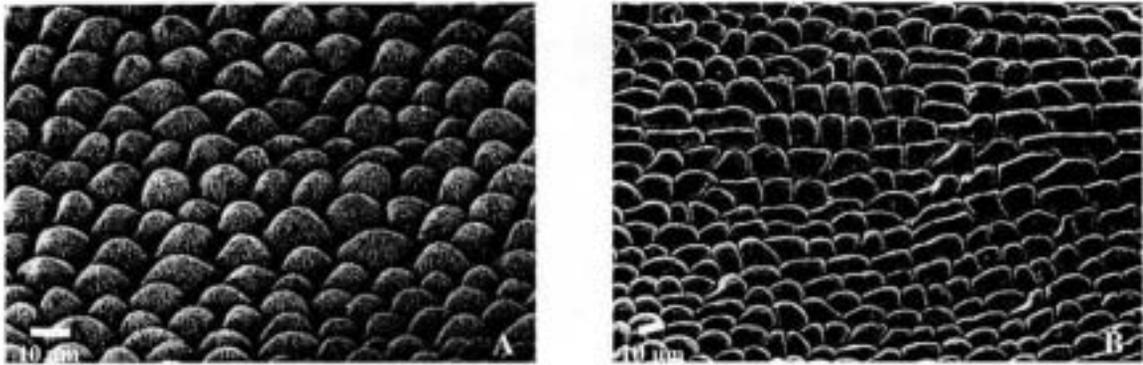


Figura 26. Región adaxial del pétalo en flores maduras de wt y la línea de sobre-expresión 25.8.8. A) wt y B) la línea 25.8.8. Aunque los aumentos son diferentes se pueden apreciar que la líneas de sobre-expresión tienen las células planas a diferencia de wt.

Estos resultados nos sugieren que el gen MADS-box *AGL21* es un importante regulador de la identidad y morfogénesis celular. Además, los análisis de microscopía de barrido en los sépalos y pétalos nos sugieren que las células de las líneas de sobre-expresión de este gen son mayores que las células de las plantas silvestres, y que por eso las raíces y los órganos florales son mayores. Entonces, es posible que este gen también medie la respuesta a señales que activan el crecimiento.

## 6. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los datos mostrados en este estudio sugieren que el gen *AGL21* tiene una función importante en la transición a la floración y en mediar, probablemente en interacción con otros genes, la determinación del tipo celular en los órganos de la flor. Sin embargo, el hecho de que la sobre-expresión de este gen resulte en fenotipos aparentemente contradictorios en términos de la transición a la floración y la alteración de la identidad celular en los órganos de la flor, sugiere que para una de sus funciones la expresión ectópica del gen está causando un fenotipo de ganancia de función, mientras que para el otro está ejerciendo un efecto dominante negativo sobre otros genes. Nuestros resultados sugieren que el gen es importante en promover la floración y el fenotipo de floración temprana de las líneas de sobre-expresión es de ganancia de función del gen. Mientras que las alteraciones en la identidad de los órganos de la flor hacia órganos con características vegetativas sugiere que la sobreexpresión del gen MADS-box *AGL21* ejerce un efecto dominante negativo sobre genes importantes en determinar la identidad y morfogénesis celular en los órganos de la flor. Además, los análisis de microscopía de barrido sugieren que las células de las líneas de sobre-expresión de este gen son mayores que las células de las plantas silvestres. Es posible que este gen también medie la respuesta a señales que activan el crecimiento o que interactue con genes importantes en regular este aspecto. El análisis celular en la raíz de las líneas de sobreexpresión de *AGL21* y en líneas mutantes de este gen posiblemente permitirá dilucidar esta cuestión pues en esta estructura es fácil cuantificar parámetros a nivel celular.

