



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN *ARABIDOPSIS THALIANA* DE FACTORES
EPIGENÉTICOS ACTIVADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES AL
GRUPO TRITHORAX.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Azalia Avila Nava



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE **Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri**

VOCAL **Profesor: MC. José Paramo Ramírez**

SECRETARIO **Profesor: Dr. Raúl Álvarez Venegas**

1er. SUPLENTE **Profesor: Dr. Jorge Aburto Anell**

2er. SUPLENTE **Profesor: Dra. Perla D. Maldonado Jiménez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE CROMATINA Y EPIGENÉTICA, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, UNIDAD IRAPUATO.

ASESOR DEL TEMA: DR. RAÚL ÁLVAREZ VENEGAS, CINVESTAV-IRAPUATO



SUPERVISOR TÉCNICO: DR. RAÚL ÁLVAREZ VENEGAS, CINVESTAV-IRAPUATO



SUSTENTANTE: AZALIA AVILA NAVA



Agradecimiento especial

"Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del CONACYT, a través de una beca para la realización de Tesis de Licenciatura , proyecto de investigación CB-2006/55028, otorgado al Dr. Raúl Álvarez Venegas. "

Agradecimientos

Agradecer es una de las virtudes que los seres humanos perdemos a lo largo de nuestra vida, esta ocasión no quisiera formar parte de esa lista. Los agradecimientos no tienen alguna jerarquía, ninguno es más que otro. Para mí cada una de las personas que menciono a continuación tienen relevancia en mi vida personal y profesional.

Los primeros agradecimientos quiero dedicarlos a la base de mi vida, mi familia.

Gracias mamá por todos y cada uno de los detalles brindados a lo largo de mi vida y por supuesto en la licenciatura, gracias por siempre confiar en mí, por creer en lo que hago, por presumirme de esa forma que sólo tú lo sabes hacer con tus conocidos, por tenerme presente en cada uno de tus pensamientos, por soportar las pijamadas en la casa y por hacer el desayuno al otro día; gracias simplemente por ser el ángel que la vida me designo como mamá. Eres la mejor má, confío plenamente en ti.

Papá gracias por enseñarme que los imposibles no existen, sólo es cuestión de pasión y dedicación para alcanzar lo que uno anhela. Por la fortaleza que me has ayudado a tener, por permitirme crecer como persona, por la confianza que tienes en mí, por la libertad que me has dado para poder enfrentar la vida como un ser humano independiente. Agradezco que seas un pilar de mi vida.

A mi abuela que de verdad que si la conocieran la amarían, pues es la abue más divertida que he conocido. Gracias por tus consejos, por aguantar a mis amigos borrachos, por confiar en mí, por consentirme tanto y por hacerme reír hasta morir.

A mi primo Carlos que forma parte importante en mi familia. Gracias por estar en cada momento que te he necesitado, gracias por querer a los que me rodean y hasta hacerlos parte de tu vida. A mi primo Julio que no hay mayor fortaleza que la que me muestra día a día.

A mi mejor amiga Mela gracias por esta excepcional amistad, por todo el camino recorrido juntas, que es bastante, por ser mi mejor consejo, por consentirme, por apoyarme. Te quiero infinitamente amiga. También agradezco a tu pá por las atenciones cuando estuve en tu casa, por su compañía y sus palabras de aliento. A Abraham y a Rebeca por quererme tanto, realmente agradezco a toda tu familia por la calidez de sus atenciones.

A mis niñas que son parte de mi vida, mi familia y mis estrellitas, pues ellas han aguantado más que nadie.

Palomation Plus por ser mi inseparable amiga, mi gemela y compañera en la facultad (excepto cuando tuvo novio). Gracias por enseñarme el lado rosita de la vida, por admirarme en los momentos más importantes de mi vida, por hacerme reír en los momentos de mayor pesimismo, por hacerme sentir como parte de tu familia que no sobra decir que los adoro, por dejarme conocer a una de las mamás más divertidas de este mundo y por jugar basta en el metro conmigo. Gracias simplemente por dejarme recorrer este camino a tu lado.

gbo por ser la persona que tiene todo lo que odio pero que me ha enseñado a querer todos y cada uno de sus defectos que en su caso son virtudes. Gracias por los muy buenos momentos que hemos vivido, por aprender conmigo, por compartir sentimientos que nunca pensaste que saldrían de ti, por confiar plenamente en mí y por mostrarme que las sorpresas en la vida existen y una de ellas eres tú. Gracias por ser como eres.

