

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**CLONACIÓN DE *TSL* Y *STY* EN
Opuntia stenopetala. DOS GENES
ASOCIADOS AL DESARROLLO DEL
ESTILO Y EL ESTIGMA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. GREGORIO OROZCO ARROYO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2005



m. 346979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Ciudad Universitaria, D.F. a 19 de mayo del 2005.

OROZCO ARROYO GREGORIO

No. de cuenta: 95247900

Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del 7 de marzo del 2005, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental)** del Posgrado en Ciencias Biológicas, con la tesis titulada: **"Clonación de TSL y STY en Opuntia stenopetala. Dos genes asociados al desarrollo del estilo y el estigma"**, integrado de la siguiente manera:

Presidente: **Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán**
Vocal: **Dr. Felipe Cruz García**
Secretario: **Dra. Sonia Vázquez Santana**
Suplente: **Dr. Luis Felipe Jiménez García**
Suplente: **Dr. César Augusto Domínguez Pérez-Tejada**

Sin más por el momento, me despido.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

C. c. p. Miembros del Jurado.
C. c. p. Expediente del Alumno.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica en el Conjunto E de la Facultad de Química y en el laboratorio de Desarrollo en Plantas del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana.

Para la realización de la presente tesis gocé de las becas otorgadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La investigación fue apoyada por el proyecto de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico – Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) IN216105-3 "Análisis molecular del desarrollo de los órganos reproductivos en plantas unisexuales de *Opuntia stenopetala* como un camino para entender la evolución del diocismo".

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de la tesis estuvo formado por:

Dra. Sonia Vázquez Santana	Facultad de Ciencias, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Francisco Molina Freaner	Instituto de Ecología, UNAM
Dr. César Augusto Domínguez	Instituto de Ecología, UNAM

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
ANTECEDENTES.....	5
Reproducción Sexual en Angiospermas.....	5
Sistemas Sexuales en Angiospermas.....	6
Desarrollo Floral.....	9
Genes de Identidad Floral.....	10
Genes Ligados a la Determinación del Sexo.....	13
<i>Opuntia stenopetala</i>	16
STYLISH.....	17
CRABS CLAW.....	19
TOUSLED.....	22
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Material Biológico.....	25
Purificación de RNA total.....	25
Purificación de DNA total.....	27
Amplificación por PCR y Clonación.....	28
Análisis de Secuencias.....	32
Southern Blot.....	32
Preparación de Células Competentes.....	34
Inclusión en LR-White para Cortes Histológicos	34
RESULTADOS.....	35
Estructura del Estigma y Estilo de las Flores Femeninas.....	35
Estructura del Estilodio de las Flores Masculinas.....	37
Clonación de un Gen Ortólogo de <i>STY</i> en <i>O. stenopetala</i>	39
Amplificación de <i>OstSTY</i> ♂ y <i>OstSTY</i> ♀ por PCR.....	41
Análisis de Secuencias.....	42
Amplificaciones por PCR Individuales.....	46
Clonación de un Gen Ortólogo de <i>CRC</i> en <i>O. stenopetala</i>	47
Amplificación de <i>CRC</i> en <i>O. stenopetala</i>	48
Clonación de un Gen Ortólogo de <i>TSL</i> en <i>O. stenopetala</i>	51
Amplificación de <i>OstTSL</i> ♂ y <i>OstTSL</i> ♀ por PCR.....	52

Análisis de Secuencias.....	55
Amplificaciones por PCR Individuales.....	61
DISCUSIÓN.....	63
Estructura del Estilo/Estigma en <i>O. stenopetala</i>	63
<i>OstSTY</i> ♂ y <i>OstSTY</i> ♀ son Genes Ortólogos a <i>STY</i> de <i>A. thaliana</i>	65
Posible Papel de <i>OstSTY</i> en el Desarrollo del Gineceo.....	66
<i>OstSTY</i> Tiene Mayor Similitud con <i>STY1</i> de <i>A. thaliana</i>	69
No se Encontraron Genes Ortólogos a <i>CRC</i> en <i>O. stenopetala</i>	70
<i>OstTSL</i> ♂ y <i>OstTSL</i> ♀ son Genes Ortólogos a <i>TSL</i> de <i>A. thaliana</i>	70
Existe Una Copia de <i>OstTSL</i> en el Genoma de <i>O. stenopetala</i>	73
<i>OstTSL</i> Tiene Mayor Parecido con las Secuencias de Maíz, Trigo y Arroz...	74
Posibles Funciones de <i>OstTSL</i> en el Desarrollo del Gineceo.....	75
<i>OstTSL</i> no se Amplifica en Todos los Individuos de <i>O. stenopetala</i>	79
CONCLUSIONES.....	81
PERSPECTIVAS.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83
APÉNDICE 1.....	87

RESUMEN

Opuntia stenopetala es una especie dioica cuyas flores presentan alguno de los dos órganos sexuales atrofiado en la madurez. El gineceo en las flores femeninas (estériles masculinas), presenta un ovario con numerosos óvulos, estilo y superficie estigmática compuesta por múltiples lóbulos, mientras que el gineceo de las flores masculinas (estériles femeninas), puede carecer de ovario. Además los óvulos, cuyo desarrollo no se completa, se encuentran sólo en la base de los ovarios reducidos. El estilo también tiene un desarrollo incompleto, termina en punta y carece de superficie estigmática, dado que no cumple con su función, se le llama estilodio.

El estilo de las flores femeninas a diferencia del estilodio de las flores masculinas, presenta un canal estilar más amplio, mayor cantidad de tejido de transmisión, menor número de células mucilaginosas y haces vasculares más diferenciados.

Nuestra hipótesis es que en *O. stenopetala* la atrofia de uno de los órganos sexuales en las flores que inician el desarrollo como hermafroditas, obedece posiblemente a una alteración de la expresión de genes involucrados en la determinación sexual, lo cual trae como consecuencia un desarrollo anormal del gineceo en las flores masculinas.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado varios genes cuyas mutaciones provocan defectos morfológicos en el gineceo. Los fenotipos mutantes que presentan mayor similitud con el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala* están asociados a los genes *STYLISH (STY)*, *TOUSLED (TSL)* y *CRABS CLAW (CRC)*. El objetivo en esta investigación fue clonar genes ortólogos a *STY*, *TSL* y *CRC* en *O. stenopetala* y asociar su presencia/ausencia con los fenotipos masculino y femenino en una población natural de *O. stenopetala*. Con una estrategia experimental basada en PCR se logró amplificar un fragmento del gen ortólogo a *TSL (OstTSL)* y otro fragmento de DNA homólogo a *STY (OstSTY)*, tanto de plantas masculinas como de plantas femeninas. *OstSTY* tiene similitud con una familia de genes que se relaciona con las vías de señalización del ácido giberélico; mientras que *OstTSL* tiene homología con el dominio catalítico de una cinasa involucrada en la progresión del ciclo celular y remodelación de la cromatina. Dado que no se encontraron homólogos a *CRC*, es probable que este gen presente mucha variación entre taxa. Aunque no existen diferencias a nivel de aminoácidos en las secuencias proteicas de *OstTSL* y *OstSTY* entre individuos masculinos y femeninos, no se descarta la posibilidad de que existan otras regiones de la proteína en las que se presenten polimorfismos en sus secuencias que pudieran correlacionarse con los fenotipos

femenino o masculino. Asimismo, se evaluó la presencia/ausencia de estos genes tanto en individuos masculinos y femeninos de *O. stenopetala*. Se realizaron reacciones de PCR con el DNA individual de 30 plantas masculinas y 30 plantas femeninas elegidas al azar en una población natural de *O. stenopetala*. *OstSTY* está presente en todos los individuos masculinos y femeninos; mientras que el dominio catalítico de *OstTSL* está presente sólo en 17 individuos masculinos y 22 femeninos.

Finalmente, se discute sobre el posible papel que tienen estos genes, como una combinación de factores, que dan como resultado flores funcionalmente unisexuales en *O. stenopetala*. Además, esto ayudará en el entendimiento de los eventos o mecanismos bioquímicos y celulares que promueven la polinización cruzada en aquellas especies que inician su desarrollo floral siendo bisexuales.

SUMMARY

Opuntia stenopetala is a dioecious plant in whose flowers just one of the two sexual organs is functional at maturity. Gynoecium of female flowers (male sterile) is composed of an ovary filled with ovules, style, and stigmatic tissue arranged in lobules. In male flowers (female sterile) gynoecium lacks an ovary or it may have it in a reduced form with a few incomplete developed ovules located at its base or an empty ovary. The style also shows incomplete development, the lack of stigmatic surface results in having a sharp-pointed end. Due to the lack of function, this style is called stylode.

In contrast to the style in female flowers, stylode male flowers possesses a wider central canal, a greater amount of transmitting tissue, less mucilaginous cells, and more highly differentiated vascular bundles.

Opuntia stenopetala flowers initially develop as hermaphrodites. So, we believe that the atrophy of sexual organs is possibly due to alterations in the expression patterns of genes involved in sex differentiation. As a consequence, this brings about abnormal development of the male flower gynoecium.

In *Arabidopsis thaliana* several genes have been identified to cause morphological defects in the gynoecium. This mutant phenotype resembles those of *O. stenopetala* male flowers gynoecia and is associated with the *STYLISH (STY)*, *TOUSLED (TSL)* and *CRABS CLAW (CRC)* genes.

The aim of this research was to clone *O. stenopetala* orthologous *STY*, *TSL*, and *CRC* genes and to associate their presence/absence with the male or female phenotypes in a natural population of *O. stenopetala*. The experimental strategy was based on the amplification of a fragment from *TSL (OstTSL)* and from *STY (OstSTY)* using female and male plants genomic DNA and/or cDNA as template. *OstSTY* has similarity with a gene family related to the gibberelic acid transduction signal pathway. Meanwhile, *OstTSL* is a kinase homologue involved in the continuity of cell cycle and chromatin regulation. We were not able to find any homologous gene to *CRC* in *O. stenopetala* because it is possible that this gene is highly polymorphic between taxa.

Although we could not find any differences within the protein sequences of *OstSTY* and *OstTSL* between male and female individuals, we cannot exclude the possibility of mutations in other regions of the protein that could be related with male or female morphs. In the same way, the presence or absence of these genes was evaluated in male and female individuals of *O. stenopetala*. We amplified *OstSTY* and *OstTSL* from genomic

DNA of 30 male and 30 female individuals randomly selected from a natural population. *OstSTY* was present in all the male and female individuals, while the catalytic domain of *OstTSL* is only present in 17 males and 22 females. Finally, the role of these genes as a combination of factors that originates functionally unisexual flowers in *O. stenopetala* is discussed. This will help to understand the molecular and cellular basis that promotes cross-pollination in those species where floral development begins as bisexual.

ANTECEDENTES

REPRODUCCIÓN SEXUAL EN ANGIOSPERMAS

Las angiospermas son el grupo más abundante de plantas sobre la tierra en la actualidad. Su estructura reproductiva, la flor, muestra una amplia variedad de formas, tamaños y colores. Las flores tienen una arquitectura básica que consiste en cuatro tipos de órganos: sépalos, pétalos, estambres y carpelos. La amplia diversidad de las formas florales existente en diferentes especies se debe a variaciones simples de la arquitectura básica. La fidelidad con la cual una especie produce flores virtualmente idénticas, y la relativa simplicidad de los patrones de desarrollo, han hecho que el desarrollo floral sea uno de los procesos exhaustivamente estudiados en la biología vegetal (Zik e Irish, 2003).

La mayoría de las angiospermas producen flores hermafroditas (aproximadamente 90%), en las cuales se desarrollan los órganos reproductivos femeninos (carpelos) y masculinos (estambres), siendo ambos funcionales en la madurez de la flor. Aunque el hermafroditismo es más común, alrededor del 10% de especies de angiospermas producen flores unisexuales en las cuales sólo se desarrolla uno de los dos órganos reproductores o bien, en la madurez sólo uno es funcional (Renner y Ricklefs, 1995).

De forma paralela a la aparición del carpelo en las angiospermas, la unión de los esporangios masculinos y femeninos en una misma estructura, dio como resultado la evolución de la flor hermafrodita. El diseño de la flor resultó atractivo para los animales polinizadores para promover el entrecruzamiento, lo cual probablemente contribuyó significativamente a la rápida diversificación de las angiospermas (Kuusk, 2003).

En la mayoría de las especies de angiospermas existen mecanismos reproductivos que promueven la polinización cruzada, evitándose así los efectos deletéreos de la depresión endogámica y promover la heterocigocidad, la variabilidad genética y el intercambio genético. Lo anterior trae como consecuencia efectos ventajosos para la supervivencia a largo término y la adaptación de las especies (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

Uno de los mecanismos que las plantas han desarrollado para promover la polinización

cruzada, incluye la producción de flores unisexuales estaminadas o pistiladas en la misma planta (monoicismo) o en diferentes plantas (dioicismo).

SISTEMAS SEXUALES EN ANGIOSPERMAS

Los sistemas sexuales tienen diversas implicaciones para la reproducción cruzada así como en los mecanismos de polinización y en la conducta del polinizador (Dafni, 1992).

Uno de los cambios evolutivos de gran importancia y de reciente origen en las angiospermas, es la aparición de especies con flores unisexuales distribuidas en diversas familias, siendo muchas de éstas de gran importancia agronómica. Las interrogantes que mayor interés han despertado con respecto al origen de la unisexualidad en las plantas se relacionan con las fuerzas que dirigen la evolución de la unisexualidad y la naturaleza de la ruta evolutiva (Ainsworth, 2000).

Varios sistemas sexuales se originan con la presencia de flores unisexuales y dependiendo de la distribución de las flores unisexuales en los individuos o en la población, se describen distintos sistemas sexuales. Las poblaciones monoicas presentan individuos con flores masculinas (estaminadas) y femeninas (pistiladas) en la misma planta. Por otro lado, si un individuo presenta flores masculinas o femeninas, la población es denominada dioica. Si en la población existen individuos con flores masculinas, individuos con flores femeninas e individuos con flores bisexuales, entonces se dice que forman una población trioica. Diferentes combinaciones de flores unisexuales y flores bisexuales en el mismo o en diferentes individuos dan origen a poblaciones ginodioicas (las poblaciones están formadas por plantas con flores hermafroditas y plantas con flores femeninas), androdioicas (poblaciones formadas por plantas con flores hermafroditas y plantas con flores masculinas), ginomonoicas (las plantas tienen flores hermafroditas y femeninas), andromonoicas (plantas con flores hermafroditas y masculinas), etc. (Ainsworth, 2000).

En un reducido número de especies, la transición hacia la unisexualidad ha sido seguida por la evolución de cromosomas sexuales, que presumiblemente han evolucionado como consecuencia de la necesidad de limitar la recombinación entre los diferentes genes determinantes del sexo (de modo que no se generen individuos hermafroditas por

recombinación de estos genes; Negrutiu *et al.*, 2001). En el estudio de la evolución de la determinación del sexo y de los cromosomas sexuales, las plantas ofrecen una oportunidad única debido a que estos eventos son relativamente recientes en la historia del reino vegetal (Ainsworth, 2000; Negrutiu *et al.*, 2001). Del gran número de especies dioicas que existen, sólo unas pocas presentan cromosomas sexuales, de hecho, no todas las especies dioicas de un mismo género los presentan (Charlesworth, 2002). Además, dichos estudios toman mayor interés porque existen muchas similitudes entre los procesos de determinación del sexo tanto en plantas como en animales (tales como individuos masculinos heterogámicos, dimorfismo sexual extenso y dosificación compensada del cromosoma X), aunque en estos últimos el origen de los cromosomas no es reciente (Negrutiu *et al.*, 2001). A pesar de las numerosas investigaciones en distintas especies de plantas, poco se conoce sobre las bases moleculares de la determinación del sexo y aún es difícil estimar el número de genes involucrados en el proceso, particularmente sobre los genes que regulan la supresión de órganos. Las aproximaciones que se han hecho en los intentos por identificar genes determinantes del sexo en plantas, es mediante el estudio de genes ortólogos que están involucrados en el desarrollo floral en plantas modelo hermafroditas como *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*; o usando estrategias de clonación que involucran el enriquecimiento de las secuencias de los cromosomas sexuales o enriquecimiento de los transcritos ligados al sexo (Ainsworth, 2000).

Dado que en las especies de angiospermas cosexuales existen ambos órganos sexuales, el genoma de estos individuos debe de incluir a todos los genes necesarios para la expresión de estambres y carpelos, por lo que la diferenciación sexual de estos órganos en flores masculinas y femeninas, debe estar regulada por la acción de genes que controlan la expresión diferencial de genes específicos de estambres y carpelos.

Se cree que la unisexualidad se ha originado independientemente a partir del hermafroditismo muchas veces en la evolución de las angiospermas, estas aseveraciones se basan en: (1) la existencia de flores unisexuales en taxa no emparentados, (2) la mayoría de las flores unisexuales poseen órganos reproductivos no funcionales del sexo opuesto y (3) la atrofia se presenta en diferentes etapas del desarrollo dependiendo de la especie (Ainsworth, 2000). Esto explica porque la mayoría de las flores de las especies dioicas y monoicas no pueden distinguirse de las flores bisexuales durante las etapas

tempranas de desarrollo, ya que en las flores unisexuales se inicia el desarrollo tanto de primordios carpelares como estaminales (Hardenack y Grant, 1997). En algunas otras especies dioicas o monoicas, las flores unisexuales no muestran ningún vestigio de los órganos sexuales faltantes indicando que nunca se inició su desarrollo (Ainsworth, 2000).

Los análisis comparativos indican que la separación de sexos puede haber evolucionado más de 100 veces en las angiospermas, con un total de 160 familias con miembros dioicos (Charlesworth, 2002). De esta forma, resulta poco probable que se conserven los mecanismos de determinación del sexo entre dos especies que no se encuentran relacionadas (Hardenack *et al.*, 1994).

Dado que no existe una uniformidad en cuanto a los mecanismos moleculares y morfológicos que gobiernan el desarrollo de flores unisexuales, se sugiere que son varios los genes que están involucrados en el proceso. *Cucumis sativus* por ejemplo, es una especie monoica cuya interrupción en el desarrollo de estambres en las flores femeninas, ocurre previo a la diferenciación del filamento y la antera. Mientras que en flores masculinas la diferenciación del gineceo se detiene hasta antes del desarrollo del estigma y el ovario (Bai *et al.*, 2004). Existe una considerable variación entre taxa cuando se trata de reconocer la etapa en la cual se atrofian los órganos reproductivos en flores que inicialmente son bisexuales. Por ejemplo, en *Silene latifolia*, las flores masculinas detienen el desarrollo del gineceo cuando los primordios de los carpelos se han iniciado (Matsunaga *et al.*, 1996; Farbos *et al.*, 1997). En *Zea mays*, las flores masculinas detienen el desarrollo del gineceo cuando ya comienza cierta diferenciación dentro de los carpelos (Calderón-Urrea y Dellaporta, 1999). En *Vitis vinifera*, el desarrollo de los órganos femeninos se detiene hasta que los óvulos se han desarrollado casi completamente (Caporali *et al.*, 2003).

Los estudios morfológicos del desarrollo floral están cobrando importancia para tratar de entender la evolución de las flores unisexuales en diversos sistemas reproductores, principalmente en los sistemas dioicos (Buzgo *et al.*, 2004).

Lo anterior lleva a considerar la importancia de los análisis y estudios detallados de los eventos morfológicos, estructurales, moleculares y genéticos que se combinan para dar como resultado las flores unisexuales de los sistemas dioicos. Uno de los trabajos pioneros fue la detallada descripción morfológica del desarrollo floral del maíz, lo cual

facilitó el descubrimiento de la muerte celular programada como una causa directa de la atrofia del desarrollo del pistilo en flores masculinas (Calderón-Urrea y Dellaporta, 1999).

DESARROLLO FLORAL

En las plantas, las estructuras florales se derivan de células meristemáticas previamente involucradas en la organización del cuerpo somático de la planta. Con las señales endógenas y ambientales apropiadas, los ápices individuales cesan la producción de los primordios de hojas y reprograman los patrones de expresión genética y comienzan la producción de estructuras florales: sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Bracale *et al.*, 1991). El desarrollo de la flor es un proceso de múltiples pasos, entre ellos se incluyen: una fase de transición del crecimiento vegetativo al reproductivo, la formación de un meristemo floral, el establecimiento de identidades de los órganos y por último la diferenciación de las estructuras florales (Okada y Shimura, 1994; Zik e Irish, 2003). Diferentes tipos de mecanismos de señalización, entre o dentro de las células, deben tener papeles importantes en cada paso del desarrollo floral, debido a que en cada fase se requiere de divisiones celulares, elongación celular y diferenciación celular en formas y tiempo precisos. Con el propósito de descifrar los mecanismos de señalización y sus sistemas genéticos reguladores, se han realizado análisis genéticos, bioquímicos, anatómicos y fisiológicos de los procesos del desarrollo floral, utilizando modelos como *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida*, *Zea mays*, *Silene latifolia* y otras especies (Okada y Shimura, 1994).

El o los carpelos en conjunto, constituyen el órgano reproductivo femenino: el gineceo, en él son fácilmente reconocibles tres estructuras: el estilo, el estigma y el ovario. El estigma es responsable de la adhesión, hidratación y germinación de los granos de polen. El estilo es responsable del crecimiento del tubo polínico. El desarrollo del gineceo empieza con la formación de los primordios carpelares en el ápice del meristemo floral. En la primeras etapas, usualmente se lleva a cabo la fusión de los carpelos para dar lugar a la formación del ovario, en cuyo interior surgen y se van desarrollando los óvulos. Cuando los carpelos se fusionan basalmente, la parte distal a punto de fusionarse, comienza a extenderse verticalmente para formar uno o más estilos, mediante la división y elongación celular. Una vez que el estilo está diferenciado, generalmente se

distingue una zona central de células elongadas que constituyen el tejido de transmisión rodeado de tejido parenquimático y epidermis. El estigma se desarrolla en la región apical y más distal del carpelo por proliferación y extensión de las células epidérmicas en papilas de longitud variable, y por diferenciación de las células subepidérmicas en células secretoras. Las células secretoras del estigma producen un exudado que cubre la superficie de los estigmas húmedos y por tanto es considerado importante en la adhesión del polen al gineceo (Mauseth, 1988).

Durante la evolución de las angiospermas, el desarrollo del carpelo probablemente ha tenido un papel decisivo en su éxito reproductivo. Los carpelos proveen protección a los óvulos contra los herbívoros y además, le permiten discriminar a los gametos masculinos. En la mayoría de las especies, el carpelo se desarrolla en el fruto, el cual protege a las semillas en desarrollo y funciona como medio de dispersión para éstas.

GENES DE IDENTIDAD FLORAL

De gran importancia resulta el establecimiento de la identidad de los órganos reproductivos así como el conocimiento de los genes necesarios para la regionalización normal de los diferentes tejidos. Una mutación en alguno o algunos de los genes involucrados, podría ocasionar esterilidad parcial o total y de este modo establecerse la unisexualidad funcional representada en diversos sistemas reproductores no hermafroditas.

Desde la década pasada se ha puesto mucho énfasis en entender los mecanismos de formación de patrones en las plantas a nivel genético, molecular y celular. La identificación de genes con funciones importantes en la formación de patrones ha originado mucho interés en unir los estudios evolutivos con los del desarrollo. Los genes MADS-box son buenos candidatos para estudiar el desarrollo y la evolución de la unisexualidad, ya que algunos de ellos tienen importantes funciones en la evolución de la arquitectura vegetal, mientras que otros darán pistas sobre los cambios moleculares que subyacen a las transformaciones evolutivas (Ng y Yanofski, 2001).

Los genes MADS-box toman su nombre de los genes *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1* (*MCM1*) de levadura, *AGAMOUS* (*AG*) de *A. thaliana*, *DEFICIENS* (*DEF*) de *Antirrhinum* y *SERUM RESPONSE FACTOR* (*SRF*) de humanos. Estos genes codifican factores de transcripción que comparten un dominio de unión al DNA. En *A. thaliana* existen más de 40 genes MADS-box identificados, cumpliendo una amplia gama de funciones. Por ejemplo, participan en el control del tiempo de floración y el desarrollo vegetativo, y en la formación de flores, incluidas las estructuras reproductoras. Estos resultados han llevado a muchos biólogos evolucionistas a estudiar la función de los genes MADS-box en la evolución de la arquitectura floral y el control del tiempo de floración tanto en las angiospermas como en las gimnospermas (Jack, 2001; Ng y Yanofski, 2001).

Mientras que la evolución morfológica se piensa que es controlada por muchos genes, el cambio de unos cuantos factores que controlan las diferencias fenotípicas entre diferentes taxa pueden causar grandes efectos. Se ha propuesto que existen dos principales mecanismos moleculares que alteran las estructuras durante la evolución: la primera y más común es mediante cambios en los patrones de expresión de genes reguladores clave a través de alteraciones en las regiones de control que actúan en *cis*; el segundo mecanismo involucra la duplicación de genes que codifican factores de transcripción, seguido de procesos de diversificación de sus regiones codificantes y regulatorias (revisado en Ng y Yanofsky, 2001).

En plantas, las funciones de los genes MADS-box se han estudiado mayoritariamente durante el desarrollo reproductivo, lo cual no es sorprendente dado el gran interés que generan las estructuras reproductivas. Teniendo en cuenta que las plantas son organismos sésiles, han desarrollado mecanismos para determinar cuando el ambiente es más favorable para producir las estructuras reproductoras y así maximizar las oportunidades de propagación y perpetuación. Los experimentos genéticos realizados en *A. thaliana* muestran que varios genes MADS-box se requieren para regular la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo. Este cambio involucra la producción de flores en lugar de hojas y tallos asociados, para lo cual se requiere la acción de genes de identidad de meristemo floral, cuya expresión se regula antes de la terminación del desarrollo del primordio floral (Jack, 2001; Ng y Yanofsky, 2001).

Una vez que el primordio floral ha iniciado su desarrollo, las identidades de los verticilos dentro de la flor en desarrollo son establecidas por los genes homeóticos florales (GHF). Los GHF actúan en forma combinada de acuerdo al modelo ABC (Coe y Meyerowitz, 1991). Los GHF son activos en dos verticilos adyacentes en la flor, de este modo los genes tipo A especifican los sépalos, los tipos A y B especifican los pétalos, los tipos B y C especifican los estambres y los tipo C solos especifican los carpelos. Ejemplos de los genes del tipo A homeóticos en *A. thaliana* incluyen *APETALA 1 (AP1)* y *2 (AP2)*, entre los genes B encontramos a *APETALLA 3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)* y el gen C *AGAMOUS (AG)*. Todos estos genes, excepto *AP2* son genes MADS-box. Además, RNAs mensajeros de los GHF se han encontrado en los mismos tejidos que son afectados cuando éstos se encuentran mutados. Esto indica que la regulación de los GHF puede ocurrir ampliamente a nivel transcripcional (Ng y Yanofsky, 2001).