Recientemente se observó que el gen órtologo *SOC1* en *Petunia*, *UNSHAVEN* (*UNS*), al ser sobre-expresado acelera la floración y confiere características de hoja en los órganos florales (Ferrario et al., 2004). Además se transformaron plantas de *Arabidopsis* con una versión incompleta del gen *UNS* bajo el control de un promotor de sobre-expresión (35S::*UNS*), y estas plantas mostraron un fenotipo muy parecido al que se observa en las líneas de sobre-expresión de *AGL21* pero presentaron floración tardía sugiriendo que en ambos casos la construcción actuó con un efecto dominante negativo en la determinación de los órganos de la flor. Además, los autores de este trabajo transformaron *A. thaliana* con la misma construcción y obtuvieron fenotipos parecidos a mutantes *ap1-1*. Por ello, realizaron un cruce de 35S::*UNS*ΔMI y 35S::*AP1* y recuperaron el fenotipo silvestre en algunas líneas. Estos resultados sugieren que la construcción (35S::*UNS*ΔMI) introducida en *A. thaliana* produce un efecto dominante negativo sobre

*AP1*. Dado que los fenotipos observados en este trabajo son muy similares, aunque más fuertes, que los encontrados en nuestro estudio, sugerimos que el fenotipo de las líneas de 35S::AGL21 en la identidad de los órganos de la flor se debe a un efecto dominante negativo sobre *AP1*. Para comprobar esta hipótesis es importante hacer la cruce de 35S::AP1 con 35S::AGL21 para observar si las plantas recuperan el fenotipo silvestre y también estudiar la expresión de *AP1* en las líneas de sobreexpresión de *AGL21* y en las mutantes de este gen en comparación a líneas silvestres. En caso de que el fenotipo floral observado en las líneas de sobreexpresión de este trabajo sea por un efecto dominante negativo y no de regulación transcripcional de *AP1*, se espera que los niveles de este gen no varíen entre las distintas líneas a probar.

Una alternativa a la hipótesis planteada arriba de un efecto dominante negativo sobre *AP1* en la determinación de los fenotipos florales es que el gen *AGL21* sea un regulador negativo de *CO*, por lo que al tener mucho transcrito de *AGL21* en las líneas 35S::AGL21, *CO* se encontraría reprimido todo el tiempo y no podría activar a *FT* que es un regulador positivo de *AP1*, *TFL1* el cual es un regulador negativo de la transición a la floración y *SOC1* que es un regulador positivo de la transición a la floración (Yu et al., 2002). Esta regulación de *CO* por parte de *AGL21* podría por lo tanto explicar tanto el fenotipo de la flor como el de transición al estado reproductivo en las líneas de sobreexpresión de *AGL21*. De ser esto así en la descendencia de una cruce de plantas 35S::CO con 35S::AGL21 se recuperaría el fenotipo silvestre, tanto para el tiempo de floración como el fenotipo vegetativo de la flor de las líneas de sobreexpresión de *AGL21*. Esta hipótesis es también compatible con el resultado de que la descendencia de la cruce entre 35S::AGL21 y 35S::AP1 recuperara el fenotipo silvestre en los órganos florales. Además, si *AGL21* es un regulador negativo de *CO* se espera que en mutantes de el primero, el segundo se exprese a niveles más altos o de manera ectópica, que en las líneas 35S::AGL21 *CO* no se exprese o se exprese a niveles menores, y que los genes *FT*, *SOC1* y *TFL1* se expresen en niveles más bajos que los normales en las líneas de sobre-expresión de *AGL21*. Actualmente se están iniciando estos experimentos para poner a prueba las hipótesis desprendidas de este trabajo.

## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó el patrón de expresión mediante RT-PCR para los genes MADS-box con una expresión específica en raíz con base en datos de hibridación tipo Northern (Rounsley et al., 1995). Los datos recabados en esta tesis sugieren que estos genes también se expresan en algunas estructuras reproductivas, pero no lo hacen constitutivamente en todos los tejidos. Existen diferencias en los patrones de expresión reportados en la literatura y los resultados de este trabajo, lo que se puede deber a que los genes MADS se expresan diferencialmente a lo largo del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados de este trabajo revelan la expresión de los genes MADS en los siguientes tejidos.