Los patrones de expresión y las funciones de los genes homeóticos en plantas distintas a las eudicotiledóneas (el clado más grande dentro de las Angiospermas) ha ayudado a evaluar la existencia de conservación del modelo ABC. Este estudio se realizó con maíz, una monocotiledónea cuyas flores poseen estructuras altamente modificadas que tienen muy poca semejanza a las estructuras de las flores de eudicotiledóneas. En maíz, se han identificado genes clase B y clase C. En la primera clase está el gen *silky 1 (S1)*, un ortólogo de *AP3*, y en la segunda clase está *Zea AG1 (ZAG1 -ortólogo de AG-)*. Cuando existe un doble mutante *si1-zag1*, en la posición de los tres verticilos internos se desarrollan estructuras no reproductoras (ver Ng y Yanofsky, 2001). Dado que las monocotiledóneas y eudicotiledóneas son ramas separadas del árbol filogenético de las angiospermas, la evidencia genética y molecular apoya la conservación del modelo ABC indicando que éste puede reflejar una red de regulación originada antes de la divergencia de estos dos grupos (hace aproximadamente 200 millones de años). En cuanto a la conservación de los genes MADS-box, un estudio sobre los genes tipos B y C, indica que éstos estaban presentes en el último ancestro común de angiospermas y gimnospermas, y que el patrón de la expresión génica homeótica en las estructuras reproductivas ocurrió antes de la divergencia de estos dos grupos de plantas, hace aproximadamente 300 millones de años (Winter *et al.*, 1999).

GENES LIGADOS A LA DETERMINACIÓN DEL SEXO

Por determinación del sexo en plantas se entiende el proceso en el cual se aborta selectivamente el androceo o el gineceo de primordios florales inicialmente hermafroditas; es decir, el desarrollo de estambres o pistilos es selectivo, dando como resultado flores unisexuales. Sin embargo, debe incluirse en esta definición la diferenciación del gametofito dentro del pistilo o estambre (Irish y Nelson, 1989). Los mecanismos por los cuales se determina el sexo en plantas no son conocidos, pero es claro que el dimorfismo sexual es una decisión tardía en el ciclo de vida de la planta, restringido a la organogénesis floral o diferenciación de los órganos reproductivos (Negrutiu *et al.*, 2001). Por tanto, las preguntas fundamentales en la determinación del sexo serían (1) ¿cómo y por qué se detiene el desarrollo de los órganos reproductivos en etapas particulares del desarrollo? y (2) ¿Puede la producción de flores unisexuales ser controlada por activación o inactivación selectiva de las funciones de los genes homeóticos?

Los datos generados a partir del análisis de mutantes de flores bisexuales de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* no apoyan la participación de los GHF en la formación de flores unisexuales. Los fenotipos resultantes de la mutación en uno de los alelos de los genes homeóticos resulta en transformaciones homeóticas de los órganos florales de dos verticilos adyacentes en distintas estructuras; estos patrones son atípicos en las flores unisexuales encontradas en las plantas de poblaciones naturales, en las cuales solo uno de los verticilos es usualmente afectado: androceo o gineceo (Hardenack y Grant, 1997). La unisexualidad floral por medio de transformaciones homeóticas no ha sido demostrada como un mecanismo de determinación sexual en poblaciones naturales. La unisexualidad en las plantas es usualmente causada por reducción o aborción de los primordios de los órganos sexuales, es decir, aparentemente los genes determinantes del sexo actúan posteriormente o de forma independiente a los genes homeóticos. Consistente con esta explicación existen varias descripciones del desarrollo de flores unisexuales que pasan una etapa bisexual en la cual todos los órganos florales inician su desarrollo. Algunos de los genes involucrados han sido identificados en maíz mediante el análisis de mutantes con irregularidades en el programa normal de unisexualidad (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

Es posible que los genes que determinan el sexo afecten selectivamente la acción de los genes homeóticos únicamente en uno de los verticilos sexuales. De esta forma, por

ejemplo, se altera el desarrollo de los estambres sin tener efectos secundarios en la formación de carpelos (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993). En las especies unisexuales examinadas, la diferenciación sexual involucra represión del primordio en desarrollo y no un cambio en la identidad de los órganos (Hardenack y Grant, 1997).

En *Silene latifolia*, una especie dioica, se ha demostrado que los genes MADS-box no se encuentran directamente relacionados con la determinación del sexo, aunque los patrones de expresión si se ven alterados, esto es resultado de los factores que afectan el desarrollo de los órganos reproductivos (Hardenack *et al.*, 1994). De manera similar, en *Asparagus officinalis*, una especie dioica, un gen MADS-box llamado *AOM1* tiene niveles similares de expresión en las flores femeninas y masculinas, por lo que no se le relaciona con la diferenciación sexual en esta especie (Caporali *et al.*, 2000).

Aunque se ha demostrado que la expresión y función de *AG* es suficiente para especificar a los carpelos en plantas silvestres de *A. thaliana*, algunas propiedades carpelares (como el tejido estigmático, la fusión de los carpelos por sus márgenes y la producción de óvulos), pueden originarse en ausencia de la actividad de *AG* (Bowman *et al.*, 1991), lo anterior sugiere que deben existir otros genes que especifiquen algunos aspectos del desarrollo de los carpelos en ausencia de la función de *AG*.

Varios genes reguladores con funciones en el gineceo han sido identificados, aunque aún queda mucho por investigar acerca de las posibles interacciones entre estos genes e identificar sus reguladores y posibles blancos.

Los genes que proporcionan la identidad de los órganos florales activan nuevos conjuntos de genes que promueven el crecimiento y diferenciación de los primordios de los órganos florales. Este paso probablemente es mediado por cascadas de regulación transcripcional. Esta suposición se basa en el hecho de que los genes de identidad de los órganos codifican proteínas con características de factores transcripcionales (Okada y Shimura, 1994).

Algunos genes que parecen determinar el sexo han sido identificados en *Zea mays*, en los cuales de existir mutaciones, alteran el proceso de desarrollo de las flores que normalmente al madurar son unisexuales. Entre ellos se incluyen a los genes *DWARF (D)*, *SILKLESS (SK1)* y *TASSELSEED1 y 2 (Ts1 y Ts2)* (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1994).

Mutaciones en el gen *D* provocan el aborto de los estambres de las flores femeninas. Las fallas en este proceso, ocasionan la producción de estambres sin afectar el desarrollo del gineceo. Al parecer, las mutaciones bloquean pasos específicos en la vía biosintética de las giberelinas, las cuales han sido implicadas en la feminización de las flores del maíz y específicamente en la aborción de estambres (Dellaporta y Calderón Urrea, 1994).

Las mutaciones del gen *SK1* en el maíz, evitan la formación del gineceo en las flores femeninas, lo cual resulta en flores estériles, sugiriendo así que el producto génico de *SK1* es requerido sólo para el desarrollo del pistilo (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1994).

El gen *Ts1* codifica una proteína parecida a la alcohol deshidrogenasa cuya función es necesaria para el aborto del gineceo en las flores masculinas del maíz, ya que mutaciones en este gen resultan en el desarrollo de gineceos maduros y funcionales en flores normalmente masculinas (De Long *et al.*, 1993). Un posible papel de *Ts2* es que altere los niveles hormonales en las flores en desarrollo afectando así la producción del carpelo y la expresión sexual (Kinney *et al.*, 2003). Aunque se han clonado genes ortólogos a *Ts2* en *Silene latifolia* y en *Arabidopsis thaliana* no se ha detectado ninguna expresión en tejidos femeninos, por lo que es poco probable que conserven la misma función en estas especies (Hardenack y Grant, 1997).

Otro conjunto de genes determinantes del sexo, fue aislado de *S. latifolia*. Los genes *Men* (Male Enhanced), del 1 al 10. Todos excepto el *Men-9* se expresan en los estambres durante las primeras etapas del desarrollo de la flor masculina y no se expresan en la flor femenina (Antonovics y Alexander, 1992). En términos de función, los genes *Men* parecen estar involucrados en la síntesis de proteínas masculino-específicas de la pared celular (Scutt *et al.*, 1999).

En *A. thaliana* se ha demostrado que la identidad carpelar puede ser especificada por dos vías separadas (Bowman *et al.*, 1999; Bowman y Smyth, 1999), la primera mediada por el gen homeótico clase C *AG*, y la otra mediada por genes como *SPATULA* (*SPT*), *CRABS CLAW* (*CRC*), *STYLISH1* (*STY1*), *STYLISH2* (*STY2*) y *TOUSLED* (*TSL*), que participan de distintas formas en la diferenciación del carpelo, especialmente de las partes especializadas en promover la fecundación, como el estigma y el estilo, incluido el tejido de transmisión. ■

Opuntia stenopetala

Opuntia stenopetala es una especie dioica cuyas flores son estructuralmente hermafroditas pero funcionalmente unisexuales. En un individuo pueden encontrarse únicamente flores con uno de los órganos reproductivos funcional, ya sea el gineceo (flores pistiladas – individuo femenino) o el androceo (flor estaminada – individuo masculino). El desarrollo de androceo y gineceo inicia de manera muy similar en ambos tipos florales dando la apariencia de hermafroditismo. Sin embargo, existen diferencias subsecuentes en el desarrollo (Orozco, 2002).

En las flores pistiladas, el desarrollo de la antera se detiene en etapa de célula madre de la microspora. El gineceo de estas flores esta compuesto por ovario (con múltiples óvulos), estilo y estigma (organizado en lóbulos rodeados de papilas estigmáticas). En el caso de las flores estaminadas, las anteras desarrollan granos de polen normales pero el gineceo no completa su desarrollo. En el caso del ovario se presentan tres fenotipos: (1) el más común es que la cavidad del ovario se encuentra reducida en comparación con la de las flores pistiladas y presentar óvulos únicamente en la base cuyo desarrollo no se completó, (2) la cavidad del ovario puede no presentar óvulos, y (3) la forma menos común es que no existe la cavidad del ovario y en su lugar se encuentre tejido

parenquimático. En los tres tipos de flores estaminadas se encuentra la estructura del estilo en cuyo ápice no se desarrollan lóbulos y en su superficie no se encuentra ningún remanente de tejido estigmático (Fig. A). La ausencia de tejido estigmático ocasiona que el estilo termine en punta y la falta de funcionalidad que se clasifique como estilodio (Orozco, 2002). Estos datos sugieren que al menos son dos los genes afectados en la vía del desarrollo del ovario, uno relacionado con la formación de la cavidad ovárica y el otro con el desarrollo de los óvulos.



Figura A. Parte apical del estilodio de las flores masculinas de *O. stenopetala*, es evidente la ausencia de superficie estigmática (Orozco, 2002).

Tomando como referencia los fenotipos mutantes del gineceo de las flores masculinas, hemos seleccionado a los genes *STY*, *TSL* y *CRC* para estudiarlos en *Opuntia stenopetala* y evaluar su posible participación en el desarrollo del gineceo de ésta cactácea.

La finalidad del estudio es relacionar la función de *STY*, *TSL* y *CRC* en el desarrollo del gineceo con la disminución o pérdida de estos tejidos en las plantas masculinas de *O. stenopetala*, dando como resultado flores funcionalmente unisexuales.

A continuación se abordará a cada uno de estos genes por separado destacando aquellos antecedentes que los hacen de nuestro interés debido a la relevancia que poseen en la formación del gineceo y la posible participación que tienen en el desarrollo de esta estructura en *O. stenopetala*.

STYLISH

STYLISH1 y *STYLISH2* (*STY1* y *STY2*, respectivamente) son genes que fueron identificados por Fridborg *et al.* (1999), como nuevos genes miembros de la familia génica con características similares al gen *SHORT INTERNODES* (*SHI*) en *A. thaliana*. Los miembros de esta familia han sido involucrados en la vía de señalización del ácido giberélico (GA) o en la vía de síntesis del GA (Fridborg *et al.*, 1999; 2001; Kuusk *et al.*, 2002; Kuusk, 2003). Otros genes relacionados con *SHI* fueron encontrados una vez que el genoma de *A. thaliana* fue completamente secuenciado. La familia de genes relacionados con *SHI* comprende 10 miembros: *SHI*, *STY1*, *STY2*, *LRP1* y *SRS3-8* (Fridborg *et al.*, 2001; Kuusk, 2003).

En todos los miembros está presente al menos una señal de localización nuclear, un dominio dedos de zinc y una región ácida rica en glutaminas (formando un dominio -IGGH- sin similitud reportada con algún dominio proteico anteriormente reportado). Los tres dominios son características de proteínas que funcionan como reguladores transcripcionales (Kuusk, 2003).

La comparación de las secuencias de cDNAs indica que *STY1* está formado por dos exones y codifica para una proteína de 370 aminoácidos, mientras que *STY2*, también con dos

exones, codifica una proteína de 322 aminoácidos, entre ambas proteínas comparten 43% de identidad. En la búsqueda de alelos mutantes para estos genes, se encontraron dos inserciones de transposones en la posición 484 de la secuencia codificante de *STY1* y en la 483 de *STY2* (Kuusk *et al.*, 2002).

Plantas mutantes homocigas de *A. thaliana* con inserciones de T-DNA en el gen *STY1* (mutante *sty1-1*), muestran diferencias morfológicas respecto al tipo silvestre, las aberraciones están restringidas a las flores, específicamente a las partes apicales del gineceo; mientras que las plantas homocigas defectuosas para *STY2* (mutante *sty2-1*), no muestran diferencias morfológicas respecto al tipo silvestre. En la mayoría de los estilos maduros de *sty1-1* algunas células estilares se expanden anormalmente, su patrón de crecimiento resulta en la presencia de células epidérmicas estilares en los márgenes apicales del gineceo, donde el tipo silvestre forma papilas estigmáticas. Una minoría de gineceos mutantes *sty1-1*, son muy parecidos al tipo silvestre, y en ocasiones se encuentran defectos morfológicos más severos en las partes basales o apicales de las inflorescencias. Como consecuencia de estos cambios, la mayoría de los mutantes *sty1-1* exhiben una reducción en la fertilidad dado que los óvulos superiores de cada silicua generalmente abortan. Cuando estudiaron al doble mutante *sty1-1 sty2-1*, observaron que el fenotipo *sty1-1* aumentó de intensidad. El estilo ahora muestra defectos más evidentes que en el mutante sencillo *sty1-1*. El gineceo en el doble mutante muestra durante el desarrollo, una cavidad central alargada que está rodeada de células estilares creciendo en lóbulos que posteriormente pueden formar pequeñas protusiones, esto en ocasiones causa la formación de células estilares epidérmicas no solo en el ápice, sino también adaxialmente, es decir, adentro del gineceo. En cada orilla de los lóbulos y a partir de las células estilares en posición adaxial, se forman papilas estigmáticas que en ocasiones forman grupos con forma de bulto. La cantidad de tejido estilar y estigmático en cada gineceo del doble mutante, es marcadamente menor que en el mutante sencillo *sty1-1*, a pesar de estos cambios en el gineceo, no se encuentran reducciones significativas en la fertilidad comparada con la fertilidad del mutante *sty1-1* (Kuusk *et al.*, 2002).

El mutante *sty1-1* muestra una morfología de estilo aberrante muy probablemente como resultado de una pérdida parcial del control de las divisiones celulares y/o de una expansión irregular y desorganizada de las células estilares. Por tanto *STY1* puede actuar coordinando las tasas y planos de las divisiones celulares y regulando la expansión celular en el estilo de las plantas silvestres (Kuusk *et al.*, 2002).



Figura B. Parte apical del gineceo del doble mutante de *A. thaliana sty1-1 sty2-1*. Aunque hay parches de tejido estigmático (flecha), éste se encuentra considerablemente reducido respecto al fenotipo silvestre (Tomado de Kuusk *et al.*, 2002).

Dado que en el doble mutante *sty1-1 sty2-1* (Fig. B), la reducción del tejido estilar y estigmático aunada al crecimiento sin coordinación de las células estilares da origen a un estilo con arquitectura muy distorsionada, tanto *STY1* y *STY2* parecen regular la formación del estilo y del estigma y contribuir al establecimiento de la forma del estilo. Tomando como base que la expresión ectópica de cualquiera de los dos da origen a los mismos efectos fenotípicos, es probable que ambos codifiquen proteínas con las mismas, o bien muy similares, propiedades bioquímicas. Los patrones de expresión sugieren que estas proteínas promueven el desarrollo estilar y estigmático actuando en vías regulatorias específicas que en ocasiones se sobrelapan (Kuusk *et al.*, 2002).

CRABS CLAW

El gen *CRABS CLAW* (*CRC*) fue identificado por Alvarez y Smyth (1999) en una búsqueda de genes mutados que específicamente alteraran la morfogénesis del carpelo de *A. thaliana*. Las plantas mutantes *crc-1* muestran un gineceo más corto pero al mismo tiempo más ancho en las partes lateral y medial, que el gineceo de las plantas silvestres (Fig. C). Los dos carpelos no se encuentran fusionados en el tercio superior. Aunque

todos los tipos celulares están presentes en los lugares correctos, el estilo se encuentra notablemente abreviado y presenta dos parches de papilas estigmáticas entremezcladas. El número total de óvulos por gineceo es menor en relación con las plantas silvestres. El mutante *crc-2* presenta estas mismas características, pero de forma menos severa (Bowman y Smyth, 1999). El principal papel de *CRC* parece radicar en el control de aspectos del crecimiento del carpelo, la diferenciación de tejidos no está afectada dado que todos los tipos de tejidos carpelares se originan en los mutantes *crc* (Álvarez y Smyth, 1999).



El único defecto fuera del gineceo, se presenta en la ausencia de nectarios, los cuales normalmente se forman en la base de los estambres (Álvarez y Smyth, 1999; 2002). A pesar de estos defectos, los mutantes *crc* producen semillas viables, aunque en número reducido aparentemente debido a una falla en el inicio del desarrollo de muchos de los primordios de óvulos producidos (Ferrándiz *et al.*, 1999).

Figura C. Gineceo del mutante *crc1-1* de *A. thaliana* con las regiones estilar y estigmática notablemente reducida respecto al genotipo silvestre (tomado de Kuusk *et al.*, 2002).

El gen *CRC* codifica una proteína de 181 aminoácidos la cual contiene un dominio tipo dedos de zinc C_2-C_2 cerca del dominio amino terminal. En la parte central, se localiza un dominio rico en serinas y prolinas (17-20 aminoácidos) característico de los dominios de activación de los factores de transcripción, hacia el extremo carboxilo se encuentra un potencial dominio asa-hélice-asa, muy cerca se ubica una zona rica en aminoácidos básicos que potencialmente sirven como señal de localización nuclear. El análisis de la secuencia sugiere fuertemente que *CRC* es parte del aparato transcripcional (Bowman y Smyth, 1999; Siegfried *et al.*, 1999).

Dado que la combinación de los dominios dedos de zinc y asa-hélice-asa en una misma proteína se encontró en varios genes de *A. thaliana* y de arroz, Bowman y Smyth (1999) decidieron agruparlos para formar una familia de proteínas llamada YABBY, y debido al grado de conservación existente entre todos los miembros del dominio asa-hélice-asa, lo llamaron dominio YABBY.

El dominio YABBY tiene similitud de secuencia con las dos primeras hélices de la caja HMG (High Mobility Group) hacia el extremo carboxilo de la proteína (Bowman y Smyth, 1999). La caja HMG es un dominio conservado de unión a DNA de aproximadamente 80 aminoácidos formando tres hélices alfa, la caja está presente en una gran familia de proteínas eucarióticas.

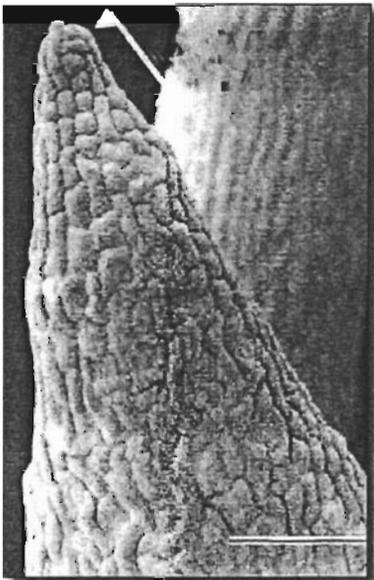
Miembros de la familia de genes YABBY como *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YABBY2 (YAB2)* y *YABBY3 (YAB3)*, se expresan de forma polar en todos los primordios de los órganos laterales del meristemo floral, al parecer los miembros de esta familia son responsables de la especificación del destino de las células abaxiales de éstos órganos de *A. thaliana* (Siegfried *et al.*, 1999).

En arroz el gen *DROOPING LEAF (DL)*, un gen muy similar a *CRC*, fue descrito por Nagasawa *et al.* (2003), mutaciones severas a este gen provocan conversiones homeóticas totales o parciales del carpelo por estambres en la flor, el resto de los órganos no se ve afectado.

Dado que las mutaciones en *CRC* no provocan transformaciones homeóticas, al parecer *DL* ha adquirido diferentes funciones durante la especificación y desarrollo del carpelo en el arroz. Entre ellas se incluyen especificación de la identidad carpelar, control en la determinación del meristemo floral y regulación antagonista con los genes clase B, es decir, al parecer *DL* tiene un papel predominante en la especificación del carpelo en arroz porque pocos genes pueden estar regulando el desarrollo del carpelo, mientras que en *A. thaliana* las mutaciones en *CRC* no son tan serias porque son muchos los genes que están coordinando específicamente la compleja diferenciación del carpelo (Yamaguchi *et al.*, 2004).

TOUSLED

El gen *TOUSLED* (*TSL*) fue identificado en *A. thaliana* a partir de una línea mutagenizada por inserciones de T-DNA. Las plantas con el gen *tsl* mutado (*tsl-1*) presentan ligeros defectos en la mayoría de los órganos; sin embargo, el aspecto más dramático del fenotipo se observa durante el desarrollo de la flor, los primordios de los órganos no inician su desarrollo con un patrón simétrico como lo hacen en el tipo silvestre. Los órganos florales formados se encuentran dentro de los dominios apropiados de la flor (al menos en relación al orden secuencial de aparición y el patrón apical/basal de los distintos órganos), es decir, estos se forman en orden correcto. No obstante, en ocasiones, hay un decremento en el número de primordios de sépalos, pétalos y estambres que inician su desarrollo en el meristemo floral (Roe *et al.*, 1993). El gineceo maduro de las plantas *tsl* es estéril. Los tejidos estilares y estigmáticos se encuentran reducidos en cantidad, carecen de septo y un estilo fusionado. La separación parcial del gineceo parece ser resultado de un crecimiento irregular y falta de coordinación en los márgenes del primordio carpelar en desarrollo (Roe *et al.*, 1997b). Las papilas estigmáticas están presentes en parches reducidos en los márgenes apicales de los carpelos, también algunas células estilares epidérmicas se encuentran en posiciones anormales como los márgenes del ovario o la superficie interna del gineceo (Ferrández *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que las funciones de *TSL* en el gineceo de plantas



silvestres son promover divisiones celulares durante la formación del estilo y la expansión de los márgenes carpelares (Roe *et al.*, 1997b). Dos mutantes más fueron obtenidos (*tsl-2* y *tsl-3*); sin embargo, presentan el mismo fenotipo de *tsl-1*, aún cuando las mutaciones en este gen mapean en distintos sitios. Esto refleja el hecho de que quizá ninguno de los mutantes cumple las funciones de *TSL* (Roe *et al.*, 1993).

Figura D. Gineceo del doble mutante *tsl-1 ag-5* de *A. thaliana*, el cual muestra gran similitud con el fenotipo del gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*. En ambos casos, la región estigmática está ausente y la región estilar reducida. El mutante sencillo *tsl-1* muestra reducción de la región estilar (tomado de Roe *et al.*, 1993).

TOUSLED codifica una cinasa de serina/treonina nuclear de 688 aminoácidos cuyo dominio catalítico se encuentra en el extremo carboxilo terminal (Roe *et al.*, 1993, 1997b). El dominio amino terminal forma una estructura secundaria mayoritariamente compuesta de α -hélices (Roe *et al.*, 1993), en él se encuentran presentes múltiples secuencias consenso correspondientes a señales de localización nuclear (SLN) que pueden estar regulando la localización subcelular de la proteína permitiendo el acceso a potenciales factores reguladores y sustratos blanco; y una región 'rosca superenrollada' (coiled-coil) que incluye un motivo cierre de leucina, cuya participación puede estar relacionada con interacciones proteína-proteína que afecten la actividad de cinasa (Roe *et al.*, 1997b). El dominio catalítico de TSL de *A. thaliana* únicamente tiene entre un 24 y un 33% de identidad con el dominio catalítico de otras cinasas de proteínas, por lo tanto, no fue clasificada dentro de alguna de las subfamilias por homología, sino que dio origen a una nueva familia de las cinasas de proteínas (Roe *et al.*, 1993).

La proteína TSL es una cinasa que se autofosforila en los residuos de serina y treonina, además, puede fosforilar *in vitro* sustratos exógenos tales como la proteína básica de mielina (MBP) y la caseína (Roe *et al.*, 1997a).

Basados en su estructura primaria, TSL no pertenece a ninguna subfamilia conocida de cinasas, por lo que no es posible deducir su función a partir de su clasificación. Varios homólogos de TSL están presentes en animales como *Caenorhabditis elegans* (Han *et al.*, 2003) y en el humano (Yamakawa *et al.*, 1997; Groth *et al.*, 2003), las cuales se denominan *Tousled Like Kinase* (TLK- Cinasa tipo Tousled). Las TLK's de humanos (TLK1 y TLK2) no solo comparten un alto grado de similitud de secuencias con TSL de *A. thaliana* en el dominio catalítico de la proteína, sino que además comparten propiedades funcionales, tales como las señal de localización nuclear, expresión ubicua, la preferencia por el MBP como sustrato exógeno y la aparente capacidad de dimerización y autofosforilación (Roe *et al.*, 1997a; Silljé *et al.*, 1999). Por lo tanto, podría suponerse que las TLK's y TSL cumplen funciones similares tanto en animales como en plantas.

HIPÓTESIS

- Algunos genes que controlan el desarrollo del estilo y del estigma están muy conservados en las angiospermas; por lo que una mutación en uno o varios de éstos podrían ocasionar el fenotipo observado en el gineceo de las plantas masculinas de *Opuntia stenopetala*.

OBJETIVOS

General

- Clonar los genes ortólogos a *TSL*, *STY* y *CRC* en *Opuntia stenopetala* y evaluar su presencia en plantas femeninas y masculinas de una población silvestre.