- *AGL17* - En flor, botón floral, silicuas, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *AGL16* - En flor, botón floral, silicuas, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *ANR1* - En flor, botón floral, silicuas, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *AGL14* - En flor, botón floral, silicuas, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *SOC1* - En flor, botón floral, silicuas, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *AGL19* - En botón floral, silicuas, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *AGL42* - En flor, botón floral, hojas de roseta, hojas caulinas y raíz.
- *AGL21* - En flor y raíz.

*AGL21* se expresa de manera específica (resultados de Northern blot y RT-PCR) en raíz y flor, indicando que este gen podría estar involucrado en los procesos de desarrollo de estos órganos.

Se obtuvieron líneas homocigotas de sobreexpresión de *AGL21* y los análisis de estas líneas sugieren que *AGL21*:

1. Es importante en mediar positivamente el crecimiento de la raíz.
2. Es un regulador positivo de la transición a la floración.
3. Interactúa con *API* en la determinación del meristemo floral y en la identidad de los órganos de la flor y el fenotipo de su sobreexpresión es por un efecto dominante negativo, o es posiblemente un regulador negativo de *CO*.

## 8. REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, R. E., Pelaz, S., Liljegren, J. S., Gold, E. G., Burgeff, C., Ditta, S. C., Ribas, L., Martínez-Castilla, L., Yanofsky, F. M. (2000a) An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci* Vol. 97 :5328 – 533
- Alvarez-Buylla, R. E., Liljegren, J. S., Pelaz, S., Gold, E. G., Burgeff, C., Ditta, S. C., Ribas, L., Vergara-Silva, F., Yanofsky, F. M. (2000b) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant Journal* Vol. 24: 457-466
- Ambrose, B.A., Lerner, D.R., Ciceri, P., Padilla, C. M., Yanofsky, M. F., y Schmidt, R. J. (2000) Molecular and genetic analices of the *Silky 1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Mol.Cell.* Vol.5: 569-579
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. Vol 408: 796:815
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Alvarez, J., Wigdel, D., Meyerowitz, E.M y Smyth, D.R. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*. Vol. 119:721-743
- Bowman, J. (1994) *Arabidopsis* an atlas of morphology and development. Edit. Springer-Verlag. Impreso en New York
- Burgeff D. C., (2001), Tesis de doctorado – Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: Patrones de expresión insitu y análisis filogenético
- Burgeff, D. C., Liljegren S. J., Tapia, L. R., Yanofsky, M.F., Alvarez-Buylla, E. R. (2001) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* Vol 214: 365-272
- Coen, E.S., Meyerowitz, E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* . Vol.353 :31-37
- Davidson, E.H., Rast, J.P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C., Minokawa, C., Amore, G., Hinman, V., Arenas-Mena, C., Otim, O., Brown, C.T., Livi, C.B., Lee, P. Y., Revilla, R., Rust, A.G., Pan, A., Schilstra, M.J., Clarke, P. J. C., Arnone, M. I., Rowen, L., Cameron, R. A., Mc Clay, D. R., Hood, L., Bolouri, H. (2002) A genomic regulatory network for development. *Science* Vol.295:1669-1678

- Di Laurenzio, L., Wisocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysch, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., Benfey, P.N. (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* Vol.86 : 423-433
- Doebley, J., Lukens, L. (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant cell*. Vol.10:1075-1082
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. Vol.119:71-84.
- Dolan, L., Okada, K. (1999) Signalling in cell type specification. *Sem. Cell& Dev.Biol.* Vol.10:149-156
- Ferrario S., Busscher J., Franken J., Gerats T., Vandenvussche M., Angenent C. G., Immink G.H. R. (2004) Ectopic expression of the petunia MADS-Box gene *UNSHAVEN* accelerates flowering and confers leaf-like characteristics to floral organs in a Dominant-Negative manner. *Plant cell*. Vol. 1-16
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R. (1998) The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development . *Development*. Vol. 125: 1509-1517
- Hamann, T., Mayer, U., Jürgens, G. (1999) The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary roots formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development*. Vol. 126: 1387-1395.
- Jack, T. (2001) Plant development going MADS. *Plant Mol. Biol.* Vol.46:515-520
- Lee, H, Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.A., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M., y Lee, I. (2000) The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes and Dev.* Vol 14: 2366-2376
- Leiser, O., y Day, S. (2003) Mechanisms in plant development. Editorial Blackwell
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M.F. (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box gene control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* Vol. 404 : 766-770.
- Martinez-Castilla, L., Alvarez-Buylla, R. E. (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc Natl Acad Sci*. Vol.100 : 13407-13412