Particulares

- Describir a nivel tisular el fenotipo del estilo y del estigma de flores masculinas y flores femeninas en antesis de *O. stenopetala*.
- Clonar de *O. stenopetala* genes involucrados en la formación y desarrollo del estilo/estigma ortólogos a *STY*, *TSL* y *CRC* de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar como se relaciona la presencia de *STY*, *TSL* y *CRC* con los fenotipos masculinos ó femeninos en una población natural de *Opuntia stenopetala*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

◆ *Opuntia stenopetala*

Cladodios con flores y botones florales de *O. stenopetala* fueron colectados de dos localidades ubicadas en el Municipio de Cadereyta, estado de Querétaro. Estos sitios se encuentran sobre la carretera que va de Cadereyta a Vizarrón, cerca de la desviación a Bellavista. La primera se localiza en el kilómetro 12 (26°00.000'N, 104° 03.750'W) y la segunda en el kilómetro 17 (20°41.212N, 99°35.933W). En estas localidades se determinó el sexo de las plantas de *O. stenopetala* mediante la observación de al menos tres flores en anthesis en cada planta. Con los individuos sexados, se cortaron cladodios con botones florales en distintas fases de desarrollo y fueron trasladados al laboratorio, en el cual se disectaron las flores separando los estilos y anteras. Una parte del material disectado fue congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -70°C hasta su utilización, y otra fue fijada en FAA (formol: ácido acético: etanol 96%: agua destilada; 2:1:10:7) para realizar cortes histológicos. Para las extracciones de DNA se colectaron muestras de tallo de 30 individuos femeninos y 30 individuos masculinos, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Para clonar un gen ortólogo a *TSL*, *STY* y *CRC* de *A. thaliana*, se purificó RNA total de estilos/estigmas de diversas etapas de desarrollo de flores masculinas y de flores femeninas de *O. stenopetala*. El método de extracción utilizado había sido probado con éxito y optimizado con estilos de otras dos especies de *Opuntia*. Cuando el protocolo fue utilizado con los estilos de *O. stenopetala*, la cantidad que se logró extraer fue mínima en el caso de los estilos de las flores masculinas y no se tuvo éxito con los estilos de las flores femeninas, la posible razón de esto es que la gran cantidad de mucílago y pectinas presentes en los estilos copurifican con los ácidos nucleicos; al eliminar estos metabolitos, se eliminó también al RNA. Debido a esta situación se probaron métodos alternos de extracción; el primero, optimizado por Valderrama *et al.* (2002) para purificar RNA de la cáscara del fruto del nopal presentó problemas de inicio debido a que fue diseñado para trabajar con 5 gramos de tejido para cada extracción, dicha

cantidad de tejido es muy difícil de alcanzar con los estilos de *O. stenopetala* (teniendo en cuenta que esta estructura es pequeña -aún en las flores de mayor tamaño-comparada con el fruto, que aunado a la presencia de espinas y glóquidas en las flores dificulta la disección y obtención de estilos y que la época de floración de la planta es de únicamente un par de meses al año, todo esto limita la cantidad de material disponible para trabajar). De cualquier forma, el método fue utilizado adaptando las cantidades para trabajar con un gramo de estilos y realizar la purificación de RNA. Con este método no se obtuvieron resultados satisfactorios, en este caso, ni para los estilos masculinos ni para los estilos femeninos.

El otro método que se probó, había sido utilizado por Vicent y Delseny (1999) con éxito para extraer RNA de semillas de *A. thaliana*. Estos investigadores encontraron problemas con los métodos tradicionales de extracción de RNA debido a varias razones: primero, la limitada cantidad de material vegetal con la que se cuenta así como lípidos, proteínas de almacén y metabolitos secundarios (compuestos fenólicos y mucílagos), que están presentes en grandes cantidades en estas semillas. Para *O. stenopetala* este método logró incrementar ligeramente la cantidad de RNA extraído de los estilos de flores masculinas, pero los resultados con los estilos de las flores femeninas no mejoraron.

Debido a esta situación, se decidió extraer RNA de estambres. Para esto se utilizó el método de Vicent y Delseny (1999) con algunas modificaciones. Se tomó un gramo de tejido (estambres) tanto de flores femeninas como de flores masculinas para pulverizarlos con nitrógeno líquido. Al polvo se le agregaron 10 ml de buffer de extracción (LiCl 8M y β -Mercaptoetanol al 2%) y se mezclaron durante 3 minutos y se incubaron toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos brevemente (30 segundos) y se recuperó el sobrenadante, el cual se centrifugó por 30 minutos a 13000 rpm a 4°C.

El botón formado se lavó con etanol al 70% y se dejó secar, posteriormente se disolvió en 5 ml de buffer de solubilización (SDS 0.5%, NaCl 100mM, EDTA 25mM, Tris-HCl 10mM pH 7.6 y β -mercaptoetanol 2% -agregado en el momento de la extracción-), posteriormente se extrajo dos veces con volúmenes iguales de fenol, una con un volumen de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, 25:24:1) y en 2 ocasiones más con volúmenes iguales de cloroformo-isoamílico (24:1). Después de cada extracción se centrifugaron los tubos por

15 minutos a 13000 rpm a 4°C y se recuperó la fase acuosa. A la última fase acuosa se le añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 1.5 volúmenes de etanol absoluto (100%), se incubó por 30 minutos como mínimo a -20°C y después se centrifugó por 30 minutos a 13000 rpm a 4°C, el botón formado fue lavado con etanol al 70% y dejado secar para finalmente resuspenderlo en 100 µl de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato). El RNA total purificado se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para evaluar el proceso de purificación de RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de formaldehído, este gel fue teñido con bromuro de etidio para visualizar su integridad a través de los rRNAs: 18s y 28s.

PURIFICACIÓN DE DNA TOTAL

Se tomaron muestras de tallo de 30 diferentes individuos femeninos y 30 individuos masculinos de *O. stenopetala*. A partir de este tejido se siguió el protocolo de purificación de DNA de Cruz-González (2002).

Se tomaron 0.5 gramos de tejido que fueron pulverizados con nitrógeno líquido, al polvo se le añadieron 5 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM pH8, NaCl 1.4 M, CTAB 1% y PVP-40 2%) precalentado a 65°C y se mantuvo a esa temperatura durante 30 minutos más agitando ocasionalmente, posteriormente se enfrió la muestra cambiándola a una temperatura de 35°C y se mantuvo así por 10 minutos. Una vez hecho esto, se realizó la primera extracción con 5 ml de PCI. Esta mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C (todas las centrifugaciones siguientes se realizaron en estas condiciones). Después de recuperar la fase acuosa, se hizo una segunda extracción con 5 ml de PCI y se agregó 1 ml de CTAB 5x (CTAB 5% y NaCl 0.7 M), este último sirvió para precipitar carbohidratos. Se realiza una centrifugación y nuevamente se recupera la fase acuosa. A partir de esta fase acuosa se hizo una primera precipitación de ácidos nucleicos agregando 3.5 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante una hora como mínimo, pasado este tiempo se volvió a centrifugar para formar un precipitado, el cual se resuspendió en 3 ml de agua desionizada y se realizó una segunda precipitación añadiendo un volumen de acetato de amonio 10M y dos volúmenes de etanol 100% e incubando dos horas como mínimo a -20°C. Nuevamente se centrifugó y el precipitado resultante se resuspendió en 300 µl de agua desionizada.

Para evaluar la pureza y cantidad de DNA obtenido, se diluyó un μl de la solución de DNA en 70 μl de agua, y se midió su absorbancia a 280 y a 260 nm. Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm y las proteínas a 280 nm, por lo que el resultado obtenido de la relación de las absorbancias a 260 nm entre las absorbancias a 280 nm (260/280) indicó un buen grado de pureza que se acerca a 2, es decir, el DNA obtenido tiene una porción baja de proteínas contaminantes.

La cuantificación de DNA se lleva a cabo teniendo en cuenta que cada unidad de densidad óptica corresponde a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA. Para realizar la mezcla de DNA de los 30 individuos femeninos y la de 30 masculinos, se colocó un μg de DNA de cada individuo, posteriormente se liofilizaron las muestras para concentrarlas, a continuación se volvió a cuantificar la cantidad de DNA existente en la muestra.

AMPLIFICACIÓN POR PCR Y CLONACIÓN

Para amplificar secuencias ortólogas a los genes *STY*, *CRC* y *TSL* de *A. thaliana* en *O. stenopetala*, fue necesario diseñar oligonucleótidos a partir de las secuencias reportadas de estos genes en otras especies. Para ello se realizó una búsqueda en el GenBank (Banco de Genes) de secuencias proteicas que tuvieran altos grados de similitud con las secuencias previamente reportadas en *A. thaliana*.

De la comparación de las secuencias obtenidas, se eligieron aquellas regiones que están altamente conservadas en las secuencias de la mayoría de las especies, de esta manera, es posible que dichas secuencias también se encuentren conservadas en el genoma de *O. stenopetala*. Dado que las secuencias no resultaron idénticas entre sí, fue necesario sintetizar oligonucleótidos degenerados con el fin de aumentar las probabilidades de amplificación.

Las amplificaciones de fragmentos de DNA ortólogos a los genes *STY*, *CRC* y *TSL*, se realizaron mediante una reacción de PCR preparada de acuerdo a la tabla A y las condiciones de amplificación utilizadas se encuentran descritas en la tabla B:

Tabla A. Mezcla de reacción para PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 25 mM	0.2 mM
Buffer PCR 10x (Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 500mM, MgCl ₂ 15mM y gelatina 0.01%)	1x
Primer 1 (<i>Forward</i>) 0.5 mM	12.5 μ M
Primer 2 (<i>Reverse</i>) 0.5 mM	12.5 μ M
JumpStart Taq DNA Polimerasa (Sigma)	2.5 u
DNA molde	1 μ g
H ₂ O para un volumen final de 20 μ l	

Para visualizar los fragmentos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se tiñó con bromuro de etidio.

Tabla B. Condiciones de amplificación utilizadas

TEMPERATURA	TIEMPO	No. DE CICLOS
94°C	2 minutos	1
94°C	30 segundos	30 ciclos
60°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	1
72°C	4 minutos	

PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Las bandas correspondientes a los productos de amplificación fueron cortadas del gel y colocadas en una columna de fibra de vidrio (formada por un tubo Eppendorf de 600 μ l con tres perforaciones en el fondo y un tapón de fibra de vidrio, montado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml), esta columna se centrifugó a 11,000 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente. El eluato se precipitó con 60 μ g de glucógeno, un tercio de volumen de acetato de amonio 10M, 2 volúmenes de etanol 100%, y se incubó a -20°C durante tres horas mínimo. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente, el botón formado fue resuspendido en 20 μ l de agua desionizada estéril. Con la finalidad de evaluar la eficiencia de la purificación, se hizo un gel de agarosa al 1.5% en el cual se cargaron 3 μ l de la muestra.

CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos amplificados mediante PCR ya purificados fueron ligados al vector de la serie T/A pGEM-t-Easy (Promega), mediante una reacción de ligado con los componentes descritos en la tabla C:

Tabla C. Reactivos utilizados para la clonación de productos amplificados

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA	50 ng
Buffer Ligado 2x (Tris-HCl 60mM pH 7.8, MgCl ₂ 20mM, DTT 20mM, ATP 2mM y polietilenglicol 10%)	1x
Vector pGEM-t-Easy (Promega)	1 μ l (50 ng)
T4 DNA Ligasa	3 u/ μ l
H ₂ O para un volumen final de 10 μ l	

La reacción de ligado se llevó a cabo por 4 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C.

Una vez transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* DH5- α . A una alícuota de 100 μ l de células se les agregó 5 μ l de la reacción de ligado y se le incubó durante 20 minutos a 4°C, después se transfirieron de 40 a 45 segundos a 42°C e inmediatamente después se colocaron a 4°C por dos minutos. Posteriormente, se le agregó 1 ml de solución SOC [medio LB líquido (triptona 1%, NaCl 1% y extracto de levadura 0.5%) y glucosa 0.02M] y se incubaron a 37°C con agitación constante durante dos horas. Después, se centrifugaron las células por 15 segundos y el botón de células se resuspendió en 200 μ l de LB, los cuales fueron sembrados en una caja Petri con medio LB (triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0.5% y agar 1.5%) que contiene ampicilina (100 μ g/ml), X-Gal (80 μ g/ml) e IPTG (0.1 mM) y se pusieron a crecer durante 12 horas a 37°C.

El vector pGEM-t-Easy, permite a las bacterias transformadas crecer en un medio selectivo con ampicilina (100 μ g/ml) ya que codifica el gen de la β -lactamasa cuyo producto hidroliza a la ampicilina del medio. Además, el vector incluye el gen que codifica el extremo amino de la β -galactosidasa (gen *LacZ*) que al insertarse en células que codifican el extremo carboxilo de la β -galactosidasa, logran que la enzima se complemente y tome su forma activa. Dentro de la secuencia que codifica el extremo

amino, se encuentra el sitio múltiple de clonación, en el cual se inserta el DNA a clonar, provocando que el gen se interrumpa y la enzima no tenga actividad. Es decir, las células que adquirieron el vector con el DNA de interés insertado y que crecieron en un medio conteniendo X-Gal (un análogo de la lactosa), no tuvieron coloración, mientras que aquellas que adquirieron el vector vacío, tuvieron la enzima activa y fueron capaces de hidrolizar al X-Gal, que al precipitarse dio una coloración azul. De este modo se eligieron las colonias blancas ya que son transformantes recombinantes. Este proceso se lleva a cabo en presencia de IPTG 100 mM, que es un inductor de la transcripción del promotor del operón de la lactosa que regula al gen de la β -galactosidasa.

Las bacterias que contenían los plásmidos recombinantes (colonias blancas), se sembraron en 6 ml de medio LB líquido con ampicilina y se dejaron creciendo toda la noche a 37°C con agitación constante. Después se centrifugó todo el cultivo celular y se siguió el procedimiento para purificar el plásmido según el protocolo del kit Genelute Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Brevemente, se resuspendieron las células en 200 μ l de *solución de resuspensión* utilizando cuidadosamente la pipeta, a continuación se agregaron 200 μ l de *solución de lisis* y se mezcló suavemente (sin utilizar la pipeta) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos como máximo. Para detener la reacción de lisis se agregaron 350 μ l de *solución de neutralización* y se mezcló suavemente. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Se retomó la fase acuosa y se transfirió a la columna previamente preparada (para prepararla se añadieron 500 μ l de la *solución para la preparación de la columna* y se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto) y se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto. Posteriormente se realizó un lavado para eliminar restos de proteínas y sales contaminantes añadiendo 750 μ l de *solución de lavado* a la columna y se centrifugó un minuto a 13000 rpm. Finalmente, para eluir el DNA plasmídico purificado, se agregaron 50 μ l de *solución de elusión* a la columna y se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto.

Con el plásmido purificado, se realizaron reacciones de digestión para comprobar la presencia del DNA de interés. Dado que el vector contiene las secuencias donde corta la enzima *EcoRI* flanqueando el inserto, es posible que con esta digestión el inserto sea liberado. La reacción de digestión se llevó a cabo como indica la tabla D:

Tabla D. Componentes de la reacción de digestión

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Plásmido	5 μ l
Reactivo-3 10x	1x
<i>Eco</i> RI (Invitrogen)	1 U/ μ l
H ₂ O para un volumen final de 10 μ l	

La reacción de digestión se incubó durante 2 horas a 37°C. Finalmente, se realizó una separación electroforética en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio, para visualizar los resultados de la digestión. Es importante corroborar que el inserto liberado corresponde con el tamaño esperado. Una vez que se obtuvieron los plásmidos con el DNA de interés, se concentró el plásmido a 300 ng/ μ l para posteriormente secuenciar. La secuenciación se hizo utilizando el oligonucleótido T7 y fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La edición de las secuencias a analizar se realizó con ayuda del programa Vector NTI 5.1. Las secuencias editadas fueron comparadas con una base de datos por medio del programa BLAST disponible en la página Web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Las secuencias obtenidas fueron entonces alineadas utilizando el algoritmo CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1994). La traducción a proteína de la secuencia se realizó con el algoritmo SIXFRAME y también se determinaron los porcentajes de identidad y similitud con el algoritmo L-ALIGN, estos tres algoritmos se encuentran disponibles en la página web <http://workbench.sdsc.edu>, en todos los casos se utilizaron los parámetros preestablecidos por el sistema. Los árboles filogenéticos se realizaron en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) con el método de Neighbor-Joining (Kumar *et al.*, 1994).

SOUTHERN BLOT

Para realizar el ensayo tipo Southern Blot se digirieron 15 μ g de DNA de plantas masculinas y de plantas femeninas con *Eco*RI durante toda la noche a 37°C. Con el DNA digerido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 90 Volts durante 2 horas aproximadamente. Terminada la electroforesis, el gel se incubó en una solución de HCl 0.25M en agitación suave durante 15 minutos, después se agregó solución fresca y se

incubó 15 minutos más. A continuación se incubó el gel en una solución de NaCl 1.5M y NaOH 0.5M por 15 minutos en agitación constante, esta incubación se repitió con solución fresca. Una incubación más se realizó con NaCl 1.5M y Tris HCl 1M pH 8 durante 20 minutos en agitación, por último se incubó 20 minutos en agitación en una solución con SSC 10x (NaCl 1.5M, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -citrato de sodio dihidratado- 0.15M) pH 7.

A continuación, se realizó la transferencia a membrana de nylon cargada positivamente Hybond-N+ (Amersham) por capilaridad. En ella se colocó papel filtro sobre una base, de modo que tuviera contacto con la solución de transferencia (SSC 10x), sobre el papel filtro se colocó el gel y sobre el gel la membrana. Todas las burbujas fueron eliminadas y se colocaron 7 cm de papel periódico recortado con peso encima. La transferencia se realizó durante 8 a 14 horas.

Una vez que se desmontó la transferencia, se fijó el DNA a la membrana con luz UV durante 15 segundos con el UV-Crosslinker (Hoefer UVC-500). Se lavó la membrana con SSC 2x por 15 minutos en agitación suave y después con agua desionizada por 15 minutos. A continuación se tiñó la membrana con azul de metileno 0.03% (en acetato de sodio 3M pH 5), el exceso de azul fue removido con agua y la membrana secada con papel filtro y almacenada hasta su utilización. Antes de realizar la hibridación, la membrana se bloqueó por 2 horas a 60°C con solución bloqueadora [SSPE1.5x (el SSPE 20x se compone de NaCl 3.6M, EDTA 0.5M y fosfato diácido de sodio hidratado 0.2M), leche descremada 1%, DNA de salmón 4 mg/ml y SDS 1%]. Para hibridar, la sonda marcada radiactivamente (ver más adelante) se diluyó en 10 ml de solución bloqueadora y se hirvió por 10 minutos. En esta solución se incubó la membrana y se realizó la hibridación en agitación constante por 6 horas a 60°C. Todas las burbujas fueron eliminadas para evitar interferencias en la hibridación.

Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana para retirar restos de radioactividad y uniones inespecíficas con solución de bloqueo a 60°C durante 10 minutos en agitación constante o hasta tener una lectura de radiactividad de ≥ 700 cuentas por minuto en la zona donde la señal era esperada.

Para marcar la sonda se purificó el fragmento de DNA amplificado por PCR y clonado de *OstTSL* y se cuantificó. El marcaje de la sonda se realizó con el kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen). Primero se desnaturalizó el DNA a 95°C por 5 minutos, posteriormente se añadieron 2 μl de dATP 500 μM , 2 μl de dGTP 500 μM , 2 μl de dTTP 500 μM , 15 μl de Random Primers, 5 μl de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (250 μCi), 20 μl de H_2O y 1 μl de

fragmento Klenow. Esta mezcla se incubó durante una hora a 25°C. A continuación, se purificó la sonda con una columna de Sephadex 50G a 4°C.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes se prepararon tomando una colonia aislada de células de *E. coli* DH5- α , éstas fueron sembradas en 50 ml de medio LB y se incubaron con agitación por 12 horas a 37°C. De este cultivo se retomaron 4 ml y se sembraron en 46 ml de medio LB, se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.375 (absorbencia a 590 nm). Posteriormente las células se repartieron en 4 tubos estériles y se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm, cada botón de células se resuspendió (agitando suavemente) en 20 ml de una solución fría de CaCl₂ 60 mM, y se incubaron en hielo por 5 minutos más. Las células se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C y fueron resuspendidas en 80 ml de CaCl₂ 60 mM fría, las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Nuevamente se centrifugaron las células a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C y el botón fue resuspendido en 5 ml de CaCl₂ 60 mM frío. Finalmente se hicieron alícuotas de 100 μ l, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

INCLUSIÓN EN LR-WHITE PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Estilos de flores masculinas y femeninas fueron removidos y fijados en FAA. Posteriormente se removió el exceso de fijador de las muestras con agua corriente y se deshidrataron con una serie de etanoles graduales (70%, 85%, 96%, 100% y 100%) por dos horas cada uno. A continuación, las muestras se incubaron en una mezcla de LR-White: Etanol (1:1), durante dos horas y después se impregnaron en LR-White puro durante 12 horas a 4°C (dos cambios). La inclusión se llevó a cabo en cápsulas de plástico a 56°C en ausencia de oxígeno para promover la polimerización. Para realizar el análisis comparativo entre el gineceo masculino y el femenino, se eligieron 3 zonas de las cuales se realizaron cortes transversales: la parte apical, parte media y parte basal. Los cortes se realizaron con un grosor de 1 a 2 μ m en un ultramicrotomo RMC-MT990 con cuchillas de vidrio y fueron teñidos con azul de toluidina. Las laminillas obtenidas se observaron con microscopía de luz y se tomaron fotomicrografías (López *et al.*, 1998).

RESULTADOS

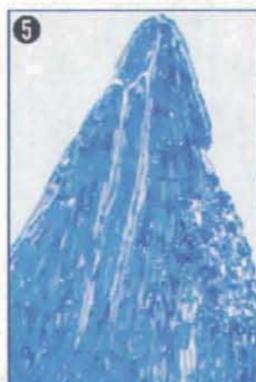
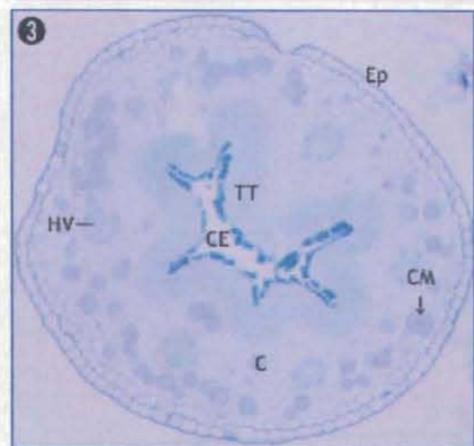
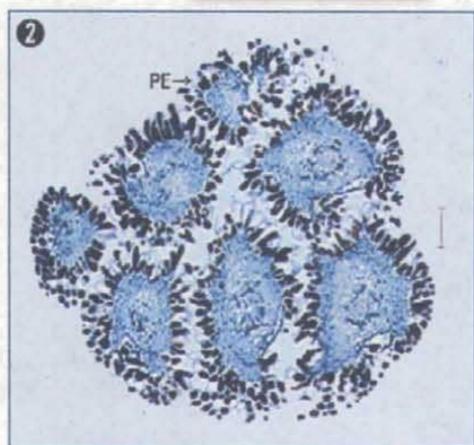
ESTRUCTURA DEL ESTIGMA Y ESTILO DE LAS FLORES FEMENINAS

El gineceo de las flores femeninas posee en la parte apical un estigma organizado regularmente en 8 a 12 lóbulos estigmáticos, cada uno de ellos formado por células pequeñas y alargadas. Las células epidérmicas del estigma están diferenciadas en papilas estigmáticas, éstas cubren en su totalidad a la superficie de los lóbulos estigmáticos (Fig. 1). Las papilas estigmáticas son estructuras unicelulares y alargadas cuyo citoplasma se tiñe fuertemente con azul de toluidina probablemente debido a la existencia de una gran cantidad de sustancias en su interior, las cuales podrían formar parte de los exudados estigmáticos (Fig. 2).

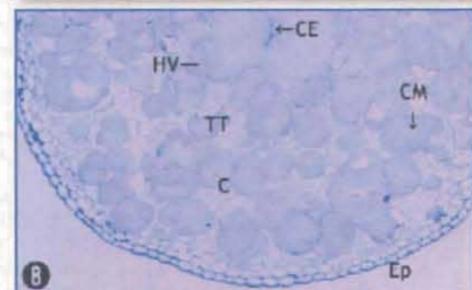
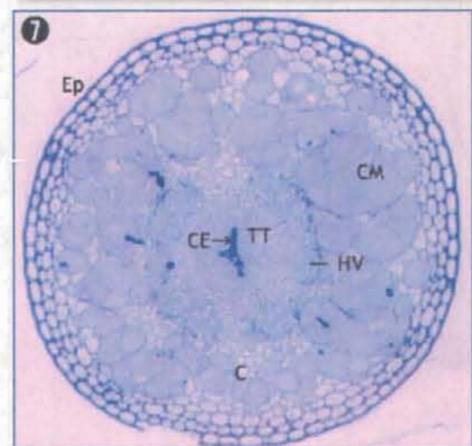
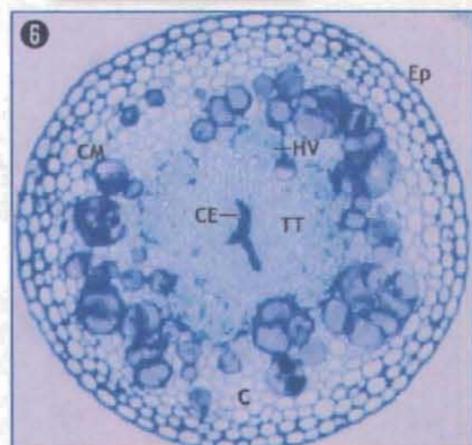
En la parte media, el estilo presenta un canal estilar de posición central. La presencia de este canal clasifica al estilo de las flores femeninas como del tipo hueco. El canal estilar está delimitado internamente por las células secretoras del canal, que representan la epidermis interna de los carpelos. Subepidérmicamente hay varios estratos de tejido de transmisión, el cual está formado por células de diámetro pequeño y apariencia secretora. En conjunto el tejido de transmisión rodea al canal estilar. El estrato más interno del tejido de transmisión, en la cara que da hacia el canal estilar, forma proyecciones hacia el interior de éste dándole una apariencia estelar el lugar de circular una característica de los estilos huecos (Fig. 3). La morfología de las células del canal secretor es muy parecida a la morfología de las células que forman las papilas del tejido estigmático.

Rodeando al tejido de transmisión se encuentran de 20 a 25 estratos de tejido parenquimático cuyas células son generalmente de diámetro mayor que las células del tejido de transmisión. Intercaladas en el tejido parenquimático, se localizan grandes células cuyo citoplasma se tiñe por completo con azul de toluidina. Estas células son responsables de almacenar y secretar sustancias mucilaginosas y resultan muy comunes en los tejidos de las cactáceas. En conjunto el tejido parenquimático y las células mucilaginosas forman al córtex. La parte más externa del estilo corresponde a una epidermis uniestratificada compuesta por células cuya pared se muestra engrosada respecto a los otros tipos celulares que forman parte del estilo (Fig. 3).

♀



♂



Una característica del estilo que sugiere que el gineceo se compone de 8 a 12 carpelos fusionados, es la existencia del mismo número de haces vasculares inmersos en el tejido parenquimático del córtex. Cada haz vascular representa a cada uno de los carpelos que están formando al gineceo. El canal estilar en esta región se encuentra prácticamente cerrado y se observan muy pocas células mucilaginosas. Los haces vasculares se hacen más evidentes y la epidermis externa continua siendo uniestratificada (Fig. 4).