- Mendoza L, Alvarez-Buylla ER (1998) Dynamics of the genetic regulatory network for *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology* Vol.193:307-319
- Meyerowitz, E.M. (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* Vol.56 : 263-269
- Meyerowitz, E.M. (1994) Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. 21-36. En: Meyerowitz, E.M. y Somerville, D.R. (eds.). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, E.U.A.
- Meyerowitz, E.M. (1997). Plants and the logic of development. *Genetics* Vol.145: 5-9
- Ng M., Yanofsky M.F. (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Rev.Gen.*Vol.2:186-195.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*. Vol.405:200-203.
- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E. M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* Vol.378 : 1079-1101
- Rounsley, S.D, Ditta G.S. y Yanofsky MF (1995) Diverse roles for MADS-box genes in *Arabidopsis* development. *Plant cell*. Vol 7: 1259-1269
- Samach, A., Onouchi, H, Gold, SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF y Coupland G (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*. Vol. 288 : 1613-1616
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen V, Terlow M, Lawson E, Dean D, Weisbeek P. (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and meristem initials. *Development*. Vol.120:2475-2487.
- Scheres, B., McKhann, H., Van den Berg, C., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G y Weisbeek, P. (1996) Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*. Vol 187: 97-105.
- Scheres, B. y Wolkenfelt, H. (1998) The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* Vol.36: 21-32
- Scheres, B., Benfey, N. P. (1999) Asymmetric cell division in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 50 : 505-537

- Simpson, G. G., Gendall A.R., Dean, C. (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* Vol. 15: 519-550
- Smyth, D. (2000) A reverse trend-MADS function revealed. *Trends Plant Sci.* Vol.5: 315-317.
- Theissen, G., Saedler, H. (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's biogenetic law revisited. *Journal Curr. Opin. Genet. Dev.* Vol. 5; 628-639
- Van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B. (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature.* Vol 378: 62-65
- Van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., Scheres, B. (1997) Short range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature.* Vol 390: 287-289.
- Vergara-Silva, F., Martínez-Castilla, L., Alvarez-Buylla, R.E. (2000) MADS-box genes: development and evolution of plant body plans. *Journal of Phycology.* Vol.36: 803-812.
- Vergara-Silva, F. y Alvarez-Buylla, E.R. (2001) Descubrimiento de los genes homeóticos en la era molecular y la construcción de una biología evolutiva del desarrollo. 84-113. En: Rudomin, P. y Blazquez-Graf, N (coord.). *Ciencias de la vida.* 1era ed. Siglo XXI editores, México.
- Wilson, Z.A. (2000). *Arabidopsis a practical approach.* Oxford university press.
- Winter, K. Becker, A., Munster, T., Kim, J.T., Saedler, H., Theissen, T.(1999) MADS-box genes reveal that Gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*Vol.96:7342-7347
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (1998) *Principles of development.* Current Biology LTD. Oxford University Press, 484p.
- Yanofsky, M.F., Meyerowitz E.M., (1991) AGL1-AGL6, An *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* Vol.5(3):484-95
- Zhang, H., Forde, B.G. (1998) An *Arabidopsis* MADS-Box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* Vol279: 407-409

Zhang, H., Forde, B.G. (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. J. Exp. Bot. Vol.51: 342 51-59