ESTRUCTURA DEL ESTILODIO DE LAS FLORES MASCULINAS

Al estilo que por diversas razones no cumple con sus funciones durante la polinización, se le denomina estilodio, tal es el caso del estilo de las flores masculinas de *Opuntia stenopetala*. Tampoco el ovario es del todo funcional, ya que solo uno de los tres morfos florales desarrolla óvulos que no culminan su maduración. Dado que el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala* carece de superficie estigmática, éste tampoco es funcional, por lo tanto, es considerado como un estigmodio.

Al carecer de superficie estigmática, un corte longitudinal del ápice del estilodio de las flores masculinas (Fig. 5) tiene mayor parecido con la parte media o inferior del estilo femenino (Fig. 1), pero con algunas diferencias.

Figuras 1-4. Cortes histológicos del estigma/estilo de las flores femeninas (♀) en antesis. **Fig. 1.** Corte longitudinal de la región apical formada por lóbulos estigmáticos con múltiples papilas (5x). **Fig. 2.** Corte transversal de la región estigmática mostrando varios lóbulos estigmáticos, cada uno formado por epidermis papilar, un córtex, un haz vascular y tejido de transmisión (2.5x). **Fig. 3.** Corte transversal de la parte media del estilo mostrando el canal estilar de forma estelar, las células del canal, las células del tejido de transmisión, los haces vasculares y el córtex con células mucilaginosas (2.5x). **Fig. 4.** Corte transversal en la región basal del estilo mostrando la poca diferenciación en esta zona del canal estilar (2.5x).

Figuras 5-8. Cortes histológicos del estilodio de las flores masculinas (♂) en antesis. **Fig. 5.** Corte longitudinal del ápice del estilodio mostrando las células esclerificadas de los dos estratos subepidérmicos y de la epidermis (no diferenciadas en papilas estigmáticas), así como numerosas células de mucílago (10x). **Fig. 6.** Corte transversal del ápice del estilodio mostrando la obstrucción del canal secretor, el reducido tejido de transmisión y la lignificación de dos o tres estratos subepidérmicos del córtex (2.5x). **Fig. 7.** Corte transversal de la región media del estilodio mostrando una mayor obstrucción del canal estilar y la poca cantidad del tejido de transmisión (2.5x). **Fig. 8.** Corte transversal de la región basal del estilodio mostrando un mayor número de células mucilaginosas con respecto a las presentadas en la base del estilo de las flores femeninas de la figura 4 y el canal estilar completamente cerrado (2.5x).

C= córtex; PE= papilas estigmáticas; CE= canal estilar; CM= células mucilaginosas; E= epidermis externa; HV= haz vascular y. TT= tejido de transmisión;

El ápice del estilodio tiene en el centro un canal estilar muy reducido, casi obstruido y sin tomar una apariencia de estrella (Fig. 6); sin embargo, las células que la rodean se tiñen fuertemente con azul de toluidina semejándose a aquellas del canal estilar de los estilos de flores femeninas (Fig. 3). Aunque el canal estilar esté prácticamente cerrado, continúa siendo un estilo de tipo hueco porque presenta diferenciación de las células de la epidermis interna en células del canal. El tejido de transmisión que rodea al canal estilar no resulta tan evidente como ocurre en el caso del estilo femenino, ni por tinción ni por la forma de las células; además, no puede observarse que el tejido de transmisión se organice en columnas (Figs. 6 y 7).

El córtex se forma por células parenquimáticas, con un mayor número de células mucilaginosas y donde los dos o tres estratos subepidérmicos se esclerifican. Los haces vasculares inmersos en el córtex pueden ser en menor número (de 4 a 6) y corresponden a los carpelos que conforman el gineceo (Fig. 6). Estos haces no se separan por completo entre sí, como ocurre en el estilo femenino, sino que permanecen muy cercanos unos a otros, lo cual dificulta su visualización. La capa más externa corresponde a la epidermis uniestratificada, formada por células isodiamétricas de pared celular más gruesa que el resto de los tejidos del estilodio (Fig. 6).

La región media del estilodio conserva las mismas características que la región apical, excepto que el canal estilar es aún más reducido y hay mayor número y tamaño de células mucilaginosas (Fig. 7).

En la base del estilo en las flores masculinas el canal estilar se obstruye casi por completo comparado con las regiones hacia el ápice del estilodio. Al igual que en la zona media, existe poca cantidad de células parenquimáticas, la mayor parte del espacio es ocupado por células mucilaginosas de gran tamaño.

La epidermis sigue siendo uniestratificada y engrosada al igual que los dos o tres estratos por debajo de ésta. Los haces vasculares no son claramente distinguibles (Fig. 8).

En la Tabla 1 se resumen las diferencias más notorias encontradas en la estructura del gineceo de las flores masculinas y la estructura del gineceo de las flores femeninas.

Tabla 1. Diferencias estructurales encontradas en la antesis entre el estilo-estigma de las flores femeninas y el estilodio de las flores masculinas. CE= canal estilar; TT= tejido de transmisión; HV= haces vasculares.

	CARACTERÍSTICA	ESTILO/ESTIGMA FEMENINO	ESTILODIO MASCULINO
Zona Apical	Epidermis Externa Córtex + HV TT + CE	La región apical (estigma) del gineceo femenino está formada por lóbulos estigmáticos. La epidermis está diferenciada en múltiples papilas estigmáticas. Cada lóbulo estigmático presenta un corte que rodea a un HV.	Uniestratificada Formado por células parenquimáticas, grandes células mucilaginosas y 8-10 HV. CE y TT muy reducido.
Zona Media	Epidermis Externa Córtex + HV TT + CE	Uniestratificada Formado por células parenquimáticas, grandes células mucilaginosas y 10-12 HV TT abundante alrededor del amplio CE de forma estelar	Uniestratificada Estratos subepidérmicos esclerificados. Aumenta el número y tamaño de células mucilaginosas. Los HV no se encuentran claramente diferenciados. TT muy reducido y el CE casi obstruido.
Zona Basal	Epidermis Externa Córtex + HV TT + CE	Uniestratificada Gran mayoría de células parenquimáticas y muy pocas células mucilaginosas. HV más evidentes. El CE tiene tamaño reducido al igual que el TT.	Uniestratificada Gran mayoría de grandes células mucilaginosas. HV difícilmente distinguibles. CE y TT sumamente reducidos

CLONACIÓN DE UN GEN ORTÓLOGO DE *STY* EN *O. stenopetala*

Para tratar de clonar a *STY* en *O. stenopetala* se procedió a diseñar los oligonucleótidos a partir de 11 secuencias encontradas en el GenBank. Estas secuencias muestran porcentajes de identidad significativos ($E \leq 4e^{-11}$). Nueve de ellas pertenecen a *A. thaliana*, una a *Oriza sativa* y otra de *Lycopersicum esculentum* (ver tabla 2 para números de acceso en el GenBank y abreviaturas utilizadas en este estudio).

Tabla 2. Secuencias con altos grados de similitud al gen *STY* de *A. thaliana* obtenidas a partir de una búsqueda en el GenBank.

ESPECIE	NO. DE ACCESO GENBANK	ABREVIATURA UTILIZADA	E
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g51060	<i>STY1</i>	0.0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g36260	<i>STY2</i>	$9e^{-23}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g12330	<i>LRP1</i>	$4e^{-17}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g66350	<i>SHI</i>	$4e^{-42}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g21400	<i>SRS3</i>	$2e^{-14}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g18120	<i>SRS4</i>	$5e^{-17}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g75520	<i>SRS5</i>	$4e^{-22}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g54430	<i>SRS6</i>	$2e^{-11}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19790	<i>SRS7</i>	$6e^{-21}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g33210	<i>SRS8</i>	$3e^{-35}$
<i>Oriza sativa</i>	BAB64713	<i>LRP Osa</i>	$5e^{-19}$
<i>Lycopersicum esculentum</i>	*	<i>SRS Les</i>	*

*La secuencia se encuentra únicamente reportada en Fridborg *et al.* (2001).

Todas las secuencias fueron alineadas con el programa CLUSTAL-W, y se identificaron las regiones más conservadas, las cuales se utilizaron como base para diseñar los oligonucleótidos (Fig. 9).

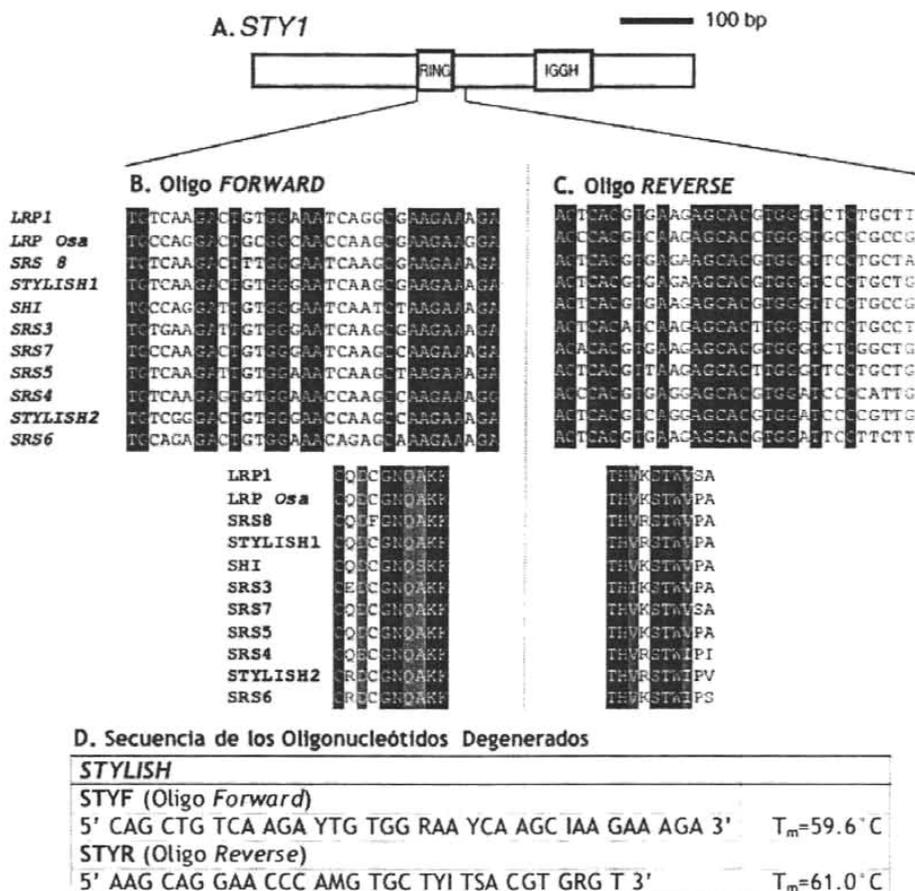


Figura 9. A. El esquema muestra al gen *STY* de *A. thaliana* y sus dominios dedos de zinc (RING) y la región de aminoácidos básicos (IGGH — modificado de Kuusk et al., 2002) En B. y en C. se observan los alineamientos a nivel de nucleótidos y de residuos de aminoácidos de las secuencias similares al gen *STYLISH* de *A. thaliana*. Únicamente se muestran las zonas elegidas para el diseño de En B. se muestra la zona utilizada para el oligo *STY FORWARD*, en C. la zona utilizada para el oligo *STY REVERSE*. Los nucleótidos sombreados con negro son idénticos en todas las secuencias mostradas. Sombreados con gris se muestran grupos de aminoácidos con características similares. D. Oligonucleótidos degenerados diseñados y su temperatura óptima de alineamiento (T_m).

El análisis de secuencias reveló que la región mejor conservada abarca al dominio dedos de zinc, característico de estas proteínas y otra región muy conservada, pero que no muestra similitud significativa con algún dominio previamente reportado. El dominio conservado de la proteína tiene una longitud total de 38 residuos de aminoácidos. Este mismo alineamiento, pero hecho a nivel de nucleótidos, muestra un menor nivel de conservación si se compara con la existente a nivel de aminoácidos, por esta razón fue necesario incluir degeneraciones (ver Apéndice 1) en el oligonucleótido utilizado como iniciador y así tener mayor probabilidad de amplificar por PCR un DNA ortólogo en *O. stenopetala*.

En la Figura 9 se muestra un esquema del gen *STY1* y la región flanqueada por los oligonucleótidos diseñados. Dado que esta región muestra altos grados de conservación en las secuencias encontradas en el GenBank, se utilizó como base para el diseño de oligonucleótidos degenerados.

Los nucleótidos elegidos para ser parte de los iniciadores se tomaron de las zonas que flanqueaban la región conservada, de este modo, un producto de PCR generado con estos oligonucleótidos, tendría un tamaño aproximado de 110 pb.

AMPLIFICACIÓN DE *OstSTY*♂ Y *OstSTY*♀ POR PCR

Dado la imposibilidad de extraer RNA de los estilos de *O. stenopetala*, se purificó DNA genómico de 30 individuos masculinos y de 30 individuos femeninos. De cada individuo se tomó 1 µg de DNA y se realizó una mezcla que contuviera la misma cantidad de DNA de cada uno de los 30 individuos. Esta mezcla fue utilizada como molde para llevar a cabo las reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos de DNA ortólogos al gen *STY* de *A. thaliana*. Dos bandas de aproximadamente 120 pb fueron sintetizadas, una utilizando el DNA de plantas masculinas como molde y la otra con el DNA de las plantas femeninas, en ambos casos, el tamaño correspondía con el esperado (Fig. 10A).

Las bandas amplificadas fueron purificadas del gel de agarosa, ligadas al vector pGEM-t-Easy, con el cual se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa DH5-α. Después de seleccionar a las bacterias que poseían el plásmido recombinante (Fig. 10B), el mismo se purificó y se secuenció.

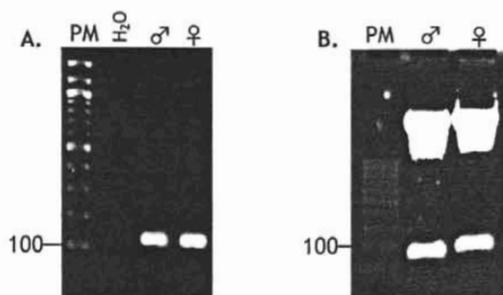


Fig. 10. A. Amplificación por PCR de un fragmento de DNA de aproximadamente 100 pares de bases usando como molde DNA masculino ($\sigma^{\text{♂}}$) y DNA femenino (♀). H₂O representa al control sin molde. B. Digestiones de los plásmidos recombinantes con *EcoRI*. En ambos casos se libera un fragmento de 100 pb aproximadamente. PM= peso molecular en pares de bases.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa CLUSTAL-W. Ambas secuencias fueron traducidas mediante el programa SIXFRAME y las secuencias elegidas fueron aquellas cuyos marcos de lectura no presentaron codones de término prematuros. Tanto a nivel de ácidos nucleicos como de residuos de aminoácidos, se buscaron diferencias en las secuencias encontradas de *O. stenopetala* y luego se alinearon con las secuencias previamente reportadas que fueron utilizadas durante el diseño de oligonucleótidos degenerados (Fig. 11).

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

En el genoma de las plantas masculinas y en el de las plantas femeninas existe un fragmento de DNA homólogo a los genes *STYLISH* de *A. thaliana*. La secuencia proveniente de las plantas masculinas (*OstSTY* $\sigma^{\text{♂}}$) y la proveniente de las femeninas (*OstSTY* ♀), tienen una longitud de 111 pares de bases y son prácticamente iguales (99.7% de identidad), únicamente existe un cambio de bases, en la posición 21; en la secuencia masculina existe una timina, mientras que en la femenina es una citosina (Fig. 11). Sin embargo, al traducir ambas secuencias, el aminoácido producido no cambia, es decir, a nivel de residuos de aminoácidos las secuencias son idénticas. La longitud total del fragmento es de 39 aminoácidos (Fig. 12).

El fragmento *OstSTY* $\sigma^{\text{♂}}$ a nivel de nucleótidos tiene un porcentaje de identidad de 85.5% con *STY1* de *A. thaliana*, mientras que con *STY2* el porcentaje de identidad alcanza el

77.4%. *OstSTY*♀. tiene un porcentaje de identidad de 84.7% con *STY1* y de 76.7% con *STY2*.

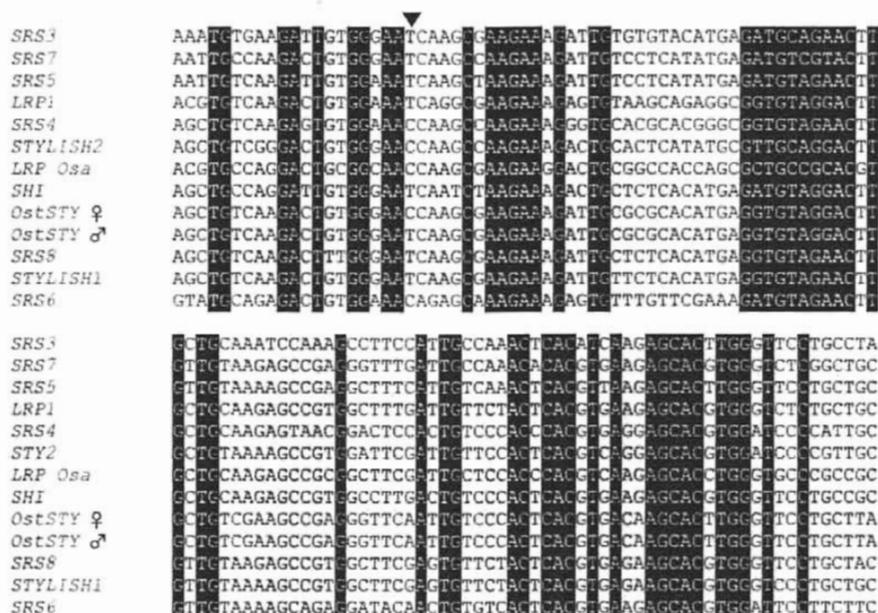


Figura 11. Alineamiento a nivel de ácidos nucleicos del dominio dedos de zinc de los diferentes genes miembros de la familia *SHL* de *A. thaliana* y las secuencias obtenidas de *O. stenopetala* (*OstSTY*♂ y *OstSTY*♀). En negro se encuentran los nucleótidos conservados en todas las secuencias. La punta de flecha indica el nucleótido que difiere entre *OstSTY*♂ y *OstSTY*♀.

A nivel de residuos de aminoácidos la similitud entre *OstSTY*♂ y *OstSTY*♀ es de 82.5% con *STY1* y de 80% con *STY2*. El fragmento muestra altos porcentajes de similitud con el dominio dedos de zinc de las proteínas de la familia de genes relacionados con *SHL* de *A. thaliana*. Este dominio dedos de zinc comprende 31 residuos de aminoácidos cuya secuencia consenso es Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X-His-X₂-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₂-His (-X es cualquier aminoácido— tabla 3). Estos residuos de aminoácidos que se conservan de forma casi absoluta, (sólo la secuencia *SRS8* cambia la segunda cisteína por fenilalanina) constituyen los ligandos probables a zinc. Esta secuencia consenso también se conserva en las secuencias obtenidas de arroz (*LRP Osa*) y de jitomate (*SRS Les*), y en ambas secuencias de *O. stenopetala* sin ningún cambio en los residuos conservados.

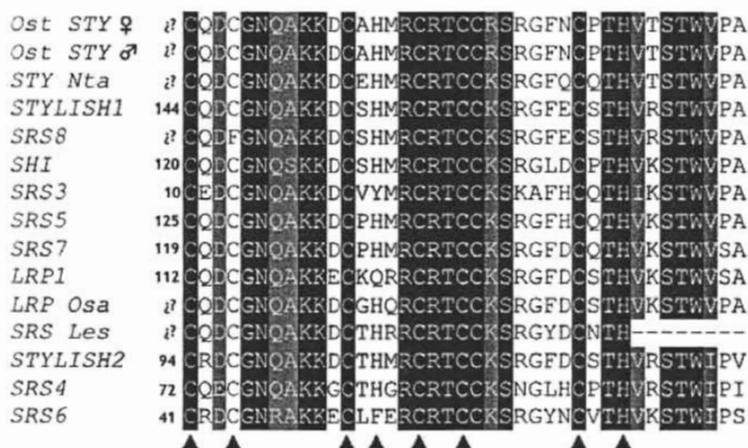


Figura 12. Alineamiento a nivel de residuos de aminoácidos de los dominios dedos de zinc de las secuencias relacionadas con SHI, en el se muestra que las dos secuencias pertenecientes a *O. stenopetala*: *OstSTY*♂ y *OstSTY*♀ son idénticas. En negro se muestran los residuos conservados en todas las secuencias, en gris aquellos residuos con características similares. Las puntas de flecha representan los residuos de Cys e His que constituyen ligandos putativos a zinc, todos ellos se encuentran conservados en *O. stenopetala*. Las secuencias de aminoácidos que aparecen son: de *A. thaliana* (STYLISH1 y 2, SRS1 a 8, SHI y LRP1) de *Oryza sativa* (*OsaLRP*) y de *Lycopersicon esculentum* (*Les LRP*).

Los fragmentos amplificados de *O. stenopetala* no sólo abarcan el dominio dedos de zinc de la proteína, sino que continúan con ocho aminoácidos más que también muestran un alto grado de conservación entre todas las secuencias, (excepto con *SRS Les* de la cual sólo se reporta el fragmento correspondiente al dominio dedos de zinc,). Este fragmento no muestra ninguna similitud de secuencia con algún dominio funcional previamente reportado y el papel que representa en la función de estas proteínas no ha sido determinado.

Tabla 3. Secuencias consenso de los motivos de unión a zinc (modificado de Kuusk, 2003).

MOTIVO															
RING	C	X ₂	C	X ₉₋₃₉	C	X ₁₋₃	H	X ₂₋₃	C	X ₂	C	X ₄₋₄₈	C	X ₂	C
RING-H2	C	X ₂	C	X ₉₋₃₉	C	X ₁₋₃	H	X ₂₋₃	H	X ₂	C	X ₄₋₄₈	C	X ₂	C
PHD	C	X ₂	C	X ₉₋₂₁	C	X ₂₋₄	C	X ₄₋₅	H	X ₂	C	X ₁₂₋₄₆	C	X ₂	C
LIM	C	X ₂	C	X ₁₇₋₁₉	H	X ₂	C	X ₂	C	X ₂	C	X ₁₆₋₂₁	C	X ₂₋₃	C
STY/SHI	C	X ₂	C	X ₇	C	X ₁	H	X ₂	C	X ₂	C	X ₇	C	X ₂	H
<i>Ost STY</i>	C	X ₂	C	X ₇	C	X ₁	H	X ₂	C	X ₂	C	X ₇	C	X ₂	H

Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis filogenético con las secuencias pertenecientes a otras especies, dichas relaciones fueron representadas en un árbol filogenético (Fig. 13). En la filogenia se puede observar que las secuencias de *O. stenopetala* (*Ost STY*) tienen mayor parecido con las secuencias *STY1* y *SRS8* de *A. thaliana*.

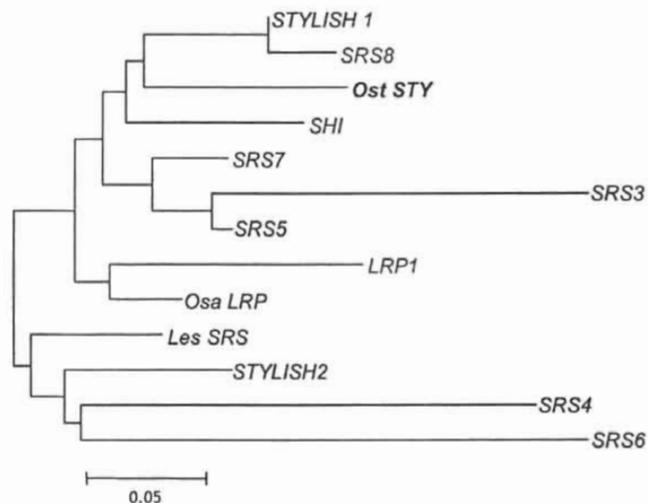


Figura 13. Análisis filogenético del dominio dedos de zinc de las secuencias relacionadas a SHI de *A. thaliana*. Las secuencias de aminoácidos que aparecen son: de *A. thaliana* (STYLISH1 y 2, SRS1-8, SHI y LRP1) de *Oryza sativa* (*Osa LRP*) y de *Lycopersicon esculentum* (*Les LRP*). La secuencia de *O. stenopetala*, *OstSTY* se agrupan junto a STYLISH1 y SRS8 de *A. thaliana*.

A pesar de que hay varias secuencias reportadas de genes tipo *SRS* en *A. thaliana*, estos no forman un conjunto único dentro de la filogenia.

Las secuencias de *O. stenopetala*, no muestran agrupamiento con las secuencias de jitomate, lo cual resulta sorprendente si consideramos que la relación filogenética como especies, es más cercana con ella que con *A. thaliana*. Sin embargo, dada la importancia del dominio en la función de este grupo de proteínas, es lógico que los cambios que existan sean mínimos y que aún entre especies muy distantes filogenéticamente, haya una gran similitud de secuencia. Esto también se ve apoyado por el hecho de que en otras partes del gen, prácticamente no existen zonas conservadas (a excepción del dominio IGGH presente en las secuencias parecidas a *SHI*; Kuusk *et al.*, 2002).

AMPLIFICACIONES POR PCR INDIVIDUALES

Dado que los genes *OstSTY* σ° y *OstSTY* φ fueron clonados a partir de una mezcla de DNA de 30 individuos, existía la posibilidad de que el gen estuviera presente sólo en el genoma de algunos de los individuos y no en el de todos. Para corroborar la presencia/ausencia del gen en los 60 individuos, se realizaron reacciones de PCR para cada uno de los individuos con las condiciones señaladas anteriormente. Los productos de PCR formados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Fig. 14).

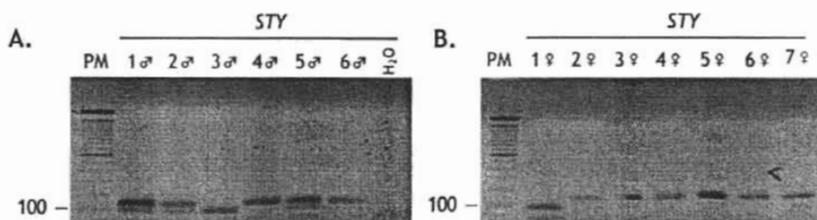


Figura 14. Reacciones de PCR individuales para 30 individuos masculinos (A) y 30 individuos femeninos (B) de *O. stenopetala* con los oligonucleótidos para *STY*. A. En el caso del DNA de los individuos masculinos, 5 de las 6 muestras producen un producto amplificado de ~300 pb (1♂, 2♂, 4♂, 5♂ y 6♂). De la muestra que no produce amplificado (3♂) se extrajo nuevamente DNA y se repitió la reacción de PCR, en esa ocasión el resultado fue positivo (no mostrado). B. La misma situación se presentó con la muestra 1♀, nuevamente al repetir el experimento el resultado fue positivo (no mostrado). En todos los casos, se muestran separaciones electroforéticas de las reacciones de PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. PM= peso molecular en pares de bases.

En los 30 individuos masculinos hubo síntesis de un fragmento de DNA de tamaño aproximado de 120 pares de bases, es decir, coincidiendo con el esperado (Fig. 14A), de igual forma ocurrió con las reacciones que utilizaron como molde DNA femenino (Fig. 14B). Estas reacciones, además de indicarnos la presencia del gen, son útiles para examinar la integridad del DNA, en otras palabras, cuando el DNA de los individuos se encuentra íntegro, la reacción de PCR para *STY* produce fragmentos de 120 pares de bases aproximadamente.

Cuando no existió producto de amplificación para *STY*, fue necesario volver a purificar DNA genómico del individuo analizado y utilizar éste como molde para una nueva reacción de PCR. En los casos en los que fue necesario repetir el experimento, con el DNA recién purificado siempre hubo formación de producto (geles no mostrados),

indicando que el fragmento si está presente en el genoma del individuo y que la falta de producto se debe a degradación del DNA utilizado en los experimentos donde no se observa el fragmento.

CLONACIÓN DE UN GEN ORTÓLOGO DE *CRC* EN *O. stenopetala*

De la misma manera que con *STY*, se procedió a buscar secuencias similares a *CRC* de *A. thaliana*. Se tomaron en cuenta aquellas secuencias con valor de $E \leq 3e^{-06}$. Los números de acceso en el GenBank de las secuencias, así como la especie de la que provienen y la abreviatura utilizada en este estudio se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencias obtenidas del GenBank a partir de una búsqueda de secuencias homólogas al gen *CRC* de *A. thaliana*.

ESPECIE	NO. DE ACCESO GENBANK	ABREVIATURA UTILIZADA	E
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP177078	<i>CRC Ath</i>	0.0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP566037	<i>FIL Ath</i>	$2e^{-21}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAD33716	<i>YABBY2</i>	$2e^{-24}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP567154	<i>YABBY3</i>	$3e^{-06}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF22893	<i>YAB Ath</i>	$9e^{-10}$
<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	AAO22990	<i>YAB Cxm</i>	$1e^{-24}$
<i>Oriza sativa</i>	CAD41514	<i>YAB Osa</i>	$1e^{-17}$
<i>Zea mays</i>	AAP79885	<i>YAB Zma</i>	$9e^{-16}$

La figura 15 muestra un esquema de un gen *YABBY* y los dominios existentes. Se pudieron identificar dos zonas claramente conservadas a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos. La primera de ellas corresponde a un dominio dedos de zinc en la región N-terminal, el segundo dominio se encuentra en la región C-terminal y corresponde al dominio *YABBY*, éste forma una estructura de tipo hélice-asa-hélice. De cada una de estas dos regiones conservadas se eligió una zona para el diseño de oligonucleótidos degenerados, para lo cual se hizo otro alineamiento con las mismas secuencias, pero ahora a nivel de nucleótidos, los cuales no tienen un nivel tan alto de conservación, por lo que fue necesario incluir degeneraciones en los oligonucleótidos (ver Apéndice 1) para tener mayor probabilidad de clonar el gen ortólogo en *O. stenopetala*. Un producto de PCR que se genere a partir de estos oligonucleótidos, deberá tener un tamaño aproximado de 390 pb.

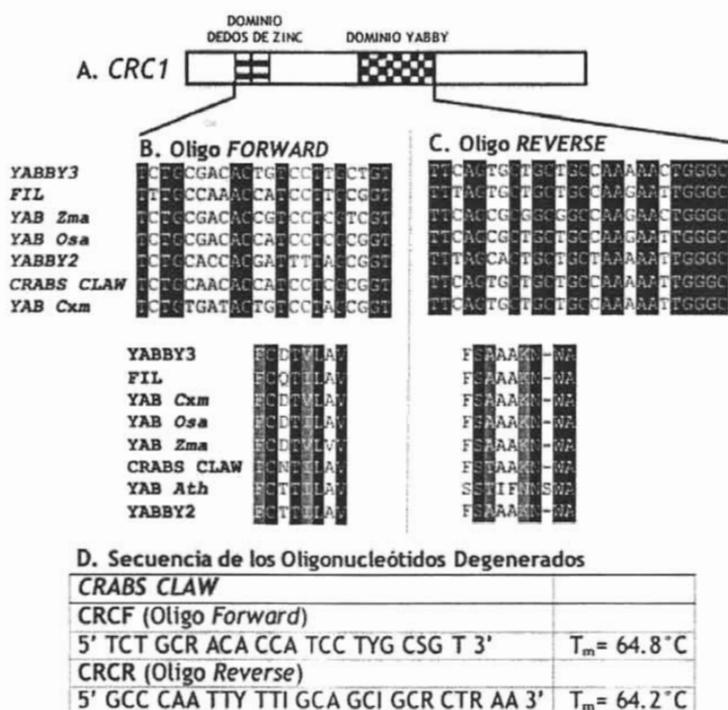


Figura 15. A. Representación esquemática de un gen YABBY (modificado de Siegfried *et al.*, 1999), en el se muestran el dominio dedos de zinc y el dominio YABBY y B. alineamiento a nivel de nucleótidos y aminoácidos de las regiones más conservadas de las secuencias obtenidas del Banco de Genes con mayor similitud a CRC de *A. thaliana*. En B. se muestra la zona utilizada para el oligo CRC Forward y en C. la zona utilizada para el oligo CRC Reverse. Los nucleótidos sombreados con negro son idénticos en todas las secuencias mostradas, en D. se muestran las secuencias de los oligonucleótidos degenerados diseñados y su temperatura óptima de alineamiento (T_m).

AMPLIFICACIÓN DE CRC EN *O. stenopetala*

Dado que CRC en *A. thaliana* tiene expresión específica en la flor y ante la imposibilidad de purificar RNA de estilos de *O. stenopetala*, se decidió trabajar con DNA genómico de plantas femeninas y masculinas de *O. stenopetala* como molde para llevar a cabo las amplificaciones por PCR y así clonar un fragmento de DNA homólogo a CRC. Para las reacciones de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos degenerados

sintetizados a partir de secuencias conocidas de genes de la familia YABBY. Ninguna de las reacciones realizadas produjo un producto de amplificación. Existen dos posibilidades por las que esto puede ocurrir, la primera es que los oligonucleótidos no funcionen correctamente, o bien, la segunda opción es que no exista un fragmento de DNA similar al dominio YABBY en el genoma de *O. stenopetala*.

Para descartar la primera posibilidad se purificó DNA de *A. thaliana* para utilizarlo de control, con él se llevaron a cabo las reacciones de PCR, en éstas se produjeron dos productos amplificados con tamaños aparentes de 1800 y 900 pares de bases (Fig. 16). Dado que el fragmento amplificado a partir de DNA genómico de *A. thaliana* esperado es de 928 pares de bases, se decidió clonar únicamente el fragmento de este tamaño.

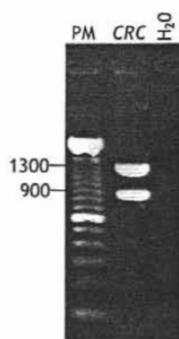


Figura 16. Separación electroforética de los productos de amplificación por PCR de un fragmento de *CRC* a partir de DNA genómico de *A. thaliana*. El producto clonado y secuenciado fue el de tamaño aproximado de 900 pares de bases. PM= peso molecular en pares de bases. H₂O= control sin molde.

La secuencia obtenida es prácticamente igual a la secuencia genómica reportada en www.arabidopsis.org de *CRC* (Fig. 17). Únicamente se presentan 11 cambios de nucleótidos en toda la secuencia y 5 de ellos se localizan en la zona de los oligonucleótidos degenerados. Este resultado avala la funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados, por lo que es probable que lograra amplificar un fragmento de DNA homólogo a *CRC* en *O. stenopetala* debido a que no se encuentra en su genoma o bien, no presenta altos grados de similitud.

Ath CRC DNA CRC-900	TCTGCACACCATCCTCGGGTAAATTATTACCTACATATAAGAAGATATATAAGCATAT CTCGCCACACCATCCTCGGGTAAATTATTACCTACATATAAGAAGATATATAAGCATAT
Ath CRC DNA CRC-900	ATATACTTGCATGACCCTATATATGTTGATAAATACACATACATGCTAAGCTATACATAT ATATGCTTGCATGACCCTATATATGTTGATAAATACACATACATGCTAAGCTATACATAT
Ath CRC DNA CRC-900	TGTTGTTTATGTTATATATATATATATTTCTTCAAATTTTCGAGCTAATTTGTAAACCGA TGTTGTTTATGTTATATATATATATATTTCTTCAAATTTTCGAGCTAATTTGTAAACCGA
Ath CRC DNA CRC-900	ATCTACACACATATATAGGTTGGGATACCATTGAAGAGAATGCTTGACACGGTAACGGTG ATCTACACACATATATAGGTTGGGATACCATTGAAGAGAATGCTTGACACGGTAACGGTG
Ath CRC DNA CRC-900	AAATGCGGCCATTGTGGTAACCTCTCGTTTCTCACCACAACCTCCTCCTCTTCAAGGCCAT AAATGCGGCCATTGTGGTAACCTCTCGTTTCTCACCACAACCTCCTCCTCTTCAAGGCCAT
Ath CRC DNA CRC-900	GTTAGCCTCACCCCTCAGGTATATAACACTTGTGTTATAGTTATACATACGAGTATAATT GTTAGCCTCACCCCTCAGGTATATAACACTTGTGTTATAGTTATACATACGAGTATAATT
Ath CRC DNA CRC-900	CTTTTTATACAAAAAAGCTGATACTAAGCCAATCTTTGTTTTAACTAAGCAGATGCAGAGC CTTTTTATACAAAAAAGCTGATACTAAGCCAATCTTTGTTTTAACTAAGCAGATGCAGAGC
Ath CRC DNA CRC-900	TTTGGTGGAAAGTGAATAAAGAAGGAAGCTCTTCTTCTTCTCTTCTCCACCTCCAGC TTTGGTGGAAAGTGAATAAAGAAGGAAGCTCTTCTTCTTCTCTTCTCCACCTCCAGC
Ath CRC DNA CRC-900	GACCAGCCCCCATCTCCCTCACCTCCCTTTGTGCGTCAAACGTAATTAAGCTTATTACCAI GACCAGCCCCCATCTCCCTCACCTCCCTTTGTGCGTCAAACGTAATTAAGCTTATTACCAI
Ath CRC DNA CRC-900	TTCTGACTCCTTTTTCTTCTATAAACTTAATCACTATCTACATATATATGATTATCTGTI TTCTGACTCCTTTTTCTTCTATAAACTTAATCACTATCTACATATATATGATTATCTGTI
Ath CRC DNA CRC-900	GAACATCTTTGGTATTGTAGCTCCTGAGAAGAAGCAGAGGCTCCCATCTGCATACAACCG GAACATCTTTGGTATTGTAGCTCCTGAGAAGAAGCAGAGGCTCCCATCTGCATACAACCG
Ath CRC DNA CRC-900	CTTCATGAGGTTTAACTTTGACATATACTCTTTAGTTCCAAGTTAATATGAAATTTAA CTTCATGAGGTTTAACTTTGACATATACTCTTTAGTTCCAAGTTAATATGAAATTTAA
Ath CRC DNA CRC-900	TGCATAAAAAAACAATATAAATTTAGTACTCTCTTCTTCATCTTTTTTTGAAACAAAATATAA TGCATAAAAAAACAATATAAATTTAGTACTCTCTTCTTCATCTTTTTTTGAAACAAAATATAA
Ath CRC DNA CRC-900	AAAGGGA AAAGGGA

Figura 17. Alineamiento a nivel de nucleótidos del fragmento de DNA genómico de *A. thaliana* utilizando los oligonucleótidos degenerados diseñados (CRC-900) y la secuencia genómica reportada (*Ath CRC DNA*). Ambos fragmentos son prácticamente idénticos con sólo 11 cambios encontrados (bases no sombreadas), de los cuales 5 se localizan en las regiones de los oligonucleótidos degenerados. En negro se muestran los nucleótidos idénticos en ambas secuencias.

CLONACIÓN DE UN GEN ORTÓLOGO DE *TSL* EN *O. stenopetala*

Se realizó una búsqueda de secuencias similares a *TSL* de *A. thaliana* y se eligieron aquellas que presentaron los mayores niveles de similitud ($E \leq 1e^{-96}$). En este caso se consideraron secuencias provenientes de animales y plantas para realizar el análisis. En la tabla 5 se muestran las secuencias utilizadas, la especie de la que provienen, así como el número de acceso del GenBank y las abreviaturas que se utilizaron este estudio.

Tabla 5. Secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank con alto grado de similitud a la secuencia del gen *TSL* de *A. thaliana*.

ESPECIE	NO. DE ACCESO GENBANK	ABREVIATURA UTILIZADA	E
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g20930	<i>Ath TOUSLED</i>	0.0
<i>Oriza sativa</i>	AAL58952	<i>Osa TLK</i>	0.0
<i>Triticum aestivum</i>	AY847708	<i>Tae TLK</i>	0.0
<i>Nicotiana glutinosa</i>	AAM94621	<i>Ngl TLK</i>	$1e^{-127}$
<i>Zea mays</i>	T001185	<i>Zma TLK1</i>	$1e^{-111}$
<i>Zea mays</i>	T001186	<i>Zma TLK4</i>	$1e^{-109}$
<i>Danio rerio</i>	AAK52417	<i>Dre pKU-α</i>	$1e^{-106}$
<i>Danio rerio</i>	AAK52418	<i>Dre pKU-β</i>	$1e^{-105}$
<i>Homo sapiens</i>	AAH32657	<i>Hsa TLK</i>	$1e^{-106}$
<i>Homo sapiens</i>	NP036422	<i>Hsa TLK1</i>	$1e^{-105}$
<i>Homo sapiens</i>	BAA20562	<i>Hsa pKU-β</i>	$1e^{-105}$
<i>Homo sapiens</i>	BAA20561	<i>Hsa pKU-α</i>	$1e^{-104}$
<i>Mus musculus</i>	AAC02226	<i>Mmu TLK</i>	$1e^{-105}$
<i>Mus musculus</i>	NP766252	<i>Mmu TLK1</i>	$1e^{-105}$
<i>Caenorhabditis elegans</i>	S40704	<i>Cel TLK</i>	$1e^{-100}$
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAD55423	<i>Dmel TLK</i>	$1e^{-96}$

A nivel de residuos de aminoácidos, se localizó una amplia región altamente conservada, correspondiente al dominio catalítico de cinasa (Fig. 18). Las secuencias de maíz fueron utilizadas a pesar de que son secuencias parciales que no cubren la totalidad del dominio catalítico, dichas secuencias no fueron utilizadas en los alineamientos a nivel de nucleótidos debido a que no existen estos registros en la base de datos del banco de genes.

En aquellos casos en los que se presentaron diferencias muy grandes entre las secuencias, se les asignó mayor peso a las secuencias pertenecientes a plantas.

El producto amplificado mediante PCR utilizando dichos oligonucleótidos se predice tendría un tamaño aproximado de 300 pb.

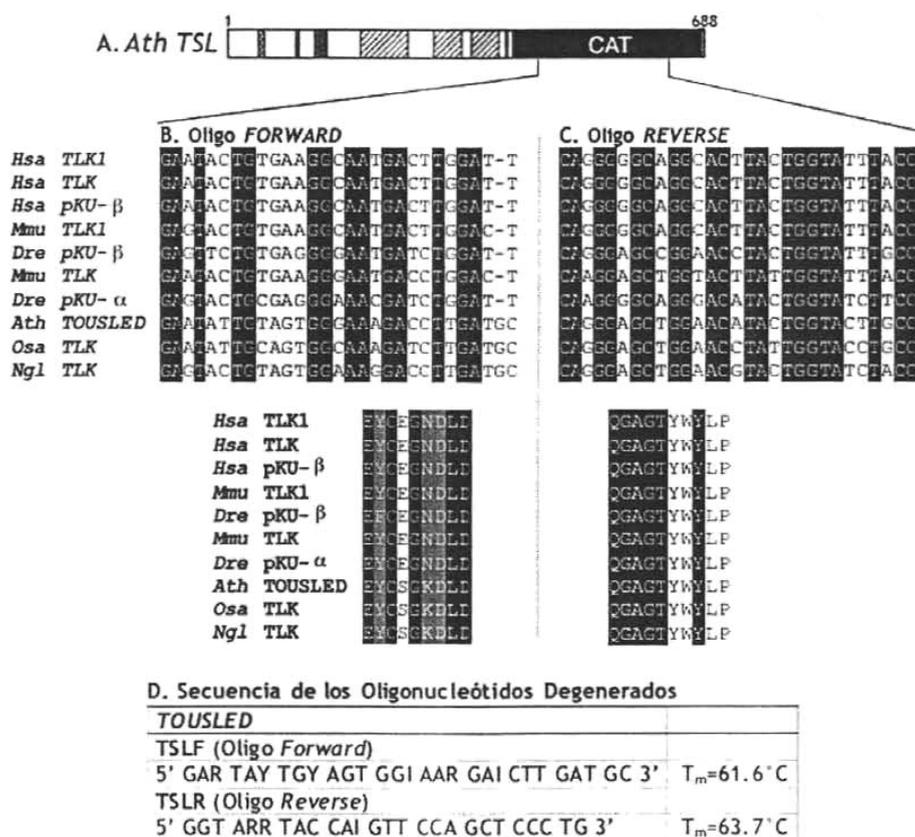


Figura 18. A. Representación esquemática del gen *TSL* de *A. thaliana* (modificado de Silljé *et al.*, 1999) y el alineamiento de las secuencias de nucleótidos encontradas en el GenBank y utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos degenerados. CAT representa al dominio catalítico de la proteína. B. Zona correspondiente al oligo *forward*, C. Zona correspondiente al oligo *reverse*. En ambos oligonucleótidos, las degeneraciones fueron elegidas dando mayor peso a las secuencias de plantas. En negro se encuentran los nucleótidos conservados en todas las secuencias. Los huecos en los alineamientos son indicadas por guiones. D. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados diseñados y su temperatura óptima de alineamiento (T_m).

AMPLIFICACIÓN DE *OstTSL* σ^7 Y *OstTSL* σ^8 POR PCR

La clonación de fragmentos ortólogos al gen *TSL* en *O. stenopetala* se realizó a partir de DNA y de RNA, los resultados se presentan por separado.

- **Secuencias provenientes de RNA**

Debido a que solo se clonó un segmento de DNA que codifica al dominio de cinasa de TSL, y a que el cDNA de TSL en *A. thaliana* es de aproximadamente 2.0 Kpb, se buscó un tejido de *O. stenopetala* donde se expresara el gen y que no presentara problemas para la extracción de RNA total.

Con los protocolos ensayados para la purificación de RNA no fue posible recuperar RNA total del estilo/estigma debido a la gran cantidad de pectinas que contienen. Este no fue el caso para la purificación de RNA de los estambres de *O. stenopetala* de flores masculinas y de flores femeninas, lo cual fue útil para clonar un cDNA de TSL en *O. stenopetala*, ya que los reportes indican que los patrones de expresión de este gen no se limitan al gineceo, sino que se expresa en todos los órganos de las plantas.

Se logró extraer RNA total de estambres tanto de flores masculinas como de flores femeninas utilizando el método anteriormente descrito (Fig. 19A) y con él se realizaron reacciones de RT-PCR. Tanto con RNA de las flores femeninas y el RNA de las masculinas se observó un producto de amplificación de aproximadamente 300 pb (Fig. 19B). El fragmento proveniente de RNA de flores masculinas se denominó cDNA $OstTSL\sigma$, mientras que el proveniente de RNA de flores femeninas cDNA $OstTSL\varphi$. Es de notarse, que existe mayor cantidad de molde en la reacción con cDNA femenino que en la reacción de cDNA masculino, sin embargo, el producto de amplificación es de mayor intensidad en la reacción con cDNA masculino. Aunque con este resultado no se puede asegurar, es probable que exista expresión diferencial a nivel de estambres masculinos y estambres femeninos. Esto nos lleva a pensar que probablemente algo similar ocurra en los estilos de *O. stenopetala*, de modo que se esté afectando el desarrollo del gineceo.

- **Secuencias provenientes de DNA**

Para amplificar por PCR un DNA ortólogo a TSL de *A. thaliana* en *O. stenopetala*, se utilizó como templado una mezcla de DNA que contenía un μg de DNA de cada uno de los 30 individuos masculinos, y otra mezcla con un μg de cada uno de los 30 individuos femeninos. El resultado de la amplificación fue un fragmento de tamaño aproximado de 300 pb (Fig. 19C) tanto en la reacción con DNA femenino como en la reacción con DNA masculino.

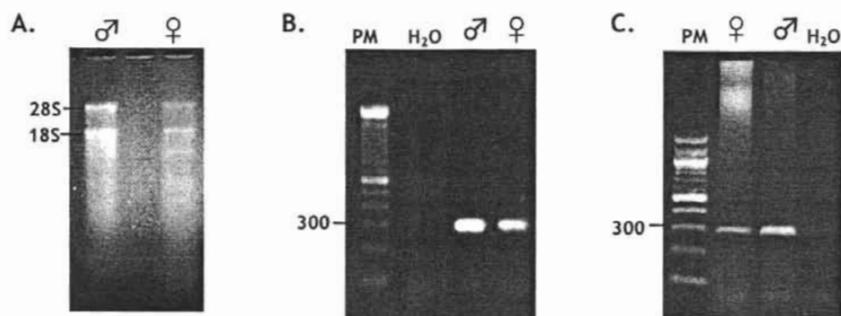


Figura 19. A. RNA total de estambres de flores masculinas (σ) y de flores femeninas (φ) de *O. stenopetalis*. Las subunidades 28S y 18S demuestran la integridad del RNA. Electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. B. Separación electroforética del producto de PCR correspondiente a un fragmento del gen *TSL* de *O. stenopetalis*, usando como molde cDNA σ o cDNA φ . C. Productos de PCR utilizando como molde DNA genómico de plantas masculinas o femeninas. En ambos casos gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PM= peso molecular en pares de bases. H₂O representa a la reacción sin molde (control).

Todos los fragmentos fueron purificados del gel, ligados al vector pGEM-t-Easy para transformar células de *E. coli*. Se purificaron los plásmidos recombinantes (Figs. 20A y 20B) y fueron secuenciados, las secuencias obtenidas (OstTSL σ y OstTSL φ) fueron comparadas en la base de datos del GenBank (BLAST).

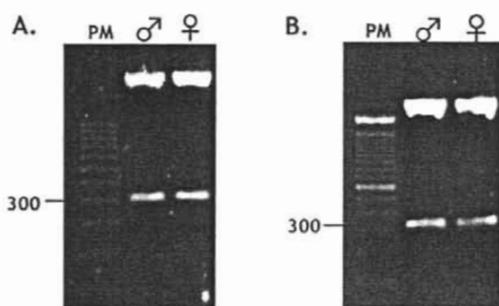


Figura 20. Digestión con la enzima de restricción *EcoRI* de los plásmidos de pGEM-t-Easy que contienen el DNA de interés, en todos los casos el tamaño corresponde con el esperado (300 pb). En A. el fragmento de DNA liberado corresponde al amplificado con el molde de DNA genómico masculino (σ) o femenino (φ), mientras que en B. proviene del cDNA de estambres de flores masculinas (σ) o de estambres de flores femeninas (φ). En todos los casos, separación electroforética en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PM= peso molecular.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Tanto *OstTSL*♂ como *OstTSL*♀ tienen un tamaño de 288 nucleótidos y son idénticas entre sí a este nivel y por tanto, también a nivel de residuos de aminoácidos.

Entre *cDNAOstTSL*♂ y *cDNAOstTSL*♀, existe un 100% de identidad a nivel de ácidos nucleicos, en un total de 288 nucleótidos (Fig. 21) y por tanto también a nivel de residuos de aminoácidos (Fig. 22). De este modo y dado que las secuencias *OstTSL*♂ como *OstTSL*♀ son idénticas a *cDNAOstTSL*♂ y *cDNAOstTSL*♀ para los siguientes análisis se les considera como una sola secuencia denominada *OstTSL*. El poder obtener la clonación del fragmento a partir de cDNA resulta muy satisfactorio ya que abre la posibilidad de la clonación del gen completo de *TSL* en *O. stenopetala*.

El porcentaje de identidad de *OstTSL* con la secuencia reportada de *TSL* de *A. thaliana* a nivel de ácidos nucleicos es de 77% y de un 87.5% a nivel de residuos de aminoácidos.

A continuación, las secuencias *TSL* de *O. stenopetala* fueron alineadas con las secuencias de *A. thaliana* (*Ath TOUSLED*) y con otras secuencias reportadas de genes ortólogos en distintas especies de plantas como son: *Oriza sativa* (*Osa TLK*), *N. glutinosa* (*Ngl TLK*) y *Zea mays* (*Tae TLK*) a nivel de ácidos nucleicos y aminoácidos, sólo de aminoácidos: *Zea mays* (*ZmaTLK1* y *ZmaTLK4*) y secuencias pertenecientes a animales como: *Danio rerio* (*Dre pKU-α* y *Dre pKU-β*), *M. Musculus* (*Mmu TLK* y *Mmu TLK1*), *Homo sapiens* (*Hsa TLK1*, *Hsa TLK2*, *Hsa pKU-α* y *Hsa pKU-β*), *C. elegans* (*Cel TLK*) y *D. melanogaster* (*Dmel TLK*).

Es notable el grado de conservación que se encuentra dentro de las secuencias pertenecientes a animales y plantas a lo largo del dominio catalítico de las proteínas TLK's. De un total de 101 residuos de aminoácidos, se presenta un 48% de identidad y un 65% de similitud. Al comparar las secuencias de aminoácidos provenientes de plantas y de animales por separado, observamos que entre plantas el porcentaje de identidad se incrementa al 79% y el de similitud a 88%. De igual forma ocurre con los huecos que se forman en el alineamiento, los cuales son consecuencia de la presencia de un grupo de aminoácidos que se presenta en las secuencias de los animales, pero que no se localiza en ninguna de las secuencias de las plantas analizadas (Fig. 22).