## ANEXO

### Esterilización y vernalización de semillas.

1. Se colocan las semillas en un tubo eppendorf.
2. Se les agrega un mililitro de EtOH al 75% y se agitan con vortex por 5 minutos.
3. Se retira el EtOH y se agrega 1ml una solución de cloro al 5% y SDS al 1% (Dodecil Sulfato de Sodio).
4. Se dejan agitando por 15 minutos.
5. Se retira la solución en la campana de flujo laminar y se les agrega 1ml de agua bidestilada.
6. El agua se retira y se les agrega nuevamente agua hasta que ya no aparezca espuma al agitar los tubos.
7. Una vez enjuagadas las semillas se colocan a 4°C por 2 días.

### Síntesis de ADNc con la enzima Reverso Transcriptasa (superscript) para RT-PCR.

1. En un tubo eppendorf agregar lo siguiente :
  - 1µl de oligo adaptador (500µg/ml)
  - 1µl de una mezcla de dNTP`s (10Mm de cada uno, dATP, dGTP, dCTP y dTTP a un pH neutral)
  - 12 µl de agua destilada, en donde previamente ya se disolvió el ARN.
2. Calentar la mezcla a 65°C por 5 minutos y colocar inmediatamente en hielo, dar un spin y agregar lo siguiente:
  - 4µl de Buffer de la primera cadena (Firs-strand buffer)
  - 2µl de DTT 0.1 M (ditriotreitol).
3. Se mezclan suavemente y después se incuban a 37°C por 2 minutos.
4. Se añade 1µl (200 unidades) de Superscript y se mezcla bien por piepeteo.
5. Incubar a 37°C por 50 minutos y después a 70°C por 15 minutos
6. Colocar inmediatamente en hielo y añadir 1µl de E.coli Rnase H.
7. Incubar por 20 minutos a 37°C.

### **Extracción de ARN total con Tri Reagent (Trizol)**

1. Colocar cada muestra (100mg de tejido) en un tubo eppendorf estéril y congelar con nitrógeno líquido.
2. Moler la muestra (con palitos de plástico o varillas de vidrios) hasta que se forme un polvo fino homogéneo.
3. Agregar 1 ml de trizol a cada muestra y homogenizar con la pipeta
4. Mantener las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos
5. Agregar 0.2ml de cloroformo y agitar por 15 segundos.
6. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
7. Retirar la fase acuosa (superior) y transferirla a un nuevo tubo esteril.
8. Agregar 1.5ml de isopropanol.
9. Mantener las muestras a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos.
10. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
11. Remover el sobrenadante y lavar la pastilla (ARN precipitado) con 1 ml de EtOH al 75%.
12. Agitar con vortex y después centrifugar 5 minutos a 10,000 a 4°C.
13. Eliminar el EtOH y dejar que seque la pastilla de ARN por aproximadamente 5 minutos.
14. Resuspender la pastilla en 20 µl de agua bidestilada.

### **Fijación en FAA y deshidratación.**

1. Hacer la mezcla de fijación (EtOH 50%, Acido acetico 5%, Formaldehido 3.7%, Agua 41.3%).
2. Añadir de 10-15 ml de esta mezcla de fijación en un vial de 20 ml.
3. Cortar las muestras que se van a fijar e inmediatamente colocarlas en los viales (se ponen alrededor de 30 piezas de tejido por vial).
4. Colocar el vial en una bomba de vacío por 15 minutos.
5. Quitar el vacío suavemente y repetir el paso 4.
6. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas.
7. Repetir el paso 4.
8. Quitar el vacío e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

9. Remover la mezcla de fijación y añadir alcohol al 50%.
10. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos y añadir alcohol al 50%.

#### DESHIDRATACIÓN

11. Remover el alcohol al 50% y remplazar con alcohol al 60%.
12. Incubar de 20-30 minutos.
13. Remover el alcohol al 60% y añadir alcohol al 70%.
14. En el paso anterior se puede almacenar a 4°C.
15. Repetir los cambios de alcohol hasta llegar a alcohol al 100%.