<i>Ath</i> TOUSLED	GATGCTGATTAAGGCAACATCTAATCTTCCTGAGAAAGAAAGCAAGGAT
<i>Osa</i> TLK	GATGCAGTCCITAAAGCAACACCAGTCTTCCAGAAAGGAAGCGAGAAT
<i>Ost</i> TSL ♀	GATGCAGTCTGAAAGCAACACCAGTATATCAGAGAGGAAGCAAGGAT
<i>Ost</i> TSL ♂	GATGGAGTCTGAAAGCAACACCAGTATATCAGAGAGGAAGCAAGGAT
cDNA <i>Ost</i> TSL ♀	GATGCAGTCTGAAAGCAACACCAGTATATCAGAGAGGAAGCAAGGAT
cDNA <i>Ost</i> TSL ♂	GATGCAGTCTGAAAGCAACACCAGTATATCAGAGAGGAAGCAAGGAT
<i>Tae</i> TLK	GATGCAGTCCITAAAGCAACACCAGTCTTCCAGAAAGGAAGCAAGGAT
<i>Ngl</i> TLK	GATGCAGTCTCAAAGCAACACCAGTGTGTCAGAAAGGAAGCAAGGAT
<i>Ath</i> TOUSLED	TATCATTTGCCAAATAGTTCAAGCCCTTSTATACTCGAACAAAGATGAC
<i>Osa</i> TLK	CATAATTGTCCAAATATTTCAAGCCCTASTTTATCTTACAAAGAGAAATC
<i>Ost</i> TSL ♀	AATTATTGTGCAGATATTTCAAGCCCTTSTTTACTTGANTAAGGAAACAC
<i>Ost</i> TSL ♂	AATTATTGTGCAGATATTTCAAGCCCTTSTTTACTTGANTAAGGAAACAC
cDNA <i>Ost</i> TSL ♀	AATTATTGTGCAGATATTTCAAGCCCTTSTTTACTTGANTAAGGAAACAC
cDNA <i>Ost</i> TSL ♂	AATTATTGTGCAGATATTTCAAGCCCTTSTTTACTTGANTAAGGAAACAC
<i>Tae</i> TLK	CATAATTGTTCAAGTGTTCAGCCCTTSTTTATCTTACAAAGAGGCTC
<i>Ngl</i> TLK	CATCATTTGCCAGATTTTCAAGCCCTTCTACTTGANTAAGAGTGCAC
<i>Ath</i> TOUSLED	AGAAAGATTAATCACTATGATCGAAGCCCTGGTAAATGTTCTCTTTGATGAG
<i>Osa</i> TLK	AAAGAGCATTACTACTATGATCGAAACAGGCCAATGTCTCTTCGATGAG
<i>Ost</i> TSL ♀	AGAAAATTAATCATTATGATCGAAGCCCGCCAACCTGCTTTTCGATGAG
<i>Ost</i> TSL ♂	AGAAAATTAATCATTATGATCGAAGCCCGCCAACCTGCTTTTCGATGAG
cDNA <i>Ost</i> TSL ♀	AGAAAATTAATCATTATGATCGAAGCCCGCCAACCTGCTTTTCGATGAG
cDNA <i>Ost</i> TSL ♂	AGAAAATTAATCATTATGATCGAAGCCCGCCAACCTGCTTTTCGATGAG
<i>Tae</i> TLK	AAAGAGCATCACTATGACCTCAACAGGCCAACCTGCTCTTCGACGAA
<i>Ngl</i> TLK	AGAAAGATCATCATTATGATTCAGCCAGCCAAATGTTTATTTGATGAG
<i>Ath</i> TOUSLED	TTTGGAGTAGCAAAAGTAACTEATTTTGGCTTAGCAAAGATAGTGGAGGA
<i>Osa</i> TLK	GTTGGTGTGCAAAAGTACAAACTTTGGCCCTCAGCAAAGATAGTGGAGGA
<i>Ost</i> TSL ♀	CTCGGAGTAGCTAAATGACGGAATTTGGCCCTGAGTAAAATAGTAGAGGA
<i>Ost</i> TSL ♂	CTCGGAGTAGCTAAATGACGGAATTTGGCCCTGAGTAAAATAGTAGAGGA
cDNA <i>Ost</i> TSL ♀	CTCGGAGTAGCTAAATGACGGAATTTGGCCCTGAGTAAAATAGTAGAGGA
cDNA <i>Ost</i> TSL ♂	CTCGGAGTAGCTAAATGACGGAATTTGGCCCTGAGTAAAATAGTAGAGGA
<i>Tae</i> TLK	GTTGGTGTACAAAAGTCAAAEACTTTGGCCCTCAGCAAAGATAGTGGAGGA
<i>Ngl</i> TLK	TTTGGCAATGCTAAGGTCAGTGAATTTGGCCCTTAGCAAAGATAGTGGAGGA
<i>Ath</i> TOUSLED	CAATGTTGGTCTCAAAGCAATGGACCTTACATCACAGGGAGCTGGAAC
<i>Osa</i> TLK	TGATGTTGGGTCTCAGGCAATGGAACTGACTTCTCAGGGAGCTGGAAC
<i>Ost</i> TSL ♀	GGATGTTGGATCGCAGGCCATGGACCTTACTTCCAGGGAGCTGGAAC
<i>Ost</i> TSL ♂	GGATGTTGGATCGCAGGCCATGGACCTTACTTCCAGGGAGCTGGAAC
cDNA <i>Ost</i> TSL ♀	GGATGTTGGATCGCAGGCCATGGACCTTACTTCCAGGGAGCTGGAAC
cDNA <i>Ost</i> TSL ♂	GGATGTTGGATCGCAGGCCATGGACCTTACTTCCAGGGAGCTGGAAC
<i>Tae</i> TLK	TGATGTTGGGTCTCAGGCAATGGAACTGACTTCTCAGGGAGCTGGAAC
<i>Ngl</i> TLK	TGATGTTGGATCCAGGCGATGGACCTTACATCCAGGGAGCTGGAAC

Figura 21. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de *OstTSL* de *O. stenopetala* con las secuencias de ortólogos al gen *TSL* reportadas para plantas. En negro se muestran los nucleótidos idénticos en todas las secuencias. Las TLK's representadas son: *A. thaliana* (*Ath* TOUSLED), *N. glutinosa* (*Ngl* TLK), arroz (*Osa* TLK), maíz (*Zma* TLK1 y *Zma* TLK4) y trigo (*Tae* TLK). Los huecos en el alineamiento están referidos con guiones.

<i>Cel</i> TLK	LDFFYLKQNRSSISEKEARSIIIMQVVSALVYLNKSTPTIHYDLKPE
<i>Mmu</i> TLK	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Dre</i> pKU- α	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQVVMALKYLNIEIRPPTIHYDLKPE
<i>Hsa</i> TLK	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Dmel</i> TLK	LDFFYLKQHKTIPEEREARSIIIMQVVSALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Mmu</i> TLK1	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Hsa</i> TLK1	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Dre</i> pKU- β	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Hsa</i> pKU- β	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Hsa</i> pKU- α	LDFFYLKQHKLMSEKEARSIIIMQIVNALKYLNIEIKPPTIHYDLKPE
<i>Ath</i> TOUSLED	LDVAVLKATSNLPEKEARIILIVQIVQGLIVYLNKKSQKTIHYDLKPE
<i>Ngl</i> TLK	LDVAVLKATPVLPEKEARIILIVQIFQGLIVYLNKKSQKTIHYDLKPE
<i>cdNAOst</i> TSL σ	LDVAVLKATPVLSEKEAFIILIVQIFQGLIVYLNKRTQKTIHYDLKPE
<i>cdNAOst</i> TSL ϕ	LDVAVLKATPVLSEKEAFIILIVQIFQGLIVYLNKRTQKTIHYDLKPE
<i>Ost</i> TSL σ	LDVAVLKATPVLSEKEAFIILIVQIFQGLIVYLNKRTQKTIHYDLKPE
<i>Ost</i> TSL ϕ	LDVAVLKATPVLSEKEAFIILIVQIFQGLIVYLNKRTQKTIHYDLKPE
<i>Tae</i> TLK	LDVAVLKATPILPEKEARIILIVQVDFQGLIVYLNKKAQKTIHYDLKPE
<i>Zma</i> TLK4	LDVAVLKATPILPEKEARIILIVQVDFQGLIVYLNKRGQKTIHYDLKPE
<i>Zma</i> TLK1	LDVAVLKATPILPEKEARIILIVQVDFQGLIVYLNKRGQKTIHYDLKPE
<i>Osa</i> TLK	LDVAVLKATPILPEKEARIILIVQVDFQGLIVYLNKRTQKTIHYDLKPE
<i>Cel</i> TLK	ANILLPSGNTSIAIKITDFGLSKIMEGESDDHDLGIELTSQGAGI
<i>Mmu</i> TLK	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYNSVDGMEELTSQGAGI
<i>Dre</i> pKU- α	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDNYG-VDCMELTSQGAGI
<i>Hsa</i> TLK	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYG-VDCMELTSQGAGI
<i>Dmel</i> TLK	GNILLTEGNVCEIKITDFGLSKVMDDENYNPDHGMELTSQGAGI
<i>Mmu</i> TLK1	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYG-VDCMELTSQGAGI
<i>Hsa</i> TLK1	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYG-VDCMELTSQGAGI
<i>Dre</i> pKU- β	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYG-VDCMELTSQGAGI
<i>Hsa</i> pKU- β	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYG-VDCMELTSQGAGI
<i>Hsa</i> pKU- α	GNILLVNGTACEIKITDFGLSKIMDDDSYNSVDGMEELTSQGAGI
<i>Ath</i> TOUSLED	GNVLEDE---FVAKVDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Ngl</i> TLK	GNVLEDE---FCIAKVDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>cdNAOst</i> TSL σ	GNVLEDE---LVAKLDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>cdNAOst</i> TSL ϕ	GNVLEDE---LVAKLDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Ost</i> TSL σ	GNVLEDE---LVAKLDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Ost</i> TSL ϕ	GNVLEDE---LVAKLDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Tae</i> TLK	GNVLEDE---VQVTKVDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Zma</i> TLK4	GNVLEDE---VQVAKVDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Zma</i> TLK1	GNVLEDE---VQVAKVDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI
<i>Osa</i> TLK	GNVLEDE---VQVAKVDFGLSKIVEEDVGS--QGMELTSQGAGI

Figura 22. Alineamiento de las proteínas putativas de *O. stenopetala* con los fragmentos correspondientes al dominio catalítico de proteínas homólogas a TSL de *A. thaliana*. En negro se encuentran los residuos idénticos en todas las secuencias y en gris aquellos residuos que forman grupos con características similares. Los huecos en el alineamiento están indicadas con guiones. Los nombres de las secuencias pertenecen a humano (*Hsa* TLK1, *Hsa* TLK, *Hsa* pKU- α y *Hsa* pKU- β), ratón (*Mmu* TLK y *Mmu* TLK1), pez cebra (*Dre* pKU- α y *Dre* pKU- β), mosca de la fruta (*Dmel* TLK), *C. elegans* (*Cel* TLK), *A. thaliana* (*Ath* TOUSLED), *N. glutinosa* (*Ngl* TLK), arroz (*Osa* TLK), maíz (*Zma* TLK1 y *Zma* TLK4) y trigo (*Tae* TLK).

Con el propósito de encontrar la especie cuya secuencia tuviera mayor similitud a las secuencias de *O. stenopetala*, se decidió realizar un análisis filogenético con las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de las proteínas TLK's pertenecientes tanto a especies vegetales y animales (Fig. 23). En él se observa claramente una separación de las secuencias correspondientes a plantas de las que corresponden a animales. Dentro del grupo que forman las secuencias de plantas, se observa que las secuencias de maíz, trigo y la de arroz forman un grupo, mientras que las secuencias de *A. thaliana* y la de *N. glutinosa* se localizan en la base de la ramificación. Las secuencias de *O. stenopetala* se agrupó con las secuencias de maíz, trigo y de arroz, indicando que el parecido de las secuencias de estas especies es mayor que con las secuencias de *A. thaliana* y *N. glutinosa*.

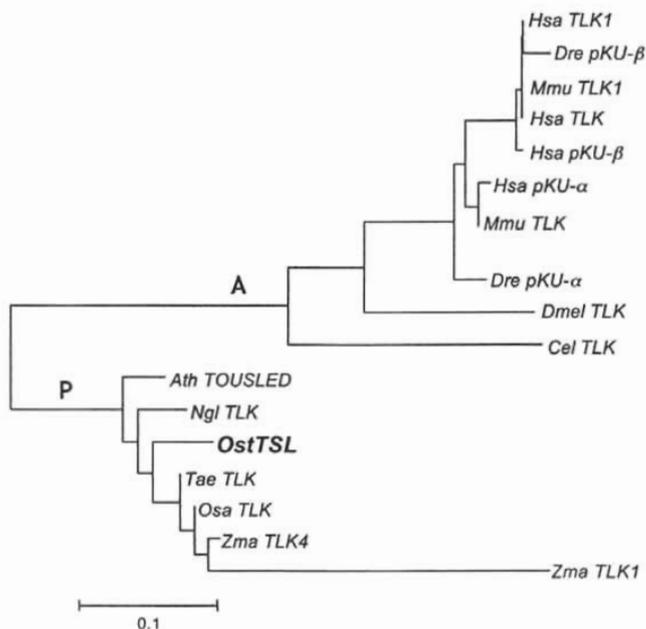


Figura 23. Árbol filogenético de los fragmentos correspondientes a los dominios de cinasa de las proteínas homólogas a TSL de *A. thaliana*. Secuencias pertenecientes a plantas (P) son agrupadas aparte de las pertenecientes a animales (A). La secuencia de *O. stenopetala* (*OstTSL*) tiene mayor parecido con las secuencias de trigo, arroz y maíz. Las TLK's representadas son: de humano (*Hsa TLK1*, *Hsa TLK*, *Hsa pKU-α* y *Hsa pKU-β*), de ratón (*Mmu TLK* y *MmuTLK1*), del pez cebra (*Dre pKU-α* y *Dre pKU-β*), de la mosca de la fruta (*Dmel TLK*) de *C. elegans* (*Cel TLK*), *A. thaliana* (*Ath TOUSLED*), *N. glutinosa* (*Ngl TLK*), arroz (*Osa TLK*), maíz (*Zma TLK1* y *Zma TLK4*) y trigo (*Tae TLK*).

La separación de las secuencias TLK's de animales y plantas utilizando el dominio catalítico, también se presenta cuando el mismo análisis se realiza con las secuencias completas disponibles (Fig. 24). Lamentablemente, no se conocen las secuencias completas de maíz ni las de *O. stenopetala*, así que no se muestran en el árbol; sin embargo, aún cuando se incluyan estos fragmentos en este análisis, el resultado es el mismo. Las secuencias de trigo y de arroz se mantienen agrupadas de la misma manera que en el análisis de los dominios catalíticos, por lo que es posible que la secuencia completa de *OstTSL* también se agrupe como estas proteínas.

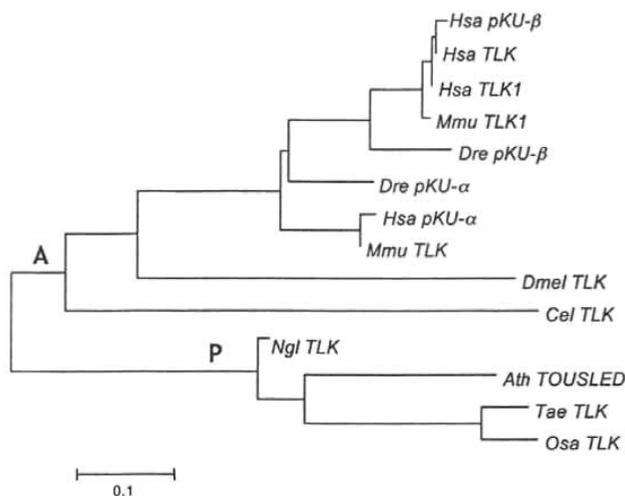


Figura 24. Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos completas de TLK's de animales y plantas. Se muestra el mismo patrón de agrupamiento que el árbol filogenético de los fragmentos de los dominios catalíticos, es decir, secuencias provenientes de animales (A) son separadas de las provenientes de plantas (P). Las TLK's representadas son: de humano (*Hsa* TLK1, *Hsa* TLK, *Hsa* pKU- α y *Hsa* pKU- β), de ratón (*Mmu* TLK y *Mmu*TLK1), del pez cebra (*Dre* pKU- α y *Dre* pKU- β), de la mosca de la fruta (*Dmel* TLK) de *C. elegans* (*Cel* TLK), *A. thaliana* (*Ath* TOUSLED), *N. glutinosa* (*Ngl* TLK), arroz (*Osa* TLK) y trigo (*Tae* TLK).

Puesto que las secuencias de plantas muestran muchas similitudes entre sí, se intentó clonar un fragmento de mayor tamaño en *O. stenopetala*, para ello se diseñaron nuevos oligonucleótidos y se realizaron reacciones de PCR usando como molde el DNA de plantas masculinas y femeninas. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de una región de aproximadamente 700 pares de bases del gen *TSL* de *A. thaliana*. Sin embargo, no hubo amplificación a partir del DNA total de *O. stenopetala*, por lo que se decidió realizar combinaciones de oligonucleótidos: para una reacción se utilizaron uno de los utilizados *forward* para amplificar el fragmento de aproximadamente 300 pares de bases con el

oligo *reverse* destinado a amplificar el fragmento de 700 pares de bases y en otra reacción a la inversa. Tampoco en esta ocasión se obtuvo ningún producto de amplificación. Estos resultados se pueden explicar de la siguiente forma: la primera supone un mal funcionamiento de los oligonucleótidos en las reacciones de amplificación debido a un mal diseño, la segunda es que no existieran zonas similares en el genoma de *O. stenopetala* con las cuales pudieran alinear estos oligonucleótidos y empezar las reacciones de amplificación y por último, que el producto a ser amplificado tenga un tamaño demasiado amplio debido a la existencia de uno o varios intrones y que la *Taq* polimerasa utilizada no pueda llevar a cabo la reacción por su baja procesividad. Para descartar el primer supuesto se realizaron amplificaciones por PCR usando como molde cDNA de botón floral de *A. thaliana*, el resultado fue un producto amplificado de 690 pares de bases, el cual se clonó y secuenció. La secuencia de este producto de PCR fue esencialmente la misma que la reportada en la base de datos para *TSL* de *A. thaliana* (Fig. 25).

```

TCONSLED          GTCAGTGGAGTGAAGAAAGAAAGCAAAGTTACATCCGCCATGCCACACAGGGAATGTGAGT
AthTSL-700        GTCAGTGGAGTGAAGAAAGAAAGCAAAGTTACATCCGCCATGCCACACAGGGAATGTGAGT

TCONSLED          TCCATAAAAAGTCTTGTGCATCACCACATTTGTCGGCTTGGGATAAATTCATATCGACAT
AthTSL-700        TCCATAAAAAGTCTTGTGCATCACCACATTTGTCGGCTTGGGATAAATTCATATCGACAT

TCONSLED          GCATACATTCGACCCGTTCTGGAAATATTGTAGTGGAAAGACCTTGATGCTGTATTAAAC
AthTSL-700        GCATACATTCGACCCGTTCTGGAAATATTGTAGTGGAAAGACCTTGATGCTGTATTAAAC

TCONSLED          GCAACATCTAATCTCTCTGAGAAAGAAGCAAGGATATCATTTGTGCANAATAGTTCAGGGCT
AthTSL-700        GCAACATCTAATCTCTCTGAGAAAGAAGCAAGGATATCATTTGTGCANAATAGTTCAGGGCT

TCONSLED          TTGTATATCTGAACAAAAGTCCACAGAAGATAATCCACTATGATCTGAAGCCTGGTAATGT
AthTSL-700        TTGTATATCTGAACAAAAGTCCACAGAAGATAATCCACTATGATCTGAAGCCTGGTAATGT

TCONSLED          TTCCTTTGATGAGTTTGGAGTAGCAAAAAGTAAGTCACTGATTTTGGTCTAAGCAAGATAGTGGAC
AthTSL-700        TTCCTTTGATGAGTTTGGAGTAGCAAAAAGTAAGTCACTGATTTTGGTCTAAGCAAGATAGTGGAC

TCONSLED          CACAAATGTTGGTTCTCAAGGAATGGAGCTTACATCACAGGGAGCTGGAACATACTGGTACT
AthTSL-700        CACAAATGTTGGTTCTCAAGGAATGGAGCTTACATCACAGGGAGCTGGAACATACTGGTACT

TCONSLED          TGCCCCCAGAATGCTTTGAGCTTAACAAAACCTCCTATGATCTCATCAAAAGGTTGATGTATG
AthTSL-700        TGCCCCCAGAATGCTTTGAGCTTAACAAAACCTCCTATGATCTCATCAAAAGGTTGATGTATG

TCONSLED          GTGAGTTGGTGTGTTGGTTTACCAAATGCTGTTTGGAAAGCGACCTTTGGACATGACCAAT
AthTSL-700        GTGAGTTGGTGTGTTGGTTTACCAAATGCTGTTTGGAAAGCGACCTTTGGACATGACCAAT

TCONSLED          AGCCAAGAACCGATACTAAGAGAAGACACAAATCATTAAAGCCAAAAGGTTGACTTCCCAG
AthTSL-700        AGCCAAGAACCGATACTAAGAGAAGACACAAATCATTAAAGCCAAAAGGTTGACTTCCCAG

TCONSLED          TAAACAAGACCTGCATCTCAAATGAAGCGAAGGATTTGATTCGACGGTGTCTAACATATAA
AthTSL-700        TAAACAAGACCTGCATCTCAAATGAAGCGAAGGATTTGATTCGACGGTGTCTAACATATAA

```

Figura 25. Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia parcial de *TSL* generada con los oligonucleótidos *TSL*_{700F} y *TSL*_{700R} utilizando como molde cDNA de botón floral de *A. thaliana*. Ambos fragmentos son prácticamente idénticos. En negro se muestran los nucleótidos completamente conservados en ambas secuencias. Este fragmento del gen corresponde a casi la totalidad del dominio catalítico de la cinasa *TSL*.

La secuencia de *AthTSL-700*, sólo presenta 2 cambios de nucleótidos con la secuencia reportada de *TSL*. Este resultado lleva a la conclusión de que el funcionamiento de los oligonucleótidos es correcto y que las zonas utilizadas para diseñar los oligonucleótidos (conservadas en las secuencias de plantas), podrían ser diferentes a las de *O. stenopetala*.

AMPLIFICACIONES POR PCR INDIVIDUALES

Para evaluar la presencia/ausencia de *OstTSL* en individuos de una población natural se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde DNA individual de 30 plantas masculinas y de 30 plantas femeninas (Fig. 26).

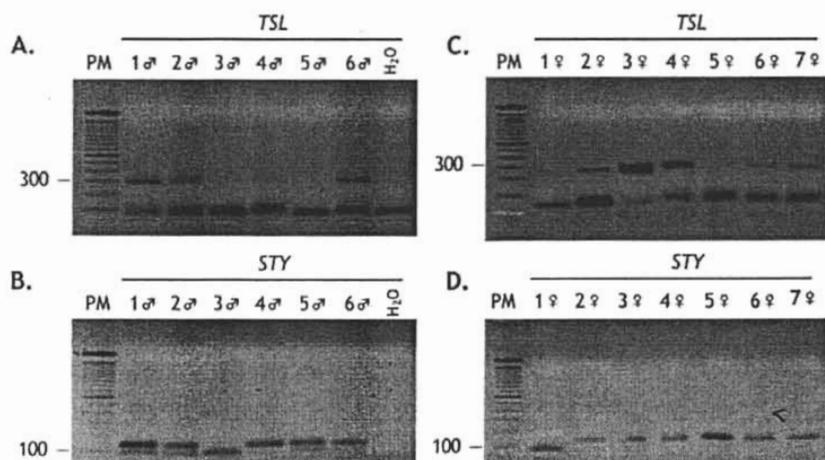


Figura 26. Reacciones de PCR individuales para 30 individuos masculinos y 30 individuos femeninos de *O. stenopetala* (sólo se muestran 6 masculinos y 7 femeninos). En A. se observa un producto de amplificación en 4 de las 6 muestras masculinas mostradas (1♂, 2♂, 4♂ y 6♂) con un tamaño de 300 pb. B. El DNA de los mismos 6 individuos masculinos produce un producto de amplificación cuando se utilizan los oligonucleótidos de *STY* de aproximadamente 100 pb. En el caso del DNA de los individuos femeninos. C. En 4 de las 7 muestras se sintetiza un producto amplificado de ~300 pb (2♀, 3♀, 4♀, 6♀ y 7♀). Las dos muestras que no producen amplificado (1♀ y 5♀) con *TSL*, si lo producen cuando se utilizan los oligonucleótidos de *STY*. D. El producto de ~100 pb está presente en todas las muestras femeninas. En todos los casos, se muestran separaciones electroforéticas de las reacciones de PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

De los 30 individuos masculinos, en 17 de ellos se sintetizó un producto de amplificación de *OstTSL*, mientras que en los individuos femeninos el número fue de 23. Este no fue el caso de *OstSTY*, ya que todos los individuos masculinos y femeninos presentan

amplificación para este gen. Es notable que en algunos individuos masculinos y femeninos no fue posible amplificar un producto de PCR, esto podría deberse en primera instancia a una mala calidad del templado utilizado; sin embargo, al amplificarse en todos los individuos el producto de *OstSTY* es indicativo de una buena calidad del DNA, por lo que dicha situación se vuelve poco probable .

Para confirmar la presencia de *OstTSL* en el genoma de *O. stenopetala*, se realizó un ensayo tipo Southern-Blot, en el que se utilizaron 10 µg de DNA digerido con *EcoRI* de una mezcla de DNA de 30 individuos femeninos y de la mezcla de 30 masculinos. Como sonda de DNA se utilizó el fragmento amplificado de *OstTSL* ♀ marcada con $^{32}\text{P}[\text{dCTP}]$. En la Fig. 27 se observa que la sonda hibridó con un fragmento de DNA de aproximadamente 2.0 Kpb tanto en plantas masculinas como en femeninas. Este resultado sugiere que *OstTSL* es de copia única en el genoma de *O. stenopetala*.



Figura 27. Southern Blot de *OstTSL*. La hibridación más clara se produce con un fragmento proveniente del genoma masculino (♂) de aproximadamente 2 kilobases. La hibridación de la sonda en el genoma femenino (♀) no es clara probablemente a que no es específica. Aunque este resultado no pudo mejorarse, es claro que en el genoma de las plantas masculinas sólo existe una copia del gen *OstTSL*.

DISCUSIÓN

ESTRUCTURA DEL ESTILO/ESTIGMA EN *O. stenopetala*

Los procesos de diferenciación sexual conllevan a cambios anatómicos y estructurales en las flores femeninas y masculinas en *O. stenopetala*. En etapa de anthesis, son notorios los cambios morfológicos a simple vista. El gineceo de las flores femeninas está compuesto de ovario, con múltiples óvulos funcionales, estilo y lóbulos estigmáticos con múltiples papilas estigmáticas. Por otro lado, el gineceo de las flores masculinas presenta un ovario reducido en el cual pueden existir algunos óvulos escasamente desarrollados, y el estilo termina en punta debido a la carencia de tejido estigmático (Orozco, 2002). Sin embargo, los estudios en los cuales se aborda el desarrollo del gineceo, incluso aquellos realizados en especies con flores unisexuales, han enfocado su atención a los óvulos únicamente y han dejado de lado al estilo y al estigma.

En *O. stenopetala* existen marcadas diferencias estructurales entre el estilo/estigma de las flores masculinas y el de las flores femeninas. Las más evidentes se relacionan con la no diferenciación estigmática en flores masculinas, las características del canal estilar al centro del estilo, la cantidad de tejido de transmisión, el número de células mucilaginosas y los haces vasculares.

Hasta el momento el único reporte estructural completo del estilo-estigma de alguna cactácea hermafrodita que nos permita realizar un análisis comparativo, es el realizado por Parada (2004) en *Mammillaria san-angelensis* y *M. haageana*. Estas dos especies presentan un canal estilar muy evidente hacia la región estigmática, el cual paulatinamente disminuye su tamaño de modo que en la región media el estilo es completamente sólido y continúa así hasta la base del estilo.

Existen dos reportes más en los que se mencionan la estructura del estilo y del estigma. El primero se presenta en Mauseth (1988) y es únicamente un corte transversal de estilo de la cactácea *Homalocephala texensis*. En él se encuentra la presencia de un canal estilar de pequeñas dimensiones. Alrededor de él se encuentra el tejido de transmisión, el cual se compone de una epidermis interna (la cual se proyecta hacia el canal estilar) y varias capas adyacentes de mesófilo (córte). Las tres cactáceas anteriores son hermafroditas y aunque pertenecen a una subfamilia diferente (Cactoideae) a la que pertenece *O. stenopetala* (Opuntioideae), algunas de las características estructurales de los estilos se observan en *O. stenopetala*.

El segundo reporte resulta de mayor interés ya que se trata de una cactácea trioica: *Consolea spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002), que además pertenece a la misma subfamilia (Opuntioideae) que *O. stenopetala*. En él se reportan tres morfos sexuales, femenino, masculino y hermafrodita, los tres presentan estigma pentalobulado y en un corte transversal el estilo se compone de epidermis externa, córtex (formado de parénquima), cinco haces vasculares, tejido de transmisión, células mucilaginosas y un canal estilar rodeado de un estrato epidérmico glandular. Los autores mencionan que el estilo es de tipo semisólido (Strittmatter *et al.*, 2002). Lamentablemente, no se reporta a que nivel del estilo se realizó este corte y es el único de estilo que presentan.

En todas estas especies se reporta la presencia de un canal estilar, el cual varía dependiendo de la región del estilo que se analiza. En *M. san-angelensis* y *M. haageana* se localiza sólo en el ápice del estilo y desaparece hacia la base (Parada, 2004). En el estilo de las flores femeninas de *O. stenopetala* ocurre algo similar, en la parte apical y media, el canal estilar se encuentra más abierto que en la parte basal, donde casi se encuentra completamente cerrado pero aún está presente. En el estilodio de las flores masculinas, el espacio generado por el canal estilar es mínimo y así permanece a lo largo de esta estructura.

En la parte media y basal del estilo de *M. san-angelensis*, *M. haageana* (Parada, 2004) y en *H. texensis* (Mauseth, 1988) se reporta la presencia de tejido de transmisión, además de que los haces vasculares se encuentran inmersos en el córtex. Estas mismas características se encuentran en los estilos femeninos y estilodios masculinos de *O. stenopetala*.

El estilo que se presenta en los tres morfos sexuales de *C. spinosissima* resulta más parecido estructuralmente al estilo de las flores femeninas que al estilodio de las flores masculinas de *O. stenopetala*. En ambas, el canal estilar es evidente, hay presencia de tejido de transmisión, las células mucilaginosas en el córtex no son abundantes y la epidermis externa es uniestratificada. 🍏

Los haces vasculares en el estilodio de *O. stenopetala* tienen una distribución diferente a la de los haces vasculares del estilo femenino. En el estilodio se encuentran concentrados y muy cercanos al canal estilar debido a que el tejido de transmisión se encuentra reducido y a que el canal estilar está obstruido, mientras que en los estilos femeninos se encuentran dispersos en el córtex e intercalados con células mucilaginosas.

No hay alguna descripción de estilo de especies unisexuales en cactáceas, sin embargo, algunos mutantes del gineceo de *A. thaliana* mencionan cambios en los patrones del desarrollo vascular (Kuusk *et al.*, 2002; Sessions y Zambryski, 1995).

OstSTY σ^7 Y OstSTY ♀ SON GENES ORTÓLOGOS A *STY* DE *A. thaliana*

El desarrollo de las flores y de los órganos que la conforman, depende de una serie de procesos que involucran la correcta y oportuna diferenciación de tipos celulares específicos. Durante estos procesos, la participación de determinados genes, tal como los genes *STY1* y *STY2*, puede ser vital para la correcta formación y desarrollo del estilo y del estigma.

En el caso de *STY1* de *A. thaliana* provoca cambios morfológicos restringidos al gineceo, los cuales se manifiestan por una disminución en la producción de células estilares y reducción del tejido estigmático (Kuusk *et al.*, 2002).

Una situación similar, aunque con un fenotipo más dramático ocurre en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*, en las cuales hay disminución en la cantidad de tejido estilar (comparado con el gineceo de las flores femeninas), y ausencia total de tejido estigmático. Por lo que existe la posibilidad de que un gen similar a *STY1*, esté cumpliendo las mismas, o muy similares funciones en esta especie. Ésta hipótesis supone que un alelo de *OstSTY* en las plantas masculinas podría estar mutado afectando su secuencia o su nivel de expresión comparado con el alelo silvestre de *OstSTY* de las plantas femeninas; de esta manera, al estar suprimida o disminuida esta función durante el desarrollo del gineceo en las plantas masculinas de *O. stenopetala*, este alelo sería responsable, al menos parcialmente (si existieran otros genes involucrados), del fenotipo mutante.

En los genomas masculino y femenino de *O. stenopetala* se encuentran segmentos de DNA homólogos a genes miembros de la familia *SHI* de *A. thaliana*. Las proteínas codificadas por los miembros de la familia génica *SHI* están caracterizadas por la presencia de dos dominios conservados: un dominio dedos de zinc localizado hacia el extremo amino terminal, y hacia el extremo carboxilo terminal un dominio IGGH de función desconocida. La secuencia de dedos de zinc es similar a la del dominio anillo dedo de zinc, otro dominio de unión a zinc, el cual facilita las interacciones proteína-

proteína y ha sido encontrada en proteínas que intervienen en la transferencia de ubiquitina a proteínas blanco y durante la represión transcripcional (Borden, 2000 citado en Kuusk, 2003).

Los fragmentos de secuencias provenientes de plantas masculinas y de plantas femeninas en *O. stenopetala* son prácticamente idénticos, sólo existe una diferencia a nivel de nucleótidos que no ocasiona un cambio de residuos de aminoácidos en la cadena proteica putativa. Esta proteína tiene mucha similitud con la región de aminoácidos de los miembros de la familia de genes *SHI* de *A. thaliana* correspondiente al dominio anillo dedo de zinc. En él, se han identificado los residuos de cisteína e histidina que constituyen probables ligandos del zinc, estos residuos no se encuentran conservados en todas las secuencias pertenecientes a *A. thaliana*; sin embargo, sí se encuentran presentes en los genes que se ha demostrado que se expresan en las partes apicales del gineceo en desarrollo: *STY1*, *STY2* (Kuusk *et al.*, 2002), *SHI* y *SRS5* (Kuusk, 2003); y también se conservan en la secuencias de arroz (*LRP Osa*), jitomate (*SRS Les*) y de *O. stenopetala* (*Ost STY♀* y *Ost STY♂*).

El grado de conservación existente en las secuencias del dominio, es reflejo de la baja tasa de mutación permitida en esta región y por tanto de la importancia de la zona para la función de ésta proteína. Este dominio hace suponer que estas proteínas están relacionadas en la regulación de las interacciones proteína-proteína con numerosas proteínas no relacionadas (Kuusk *et al.*, 2002).

Genes ortólogos a los genes de la familia *SHI* sólo se han identificado en especies de plantas como jitomate, soya, alfalfa, girasol, arroz y recientemente en el musgo *Physcomitrella*, pero no en sistemas animales, lo cual sugiere que es una clase de genes única de plantas (Kuusk, 2003). Lamentablemente, hasta el momento solo las secuencias de arroz y jitomate se encuentran disponibles en la base de datos (la de jitomate sólo está presente en forma parcial).

POSIBLE PAPEL DE *OstSTY* EN EL DESARROLLO DEL GINECEO

Las secuencias de *O. stenopetala* tienen los residuos conservados que constituyen la estructura del dominio dedos de zinc: C-X₂-C-X₇-C-X-H-X₂-C-X₂-C-X₇-C-X₂-H ó C3HC3H. Esta secuencia consenso es similar a varios otros motivos de unión a zinc como el dominio dedo de zinc RING de humanos [identificado en el gen *Really Interesting New*

Gene en humanos (secuencia consenso C-X₂-C-X₉₋₃₉-C-X₁₋₃-H-X₂₋₃-C-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂-C ó C3HC4] o el dominio dedo PHD (Plant Homeodomain) y el dominio LIM [Lin11/Isl-1/Mec-3 (ver Kuusk, 2003)]. Además, las proteínas que contienen cualquiera de estos motivos (RING, PHD o LIM) pueden participar en el control transcripcional mediante interacciones con complejos de unión a DNA, lo cual sugiere que las proteínas relacionadas a *SHI* podrían regular procesos del desarrollo mediante interacciones con factores de transcripción o complejos de ubiquitinación (Kuusk, 2003).

En el desarrollo del gineceo de *O. stenopetala*, las proteínas relacionadas con *SHI* pueden ser de gran interés dada la participación de los factores de transcripción de la familia de los genes MADS-BOX. Si bien no existen diferencias en las secuencias pertenecientes a plantas masculinas y a plantas femeninas en este dominio, es posible que cualquier otro cambio en otras partes de la secuencia masculina sí logren que la proteína producida no sea funcional. Los cambios pueden afectar la estructura tridimensional de la proteína y anular o disminuir su actividad; o bien podrían afectar las interacciones con otras proteínas, en especial con aquellos factores de transcripción involucrados en el desarrollo del gineceo.

Cabe mencionar que el único blanco de interacción de las proteínas relacionadas con *SHI* que se ha identificado, es el factor de transcripción MYB75, el cual interactúa con *STY1*. Aunque MYB75 se ha involucrado en la biosíntesis de antocianinas, la relevancia biológica de la interacción con *STY1* no ha sido dilucidada (Kuusk, 2003).

En *A. thaliana* las proteínas *STY1* y *STY2* al parecer tienen funciones redundantes, las cuales se piensa que afectan el transporte de auxinas, específicamente durante la transmisión de su señal en tejidos específicos (Kuusk *et al.*, 2002; Sohlberg *et al.*, 2003). Otra de las funciones en las que se ha propuesto que pueden estar participando *STY1* y *STY2*, es formando parte del sistema de-reprimible, que involucra la degradación proteolítica marcada por ubiquitina de uno o varios reguladores negativos de las respuestas de auxina mediada por el complejo SCF^{TR} [Skp1p/Cdc53p/Cullin/F-box protein (ver Kuusk *et al.*, 2002 y Kuusk, 2003)]. Las proteínas *STY1* y *STY2* están hipotéticamente involucradas en la regulación de las respuestas a auxina vía degradación de proteínas marcadas. La presencia de un dominio dedos de zinc con su región rica en cisteínas, es muy similar al que se presenta en proteínas asociadas a procesos de ubiquitinación (Kuusk *et al.*, 2002).

El papel de las auxinas en el desarrollo del gineceo se ha estudiado mediante la inhibición del transportador polar de auxina (PAT), la cual afecta los patrones regionales del gineceo; el ovario se reduce, la región del estilo se expande, los haces vasculares laterales terminan prematuramente y el punto de bifurcación de la vena media se recorre hacia la base (Kuusk, 2003). La baja cantidad de células estilares de las plantas *sty1-1* pueden ser reflejo de baja producción o baja acumulación de auxina en las partes apicales del gineceo, o bien de una reducción en la sensibilidad a la hormona (Kuusk *et al.*, 2002).

La morfología del gineceo de las plantas *sty1-1* probablemente resulta de la pérdida parcial del control de las divisiones celulares y/o de la expansión irregular y desorganizada de las células estilares, es decir, *STY1* contribuye a la especificación de la identidad de las células estilares, de forma redundante o en conjunto con otras proteínas (Kuusk *et al.*, 2002). En el ápice del gineceo de las plantas masculinas de *O. stenopetala* las divisiones celulares al parecer se detienen totalmente llevando con ello a la formación de un estilo incompleto y carencia de tejido estigmático, es decir, al parecer, el mal funcionamiento del gen *Ost STY* no sería suficiente para provocar los cambios morfológicos observados en *O. stenopetala*. Sin embargo, en *A. thaliana* se ha comprobado que la formación de células estilares no sólo es dependiente de la presencia de *STY1* o *STY2*, sino que también depende de otros genes que tienen funciones específicas en el estilo como *CRC* o *SPT* (Bowman y Smyth, 1999; Álvarez y Smyth, 1999) o de las interacciones existentes entre ellos.

Dado que las secuencias de *Ost STY* son iguales en el genoma masculino y en el femenino, presuponemos que las diferencias encontradas en el desarrollo del gineceo, no se deben a mutaciones localizadas en el dominio funcional del gen; sin embargo, no podemos descartar que existan mutaciones en otras partes del gen que también tienen gran relevancia, por lo que es de suma importancia obtener la secuencia completa del gen. Los genes de la familia *SH1* de *A. thaliana* tienen dos dominios conservados en todos los miembros, estos incluyen a una señal de localización nuclear y un dominio IGGH sin homologías reconocidas (Kuusk *et al.*, 2002). Si bien no se ha realizado un mapeo funcional del gen, no resulta difícil suponer que cambios drásticos de las secuencias resultarían en la falta de funcionalidad del gen.

El número limitado de blancos de los genes de identidad de los órganos florales han limitado los esfuerzos por entender cuestiones elementales en la formación de los órganos florales. Dado que todos los genes de identidad de los órganos codifican factores de transcripción, estos presumiblemente especifican los cambios morfológicos regulando la expresión de los genes blanco, que de hecho deben controlar funciones celulares básicas requeridas para los procesos de diferenciación (Zik e Irish, 2003).

OstSTY* TIENE MAYOR SIMILITUD CON *STY1* DE *A. thaliana

Basada en un análisis filogenético de la familia de genes relacionados con *SHI*, Kuusk (2003) considera como los genes ancestrales a *LRP1* y *SRS6*, dado que estos se agrupan con el homólogo del musgo *Physcomitrella* y el homólogo de arroz. Junto a estas secuencias, nosotros esperaríamos que se localizaran las secuencias de *O. stenopetala*, debido a que de inicio, pertenecen a otra especie, la cual se encuentra muy distanciada filogenéticamente de las demás especies analizadas. Sin embargo, el análisis filogenético, indica que las secuencias pertenecientes a *O. stenopetala* forman un grupo con *STY1*, *SRS8* y *SHI* de *A. thaliana* (estas secuencias forman un clado en la filogenia de Kuusk, 2003). Dado que en este análisis se consideraron únicamente los fragmentos correspondientes al dominio dedos de zinc, es probable que el agrupamiento de las secuencias de *O. stenopetala* responda al hecho de que los dominios dedos de zinc no han sido sujeto de las mismas presiones de selección a las que han sido sujeto las distintas partes de las secuencias que comprenden a esta familia de genes. Por otra parte, resulta muy interesante que *OstSTY* tenga mayor parecido con *STY1* de *A. thaliana* porque este gen tiene expresión específica en el gineceo y al parecer es el que tiene mayor participación en su desarrollo, por encima de *STY2* (Kuusk *et al.*, 2002). De esta manera, es muy probable que *OstSTY* esté cumpliendo funciones similares a *STY1* en el desarrollo del gineceo de *A. thaliana*.

El hecho de que *Ost STY*♂ y *OstSTY*♀ estén presentes en todos los individuos de *O. stenopetala* analizados, no necesariamente indica que este fragmento de DNA tenga la misma secuencia o niveles de expresión en plantas masculinas y femeninas.

NO SE ENCONTRARON GENES ORTÓLOGOS A *CRC* EN *O. stenopetala*

El gen *CRC* aparentemente controla el diámetro del gineceo y su elongación en las flores de *A. thaliana* (Álvarez y Smyth, 1999), mientras que en arroz su ortólogo, el gen *DL*, es necesario para la especificación del carpelo teniendo una contribución crucial en su especificación (Yamaguchi *et al.*, 2004).

Aunque en general los miembros de la familia de proteínas YABBY parecen estar involucrados en promover el destino celular abaxial en los órganos laterales (Siegfried *et al.*, 1999), excepto *CRC* quien además de este papel está involucrado en el desarrollo de nectarios (Álvarez y Smyth, 1999; Bowman y Smyth, 1999). Es improbable que *DL* esté involucrado en la especificación abaxial en el maíz (Yamaguchi *et al.*, 2004).

Aparentemente, los genes YABBY han adquirido una amplia diversidad de funciones durante la evolución de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Yamaguchi *et al.*, 2004), aunque en todos los casos se involucran en el desarrollo del gineceo.

El hecho de no encontrar un fragmento de DNA homólogo a *CRC* en *O. stenopetala*, probablemente se deba a que la similitud de la región elegida para amplificar (dominio dedos de zinc y el dominio hélice-asa-hélice) no sea significativa entre la secuencia de *O. stenopetala* y el resto de las secuencias tomadas como referencia.

Dado el papel preponderante que pueden llegar a tener los genes YABBY, es difícil pensar que no exista al menos un miembro en *O. stenopetala* y que esté involucrado en el desarrollo del carpelo. Sin embargo, su identificación probablemente deba comenzar a partir de los fragmentos de secuencia que se encuentren más conservados en distintas especies, aunque el tamaño de dicho fragmento seguramente será pequeño. Para lograrlo, quizá sea necesario el conocimiento de más secuencias pertenecientes a la familia de genes YABBY que pertenezcan a una amplia variedad de especies representantes de numerosas familias.

OstTSL[♂] y *OstTSL*[♀] SON GENES ORTÓLOGOS A *TSL* DE *A. thaliana*

El gen *TOUSLED* se encuentra presente en una gran cantidad de organismos: plantas, animales y hongos. Codifica una cinasa de serina-treonina localizada en el núcleo (Roe *et al.*, 1993). Mutaciones en *TSL* ocasionan múltiples defectos en el desarrollo de la

planta, siendo los más dramáticos los que ocurren en la flor, específicamente en el gineceo, en él se presenta desarrollo reducido de tejidos estilares y estigmáticos lo cual provoca que la planta sea completamente estéril en la parte femenina (Roe *et al.*, 1997b).

Las secuencias parciales obtenidas a partir de las plantas femeninas (*OstTSL*♀ y cDNA*OstTSL*♀) y de plantas masculinas (*OstTSL*♂ y cDNA*OstTSL*♂) son idénticas entre sí y en ambos casos tienen altos porcentajes de similitud con el gen *TOUSLED* de *A. thaliana*, específicamente el fragmento corresponde a una región del dominio catalítico de esta proteína, con la cual comparten más del 90% de identidad. El dominio catalítico de la proteína TSL de *A. thaliana* comprende los aminoácidos 409 a 688 (Roe *et al.*, 1993), las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los fragmentos clonados de *O. stenopetala* tienen 87.5% de similitud con los aminoácidos 491 a 587 de TSL de *A. thaliana*.

Basados en los porcentajes de identidad existentes entre las secuencias reportadas de los genes tipo TSL en diferentes organismos y del propio TSL en *A. thaliana*, resulta evidente que el mayor grado de conservación se localiza dentro del dominio catalítico de la proteína, es decir, la misma zona donde se sitúan los fragmentos de DNA clonados de *O. stenopetala*. Por tanto, no resulta extraño estas regiones de DNA tengan porcentajes de identidad tan altos con las proteínas TLK's. Una cosa más que puede deducirse de los altos porcentajes de identidad, es el hecho de la importancia de la conservación de la región para que ésta pueda llevar a cabo su actividad biológica. Con estos antecedentes, suponemos que *OstTSL* forma parte de un gen que codifica una proteína que posee en su estructura el dominio catalítico de cinasa de serina/treonina tipo TSL.

Los residuos de aminoácidos del extremo carboxilo de los fragmentos de proteínas tipo TSL se encuentran altamente conservados en todas las secuencias, no solo las pertenecientes a plantas, sino también aquellas correspondientes a animales. Si bien hasta el momento no existe un mapeo que muestre la importancia estructural o funcional de los residuos de aminoácidos, los únicos cambios que se reportan como inhibidores de la actividad de cinasa se localizan en zonas que se reconoce participan en la unión a ATP o la transferencia de fosfatos (Hanks *et al.*, 1988), o cambios drásticos en

el marco de lectura. Por ejemplo, la mutación en el gen que origina al fenotipo *tsl-1* en *A. thaliana*, es una inserción de T-DNA que cambia el marco de lectura en la región correspondiente al dominio catalítico y que se ha probado es suficiente para anular la actividad de la proteína (Roe *et al.*, 1993; 1997a; 1997b). Pocos cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos de TSL provocan pérdida de actividad de cinasa de la proteína; tal es el caso de la mutación que cambia a la Lys⁴³⁸ en Glu en la secuencia TSL de *A. thaliana* (Roe *et al.*, 1997a, Ehsan *et al.*, 2004). En otras cinasas de proteína se ha sustituido con diferentes residuos de aminoácidos la Lys⁷² y en todos los casos se ha perdido la actividad catalítica de cinasa. Al parecer esta lisina está involucrada directamente en la reacción de transferencia de fosfatos, posiblemente mediando la transferencia de protones (Hanks *et al.*, 1988). Roe *et al.* (1993) señalan que el fenotipo mutante de *tsl-2* resulta de un cambio de A por T en la posición 1369 el cual reemplaza a la Val³⁵⁵ por Asp, en *tsl-3* el nucleótido 912 cambia a T por A, convirtiendo el aminoácido 203 en un codón de paro prematuro (la proteína queda reducida más de dos tercios); en ambos casos parece que la actividad de TSL se ve afectada puesto que existen malformaciones en el gineceo.

Aunque no se presentan cambios en las secuencias de *O. stenopetala* en la región del dominio catalítico, no se puede descartar la existencia de cambios en otras zonas del gen que igualmente afecten la actividad de TSL. El extremo amino terminal donde se encuentran las SLN, al parecer tiene dos funciones reguladoras; la primera está asociada con dirigir a la proteína al núcleo, ya que la delección de las dos primeras SLN consenso deja a la proteína en el citoplasma (no se sabe si las dos son necesarias o basta con una de ellas), mientras que la tercera sola no es suficiente para dirigir a la proteína al núcleo. La segunda función reguladora del extremo amino terminal es intervenir en la oligomerización de TSL. Los estudios de delección indican que al menos el primer segmento α -hélice de la región de 'rosca superenrollada' es crítica para la oligomerización de TSL. Además se sabe que el motivo de cierre de leucina encontrado en la segunda α -hélice, no es suficiente para su oligomerización, por lo que su contribución para la función de TSL aún es incierta. Al parecer, el extremo amino terminal regula positivamente la función de cinasa de la proteína, esto se deduce a partir de que el dominio catalítico de TSL es inactivo si se encuentra solo. Estos datos sugieren que se requiere la oligomerización de TSL para activar el dominio catalítico. De manera muy probable, dicha interacción puede darse a través de la unión directa de

moléculas de TSL, esta unión podría provocar un cambio conformacional al dominio catalítico que de esta forma toma su estructura completamente activa o bien es una fase transitoria donde una molécula de TSL puede activar a otra mediante su autofosforilación (Roe *et al.*, 1997a).

Los altos grados de similitud encontrados en las diferentes secuencias no resultan sorprendidos, las regiones catalíticas de las proteínas suelen ser regiones muy conservadas debido a que muchas variaciones o cambios demasiado drásticos podrían por un lado anular o disminuir la actividad de la proteína, aunque por otro lado, podrían provocar que la proteína adquiriera nuevas funciones.

Si *OstTSL* cumple las mismas, o muy similares, funciones a TSL de *A. thaliana*, resulta de gran interés investigar cuál es su participación en el desarrollo del gineceo de *O. stenopetala*, principalmente saber si está relacionado con el fenotipo del gineceo de las flores masculinas, específicamente en la morfología del estilo y del estigma.

EXISTE UNA COPIA DE *OstTSL* EN EL GENOMA DE *O. stenopetala*

Los datos sugieren que en el genoma de *O. stenopetala* existe una sola copia del gen *OstTSL*. Al parecer, una sola copia de las TLK's en el genoma es una situación constante en las plantas. Existe solo una copia en el genoma de *A. thaliana* (Roe *et al.*, 1993), y sólo se ha reportado una secuencia TLK para *O. sativa*, *T. aestivum*, *N. glutinosa* y ahora en *O. stenopetala*. En animales, la situación es un poco diferente pero se mantiene la tendencia a tener un número bajo de copias. Existe sólo un gen reportado en *D. melanogaster* y *C. elegans*, dos copias en *M. musculus* y *D. rerio*, y aparentemente tres copias en el humano.

Dada la importancia de los genes TLK's en la continuidad del ciclo celular y el hecho de que se encuentran únicamente de una a tres copias del gen en los genomas de plantas y animales, es evidente que la copia del gen debe permanecer prácticamente inalterable (principalmente en la región correspondiente al dominio catalítico). Esto es debido a que la mayoría de los cambios en secuencia del gen resultarían letales para el organismo y muy pocos cambios serían aceptados y heredados. Por ello no resultan sorprendentes los altos grados de conservación existentes entre secuencias de animales y plantas y en el caso de *O. stenopetala*, entre plantas masculinas y femeninas. Si bien pudiera haber otras regiones del gen diferentes al dominio catalítico que pudiera permitir mutaciones,

también habría problemas ya que podría afectarse su localización dentro de la célula e incluso sus patrones de expresión que generarán el mismo fenotipo mutante.

Además, debido a que al parecer hay sólo una copia del gen *OstTSL* en el genoma de *O. stenopetala*, el fragmento de gen expresado en estambres seguramente provendría de la misma región de DNA que el fragmento expresado en estilos.

***OstTSL* TIENE MAYOR SIMILITUD CON LAS SECUENCIAS DE MAÍZ, TRIGO Y ARROZ**

Los fragmentos de secuencias de aminoácidos alineadas de TSL y de TLK's, fueron utilizadas para producir un árbol en el cual se reflejaron la similitud de las secuencias analizadas. Dado que se utilizaron secuencias provenientes de animales y de plantas, no resultó sorprendente observar que estos grupos se encuentren separados. Por un lado se ubicaron las secuencias pertenecientes a plantas y por otro lado, las secuencias provenientes de animales. Esta división también resulta válida cuando el agrupamiento se realiza tomando en cuenta las secuencias completas de los organismos, es decir, las secuencias que provienen de plantas son claramente distinguibles de aquellas que provienen de animales, ya que ambas poseen características únicas de cada taxa.

Las secuencias obtenidas de *O. stenopetala* tienen mayor similitud con las secuencias de maíz, arroz y trigo. La similitud existente entre las secuencias es explicable si tenemos en cuenta que estas tres últimas especies pertenecen al mismo orden: Poales. Por otro lado, las secuencias de *N. glutinosa* y *A. thaliana* se localizan en la base del agrupamiento. De cierto modo, estos agrupamientos reflejan de forma general la clasificación de estas especies dentro de las angiospermas (Soltis y Soltis, 2003).

Opuntia stenopetala pertenece al orden Caryophyllales, el cual se encuentra en la parte basal de la filogenia de las eudicotiledóneas, este orden no está muy alejado de la separación entre monocotiledóneas (entre las cuales ubicamos al orden Poales) y eudicotiledóneas. Las eudicotiledóneas se subdividen en dos subclases: Rosidae y Asteridae, en la primera encontramos al orden Brassicales (al que pertenece *A. thaliana*) y en la segunda al orden Solanales (*N. glutinosa*), es decir, estos dos órdenes se encuentran filogenéticamente cercanos, y distanciados del orden Caryophyllales y aún más de Poales (Soltis y Soltis, 2003).

Los agrupamientos y similitudes encontradas entre las secuencias *TSL* de plantas analizadas es entendible si tomamos como base las relaciones filogenéticas existentes entre estos órdenes. Dado que *TSL* es un gen con gran importancia en la continuidad del ciclo celular (Blackwell y Walter, 2003), es evidente que durante la evolución de los organismos, se han tolerado muy pocos cambios en su secuencia, al menos en la parte correspondiente al dominio catalítico. Por esta razón encontramos que los agrupamientos basados en la similitud del gen no varían con respecto a las relaciones filogenéticas existentes entre estas especies. Para poder confirmar esto es necesario tener conocimiento de muchas más secuencias ortólogas de este gen en distintas especies de plantas. Sin embargo, estos resultados son un comienzo alentador para un estudio de este tipo.

POSIBLES FUNCIONES DE *OstTSL* EN EL DESARROLLO DEL GINECEO

La función que puede estar cumpliendo el gen *TSL* en las plantas no se ha esclarecido completamente todavía. El fenotipo del gineceo de las plantas *tsl* indica que éste podría estar participando en la promoción de las divisiones celulares durante la formación del estilo y durante la expansión de los márgenes carpelares, y es que las áreas disminuidas de estos tejidos aparentemente no son consecuencia de falta de capacidad de las células de diferenciarse correctamente, sino de fallas en la especificación y/o reducción de la proliferación de células correctamente especificadas como estilo y estigma. De este modo, la función de *TSL* es requerida para el desarrollo del carpelo (sin importar dónde se forme, en el caso de las mutaciones homeóticas; Roe *et al.*, 1997b).

Las proteínas cinasas tienen importantes papeles en las vías de señalización de los factores de crecimiento en la mayoría de los organismos superiores. En *A. thaliana*, la actividad de *TOUSLED* se ha implicado en la transducción de señales o bien, se cree que participa en vías reguladoras diferentes a aquellas involucradas en la especificación de órganos, o identidad del meristemo, y es requerida para el desarrollo apropiado de hojas y flores (Roe *et al.*, 1993).

Aunque en animales se ha avanzado bastante en el descubrimiento de los posibles sustratos de las cinasas TLK's, muchos de estos sustratos no resultan ser los mismos en

plantas, o al menos en cultivos de células en suspensión de *A. thaliana* (Ehsan *et al.*, 2004).

Mientras que en células animales las TLK's se han involucrado en la remodelación de la cromatina posterior a la replicación del DNA (G2/M, Blackwell y Walker, 2003), en cultivos celulares de *A. thaliana* no existe evidencia de que TSL actúe específicamente durante la replicación del DNA, sino que la expresión del mRNA y de la proteína TSL es constitutiva a lo largo del ciclo celular (Silljé *et al.*, 1999), aunque a diferencia de las TLK's de humanos, su expresión no parece estar regulada por el ciclo celular (Menges *et al.*, 2002).

La actividad cinasa de TSL oscila durante el ciclo celular de *A. thaliana*, con un pico máximo durante la transición G2/M y la fase G1 (Ehsan *et al.*, 2004), a diferencia de lo que ocurre en humanos, donde la mayor actividad se presenta en la fase S (Silljé *et al.*, 1999). Otra diferencia importante radica en que en *A. thaliana* no se encuentra acción específica de TSL durante la replicación del DNA (Ehsan *et al.*, 2004) misma que se ha reportado en humanos (Silljé *et al.*, 1999), aunque si hay actividad de TSL durante la fase S (Ehsan *et al.*, 2004).

Dado que Asf1 (Anti Silencing Function 1) es un sustrato de las TLK's de humanos (Silljé *et al.*, 2001), uno de los sustratos potenciales de TSL en *A. thaliana* es Asf1b/SGA1 (un gen tipo *Asf1* de humanos cuya producto participa en el ensamblaje de la cromatina), a la cual fosforila *in vitro*, esto puede llevar a un silenciamiento génico vía el ensamblaje de los nucleosomas o bien, a la regulación de la cromatina vía la interacción con complejos proteicos específicos (Ehsan *et al.*, 2004). TSL también interactúa y fosforila a TKI1 (Tousled Kinase Interacting Protein 1) en el dominio proteico SANT/myb. Este dominio puede actuar como un activador transcripcional en levadura. Al parecer estos dominios tienen papeles críticos en la interacción de proteínas en complejos que están involucrados en la remodelación de la cromatina por medio de la interacción con el extremo N-terminal de las colas de histonas y de enzimas como la acetiltransferasa de histonas y la desacetilasa de histonas (ver Ehsan *et al.*, 2004).

La interacción de estas dos proteínas con TSL parece estar mediada por uniones diferentes. Mientras que Asf1b/SGA1 se une fuertemente al extremo N-terminal del dominio regulador de TSL, TKI1 se une únicamente a la forma activa de la cinasa y no sólo al dominio regulador. El dominio SANT/myb de TKI1 no es requerido para la unión con TSL (Ehsan *et al.*, 2004).

La proteína TKI1 es homóloga en el dominio SANT a la proteína *cramped* del grupo Polycomb, el cual probablemente está involucrado en la regulación de la cromatina durante el desarrollo de *D. melanogaster* (Yamamoto *et al.*, 1997 citado en Ehsan *et al.*, 2004). Los genes del grupo *Polycomb* (*PcG*) codifican proteínas que mantienen el estado reprimido de genes inactivados a través de la formación de complejos multiproteicos, los cuales interactúan con la cromatina. En *D. melanogaster*, los genes *PcG* regulan el estado activo/inactivo de los genes homeóticos *HOX* desde la embriogénesis hasta etapas posteriores del desarrollo. Por tanto, el aislamiento de genes tipo *PcG* que regulen la expresión de los genes de los órganos de identidad floral se vuelve particularmente interesante. Dado que los genes MADS-box no tienen relación estructural con los genes *Hox*, es posible que los genes *PcG* de animales y plantas evolucionaran de manera convergente para regular los genes homeóticos en ambos tipos de organismos (Francis y Kingston, 2001 citado en Zik e Irish, 2003). El único gen tipo *PcG* en *A. thaliana* que se ha demostrado que específicamente regula la identidad organelar es *CURLY LEAF* (*CLF*), éste es requerido para que la hojas y flores tengan una morfología normal y la planta tenga un adecuado tiempo de floración (Goodrich *et al.*, 1997). Un posible papel para *CLF* es reprimir la transcripción de *AGAMOUS* en hojas y tallos de las inflorescencias y mantener la represión en los dos primeros verticilos de la flor (Zik e Irish, 2003).

TSL también fosforila a la histona H3 *in vitro* (Ehsan *et al.*, 2004). H3 en humanos es fosforilada por TLK1B (un producto del procesamiento por splicing alternativo de la cinasa TLK1) en Ser¹⁰ (Li *et al.*, 2001); la fosforilación de la histona H3 modula su interacción con la cromatina y probablemente esté involucrada en la segregación de los cromosomas durante la mitosis y en la transcripción (Jenuwein y Allis, 2001 citado en Ehsan *et al.*, 2004). Sin embargo, la fosforilación de H3 por TSL no resultó detectable en extractos de botones florales mediante ensayos de Western-blot (Ehsan *et al.*, 2004).

Las TLK's se inactivan rápidamente en respuesta al daño al DNA e inhibidores de la replicación (Silljé *et al.*, 1999). El daño al DNA ocurrido durante la fase G1 o G2 del ciclo celular lleva al estancamiento del crecimiento en los límites G1/S y G2/M, respectivamente, mientras que si ocurre en la fase S, existe una inhibición transitoria de la síntesis del DNA y la supresión de la entrada a la mitosis (Canman, 2001).

La evidencia de la importancia del control epigenético a distintos niveles durante la regulación del desarrollo floral y su diferenciación crece día a día. La metilación y remodelación de la cromatina se han implicado durante el control de los genes que

regulan la identidad de los órganos florales y por lo tanto en la modulación del desarrollo floral. Aunque los mecanismos epigenéticos operan en las plantas para regular muchos procesos de desarrollo, el desarrollo floral parece particularmente sensible a estos controles. Es posible que los procesos de floración estén regulados en múltiples niveles para asegurar que la esencia del mecanismo de reproducción se mantenga sin importar las circunstancias (Zik e Irish, 2003).

Sabiendo que TSL tiene vital importancia durante el desarrollo del gineceo, no resulta desatinado proponer que este gen esté involucrado en el desarrollo incompleto del gineceo de las plantas masculinas de *O. stenopetala*. En *D. melanogaster*, la pérdida de *tlk* ocasiona un alto en la progresión del ciclo celular durante la interfase, lo cual subsecuentemente, lleva a la muerte apoptótica (Carrera *et al.*, 2003). En el gineceo de *O. stenopetala* pudiera estar ocurriendo algo similar, de modo que en el tejido en división del estilo y estigma no se lleven a cabo de manera correcta las divisiones celulares, y como consecuencia se desencadene el proceso de muerte celular programada (MCP). En nuestro grupo de investigación se tiene evidencia de que la MCP ocurre en las anteras jóvenes de las plantas femeninas de *O. stenopetala* durante el desarrollo de los granos de polen (Flores y Vázquez-Santana, datos no publicados). En estas anteras se ha detectado que las células madres de las microsporas no cumplen correctamente con el proceso de meiosis ocasionando que se desencadene la MCP de estas células y que no se formen granos de polen. Las fallas en la meiosis han tomado un papel preponderante en la esterilidad masculina en plantas.

Se tienen evidencias de que la estructura de la cromatina puede desempeñar un papel muy importante en que el ciclo celular meiótico llegue a buen término (Mercier *et al.*, 2001).

En humanos, se piensa que la sobreexpresión de TLK1B puede ayudar a evitar una señal apoptótica activada por rompimientos en la doble cadena del DNA, mediante la activación de antagonistas de la (MCP) tales como ATF2 (Activating Transcription Factor 2), GCK/NK- κ B, JNK/p38 o cinasas de daño a DNA (Ivanov *et al.*, 2000 citado en Li *et al.*, 2001).

El efecto de las mutaciones de TSL en *A. thaliana* resulta menos severo que la inactivación de las TLK's en *C. elegans* o *D. melanogaster*, esto sugiere algún grado de

divergencia entre los papeles que tienen las *TLK*'s entre plantas y animales (Fourquin *et al.*, 2005), lo que resulta evidente es el papel primordial de las *TLK*'s en las divisiones meióticas y mitóticas en plantas y animales, y específicamente en plantas, el papel de *TSL* se relaciona con el desarrollo del gineceo. Ahora que conocemos que el estilo-estigma de las flores masculinas presenta fallas en su formación debido a la interrupción de las divisiones mitóticas [así como las meióticas en los óvulos en desarrollo (Orozco, 2002)], resulta muy interesante ir descubriendo los elementos que pueden estar relacionados con estas divisiones en *O. stenopetala*, al hacerlo, además de contribuir al conocimiento del desarrollo del gineceo en las angiospermas, se pueden dilucidar los mecanismos que operaron o están operando en esta especie durante su camino en la evolución hacia la unisexualidad funcional de las flores y al establecimiento del dioicismo como sistema reproductor.

OstTSL* NO SE AMPLIFICA EN TODOS LOS INDIVIDUOS DE *O. stenopetala

Dado que los fragmentos de *OstTSL* y *cDNAOstTSL* se amplificaron a partir del DNA y/o RNA de una mezcla de diferentes individuos, fue necesario corroborar la presencia o ausencia del fragmento *OstTSL* en cada uno de los 30 individuos femeninos y 30 masculinos de *O. stenopetala*. En el 72% de los individuos femeninos y en el 55% de los individuos masculinos se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 300 pb correspondiente con el tamaño esperado para *OstTSL*. En el porcentaje restante no fue posible sintetizar el fragmento (Fig. 26).

La falta de amplificación en individuos masculinos resulta entendible, ya que al carecer la proteína de gran parte del dominio catalítico seguramente no es funcional. La falta de actividad de *OstTSL* en el gineceo masculino podría causar las malformaciones observadas. Sin embargo, la falla en la amplificación del dominio catalítico de *OstTSL* no es lógica en los individuos femeninos, ya que poseen estilo y estigma completamente desarrollado y funcional. Algunos argumentos para explicar esta situación son: (1) en estos individuos hay mayor variación en las regiones de unión de los oligonucleótidos de modo que las condiciones de PCR utilizadas resultan demasiado astringentes. Sin embargo, dado que el dominio catalítico de las *TLK*'s se encuentra muy conservado en plantas y animales, se espera que la variación existente entre individuos de una misma especie sea mínima. De este modo, al utilizar oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias homólogas conocidas de plantas y animales, las probabilidades de

amplificación aumentan. (2) La explicación más razonable supone una degradación del DNA utilizado en la reacción de PCR. Esta degradación no afecta al fragmento *OstSTY* debido, a su corta longitud por lo que al conservarse intacto logramos amplificarlo. Por otro lado, un fragmento de mayor tamaño como lo es *OstTSL*, se ve afectado por el proceso de degradación impidiendo su amplificación. Lo anterior genera la necesidad de obtener la secuencia completa de *OstTSL* para diseñar oligonucleótidos específicos y realizar el análisis de presencia/ausencia amplificando al gen completo, de este modo, será posible determinar si estos individuos presentan deleciones en el dominio catalítico o en alguna otra parte del gen.

CONCLUSIONES

- El estilo de las flores femeninas comparado con el estilodio de las flores masculinas presenta menor número de células mucilaginosas, mayor cantidad de tejido de transmisión, mayor grado de diferenciación de los haces vasculares y diferente forma y mayor diámetro del canal estilar.
- Existen genes ortólogos a *TSL* de *A. thaliana* en plantas masculinas y femeninas de *Opuntia stenopetala* (*OstTSL*).
- Entre sí estos genes son idénticos, al menos en el fragmento correspondiente al dominio catalítico de cinasa.
- *OstTSL* tienen mayor parecido con las secuencias de maíz, trigo y arroz.
- Existe una sola copia del gen *OstTSL* en el genoma de *O. stenopetala*.
- *OstTSL* se presenta con mayor frecuencia en los individuos femeninos que en los masculinos.
- Existen fragmentos de DNA homólogos al dominio dedos de zinc de la proteína *STY* en *O. stenopetala*.
- Estos fragmentos son idénticos en el genoma de las plantas masculinas y femeninas. *OstSTY* se encuentra presente en todos los individuos masculinos y femeninos.
- Aparentemente no existe en *O. stenopetala* un gen que conserve los dominios característicos de los genes *YABBY*, o bien, de existir, la similitud de secuencia en la región analizada es muy baja.

PERSPECTIVAS

- Dada la importancia de los genes estudiados en el desarrollo del gineceo, resulta importante obtener las secuencias completas de estos genes en *O. stenopetala*, mediante técnicas basadas en PCR como el 5' RACE y 3' RACE para poder realizar el análisis completo de las secuencias. Una vez que se obtengan, se pretende explorar a una población natural de *O. stenopetala* y buscar cambios existentes en individuos masculinos y femeninos.
- Otra aproximación se puede realizar buscando proteínas con las que *OstTSL* y *OstSTY* estén interactuando, aunque para realizar estudios bioquímicos es más adecuado realizar los experimentos en *Nicotiana tabacum* porque es un buen modelo experimental.
- Es muy importante estudiar los patrones de expresión de estos genes. Dada la imposibilidad de trabajar con RNA de estilos, podría intentarse mediante el uso de anticuerpos específicos o bien por medio de hibridaciones *in situ*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Alvarez, J. y D. Smyth. 1999. *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development* 126: 2377-2386.
- Alvarez, J. y D. Smyth. 2002. *CRABS CLAW* and *SPATULA* genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences* 163: 17-41.
- Antovics, J., y H. Alexander. 1992. Epidemiology of anther-smut infection of *Silene alba* (*Silene latifolia*) caused by *Ustilago violacea* patterns of spore deposition in experimental populations. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 250: 157-163.
- Bai, S., Y. Peng, J. Cui, H. Gu, L. Xu, Y. Li, Z. Xu y S. Bai. 2004. Developmental analysis reveal early arrests of the spore-bearing parts of reproductive organs in unisexual flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Planta* 220: 230-240.
- Blackwell, T. y A. Walker. 2003. Transcription elongation: TLKing to dispatch chromatin? *Current Biology* 13: R915-R916.
- Bowman, J., D. Smyth y E. Meyerowitz. 1991. Genetics interactions among floral genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20.
- Bowman, J., S. Baum, Y. Eshed, J. Putterill y J. Alvarez. 1999. Molecular genetics of gynoecium development in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology* 45: 155-205.
- Bowman, J., y D. Smyth. 1999. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126: 2387-2396.
- Bracale, M., E. Caporali, M. Galli, C. Longo, G. Marziani-Longo, G. Rossi, A. Spada, C. Soave, A. Falavigna, F. Raffaldi, E. Maestri, F. Restivo y F. Tassi. 1991. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Science* 80: 67-77.
- Buzgo, M., D. Soltis, P. Soltis y H. Ma. 2004. Towards a comprehensive integration of morphological and genetic studies of floral development. *Trends in Plant Science* 9: 164-173.
- Calderón-Urrea, A. y S. Dellaporta. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* 30: 1463-1464.
- Canman, C. 2001. Replication checkpoint: preventing mitotic catastrophe. *Current Biology* 11: R121-R124.
- Caporali, E., A. Spada, A. Losa y G. Marziani. 2000. The MADS box gene *AOM1* is expressed in reproductive meristems and flowers of the dioecious species *Asparagus officinalis*. *Sexual Plant Reproduction* 13: 151-156.
- Caporali, E., A. Spada, G. Marziani, O. Failla y A. Scienza. 2003. The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*. *Sexual Plant Reproduction* 15: 291-300.
- Carrera, P., Y. Moshkin, S. Grönke, H. Silljé, E. Nigg, H. Jäckle y F. Karch. 2003. TOUSLED-like kinase functions with the chromatin assembly pathway regulating nuclear divisions. *Genes and Development* 17: 2578-2590.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
- Coen, E. y E. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Cruz-González, Y. 2002. Caracterización morfológica y molecular de un posible híbrido entre *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichi* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology. A practical approach*. Oxford University Press. EUA.

- Dellaporta, S. y A. Calderón-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* 5: 1241-1251.
- Dellaporta, S. y A. Calderón-Urrea. 1994. The sex determination process in maize. *Science* 266: 1501-1505.
- De Long, A., A. Calderón-Urrea y S. Dellaporta. 1993. Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage specific floral organ abortion. *Cell* 74: 757-768.
- Doyle, J. 1994. Origin of the angiosperm flower: a phylogenetic perspective. *Plant Systematics and Evolution* 8: 7-29.
- Ehsan, H., J. P. Reichheld, T. Durfee y J. Roe. 2004. TOSLED kinase activity oscillates during the cell cycle and interacts with chromatin regulators. *Plant Physiology* 134: 1488-1499.
- Farbos, I., M. Oliveira, I. Negrutiu y A. Mouras. 1997. Sex organ determination and differentiation in the dioecious plant *Melandrium album* (*Silene latifolia*): a cytological and histological analysis. *Sexual Plant Reproduction* 10: 155-167.
- Ferrándiz, C., S. Pelaz y M. Yanofsky. 1999. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry* 68: 321-354.
- Fourquin C., M. Vinauger, B. Fogliani, C. Dumas y C. Scutt. 2005. Evidence that *CRABS CLAW* and *TOSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestro of the extant angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 4649-4654.
- Fridborg, I., S. Kuusk, T. Moritz y E. Sundberg. 1999. The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *The Plant Cell* 11: 1019-1031.
- Fridborg, I., S. Kuusk, M. Robertson y E. Sundberg. 2001. The *Arabidopsis* protein SHI represses gibberellin responses in *Arabidopsis* and barley. *Plant Physiology* 127: 937-948.
- Goodrich, J., P. Puangsomlee, M. Martin, D. Long, E. Meyerowitz y G. Coupland. 1997. A polycomb-group gene regulates homeotic gene expresión in *Arabidopsis*. *Nature* 386: 44-51.
- Groth, A., J. Lucas, E. Nigg, H. Silljé, C. Wernstedt, J. Bartek y K. Hansen. 2003. Human Toslled-like kinases are targeted by an ATM- and Chk1- dependent DNA damage checkpoint. *The EMBO Journal* 22: 1676-1687.
- Han, Z., J. Saam, H. Adams, S. Mango y J. Schumacher. 2003. The *C. elegans* Toslled-like kinase (TLK-1) has an essential role in transcription. *Current Biology* 13: 1921-1929.
- Hanks, S., A. Quinn y T. Hunter. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.
- Hardenack, S. y S. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science* 2: 130-136.
- Hardenack, S., D. Ye, H. Saedler y S. Grant. 1994. Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell* 6: 1775-1787.
- Irish, E. y T. Nelson. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants. *The Plant Cell* 1: 737-744.
- Jack, T. 2001. Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends in Plant Science* 6: 310-316.
- Kinney, M., J. Columbus y E. Friar. 2003. Molecular evolution of the maize sex-determining gene *TASSELSEED2* in *Bouteloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 519-528.
- Kumar, S., K. Tamura, K. Jakobsen y M. Nei. 1994. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Kuusk, S. 2003. Control of pistil development in *Arabidopsis thaliana* by a novel class of regulatory genes. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 827. 50 pp.

- Kuusk, S., J. Sohlberg, J. Long, I. Fridborg y E. Sundberg. 2002. *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development* 129: 4707-4717.
- Li, Y., R. DeFatta, C. Anthony, G. Sunavala y A. De Benedetti. 2001. A translationally regulated *Tousled* kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed. *Oncogene* 20: 726-738.
- López, M., J. Márquez y G. Murguía. 1998. Técnicas para el estudio del desarrollo de las angiospermas. Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. México.
- Matsunaga, S., S. Kawano, H. Takano, H. Uchida, A. Sakai y T. Kuroiwa. 1996. Isolation and developmental expression of male reproductive organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). *The Plant Journal* 10 : 679-689.
- Mauseth, J. 1988. *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. EUA.
- Menges, M., L. Hennig, W. Gruissem y J. Murray. 2002. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 41987-42002.
- Mercier, R., D. Vezon, E. Bullier, J. Montemayor, A. Sellier, F. Lefèvre, G. Pelletier y C. Horlow. 2001. SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes and Development* 15: 1859-1871.
- Nagasawa, N., M. Miyoshi, Y. Sano, H. Satoh, H. Hirano, H. Sakai y Y. Nagato. 2003. *SUPERWOMAN* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development* 130: 705-718.
- Negrutiu, I., B. Vyskot, N. Barbacar, S. Georgiev y F. Moneger. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* 127: 1418-1424.
- Ng, M., y M. Yanofsky. 2001. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Reviews| Genetics* 2: 186-195.
- Okada, K. y Y. Shimura. 1994. Genetic analysis of signalling in flower development using *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 26: 1357-1377.
- Orozco, G. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelman (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 82 pp.
- Parada, D. 2004. Estudio comparativo de las estructuras reproductoras de *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada y *Mammillaria haageana* Pfeiffer (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 84 pp.
- Renner, S. y R. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82: 596-606.
- Roe, J., C. Rivin, R. Sessions, K. Feldmann y P. Zambryski. 1993. The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* 75: 939-950.
- Roe, J., T. Durfee, J. Zupan, P. Repetti, G. McLean y P. Zambryski. 1997a. *TOUSLED* is a nuclear serine/threonine protein kinase that requires a coiled coil region for oligomerization and catalytic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 5838-5845.
- Roe, J., J. Nemhauser y P. Zambryski. 1997b. *TOUSLED* participates in apical tissue formation during gynoecium development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 9: 335-353.
- Scutt, C., S. Robertson, M. Willis, Y. Kimisugi, Y. Li, M. Shenton, R. Smith, H. Martin y P. Gilmartin. 1999. Molecular approaches to the study of sex determination in dioecious *Silene latifolia*. En: Ainsworth, C. ed. *Sex determination in plants*. Oxford: Bios Scientific Publishers.
- Sessions, R. y P. Zambryski. 1995. *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* 121: 1519-1532.
- Siegfried, K., Y. Esheld, S. Baum, D. Otsuga, G. Drews y J. Bowman. 1999. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* 126: 4117-4128.

- Silljé, H. y E. Nigg. 2001. Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases. *Current Biology* 11: 1068-1073.
- Silljé, H., K. Takahashi, K. Tanaka, G. Van Houwe y E. Nigg. 1999. Mammalian homologues of the plant *Tousled* gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. *EMBO Journal* 18: 5691-5702.
- Soltis, D. y P. Soltis. 2003. The role of phylogenetics in comparative genetics. *Plant Physiology* 132: 1790-1800.
- Strittmatter, L., V. Negrón-Ortiz y R. Hickey. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* 89: 1373-1387.
- Thompson, J., D. Higgins y T. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Valderrama, M., A. Cruz y O. Paredes. 2002. Isolation of functional RNA from cactus fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 279-286.
- Vicent, C. y M. Delseny. 1999. Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Analytical Biochemistry* 268: 412-413.
- Winter, K., a. Becker, T. Munster, J. Kim, H. Saedler y G. Theissen. 1999. MADS-box genes reveal that gymnosperms are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 7342-7347.
- Yamaguchi, T., N. Nagasawa, S. Kawasaki, M. Matsuoka, Y. Nagato y H. Hirano. 2004. The YABBY gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *The Plant Cell* 16: 500-509.
- Yamakawa, A., Y. Kameoka, K. Hashimoto, Y. Yoshitake, K. Nishikawa, K. Tanihara y T. Date. 1997. cDNA cloning and chromosomal mapping of genes encoding novel protein kinases termed pKU- α y pKU- β , which have nuclear localization signal. *Gene* 202: 193-201.
- Zik, M. y V. Irish. 2003. Flower development: initiation, differentiation and diversification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 119-140.

APÉNDICE 1

Cuadro de Combinaciones de Bases	
Letra	Bases
R	A y G
Y	C y T
M	A y C
K	G y T
S	C y G
W	A y T
H	A, C y T
B	C, G y T
V	A, C y G
D	A, G y T
I	A, C, G y T