A mis amigos Mine y Amigato niños que les digo tantos años, tan divertidos momentos. Una amistad tan fuerte como esta es difícil de encontrar, pues tenemos caminos tan distintos, pero aún así aquí seguimos. Gracias por estar en mi vida.

A las personas que me han enseñado todo lo que saben y me han brindado su ayuda sin pedir nada a cambio. A todos y cada uno de ellos les debo parte de lo que soy.

Dr. Humberto que me enseñó las bases en la investigación. Gracias por confiar en mí cuando estuve en su laboratorio, por transmitirme muchos de los conocimientos que me sirvieron para llevar a cabo mi tesis y porque me sorprendió su persona, al darme cuenta que usted mantiene una parte esencial del ser humano, la nobleza.

Dr. Raúl Álvarez gracias por apoyarme desde el primer momento que me comuniqué con usted, por permitirme trabajar en su laboratorio, por motivarme al elucidar cada uno de los aciertos que tuve en su laboratorio, por las palabras que me hacían sentir una gran investigadora. Gracias por la actitud tan cordial hacia nosotros. De verdad que me siento muy orgullosa de haber trabajado con un gran investigador, como lo es usted.

Dra. Clelia gracias por los consejos, por compartir su conocimiento, por las buenas charlas del laboratorio y por mostrarme lo que es la disciplina en el trabajo de laboratorio pues cabe mencionar que ella es una super mujer, no importa la cantidad industrial de trabajo que tenga siempre cumple con todo..

Dr. Alberto gracias por el tiempo que me regalaste para discutir mi trabajo, por los consejos que me brindaste, por los muy divertidos momentos en el laboratorio y por las buenas historias de los asaltos en el D.F. Admiro mucho tu pasión por la investigación.

Sra. Alicia en usted encontré un gran apoyo al inicio de mi estancia en el laboratorio que finalmente se convirtió en una maravillosa amistad. Gracias por esta amistad incondicional.

A mis preciosos amigos de Tixtla que son parte muy importante en mi vida, gracias porque son maravillosos. A Vel que es una bendición en mi vida, cinco minutos de conocerte amiga y ya eras mi confidente, a mi Vaquero gracias por esta maravillosa y duradera amistad te quiero tanto tanto, a Walito que aunque sea ojete así lo adoro, a Sol gracias niña por los bellos momentos que compartes conmigo, a Dona

mujer muy importante, es mi lección de vida, gracias por divertirme conmigo princesa, a Joe gracias por todos los detalles amigo.

A los de facultad a la barda: Galleta, David, Aurora, Pau, Chucho, Pancho, Oscar, Erika, Odin, Mota. Especialmente a Galleta por los muy divertidos momentos, por las palomitas de media noche en su casa, a Chucho por ser mi compañero cada vez que salíamos de vacas, por ayudarme a encontrar antros en la playa; a Aurora por ser una las mejores personas que la vida me ha permitido conocer eres hermosa.

Confi gracias por compartir tantos momentos conmigo, por estudiar genética, por estresarte conmigo para los exámenes, para por fin lograr ser los grandes ga's que presumía la profesora. A la Lula, gracias por ser mi amiga, por los buenos consejos antes de cada exposición, gracias mi niña; a Juan José que aunque todos lo nieguen es lindo, gracias niño por ser así; a Pablo que aunque diga que lo odio no es cierto.

A mis amigos del laboratorio a Zamaria de verdad nunca había conocido a una persona con tanta chispa, ha excepto Akram, que divertidas platicas contigo, a Akram la persona más rara y noble que he conocido, gracias por aguantar mis malos ratos, a Juanito gracias por ayudarme con mi trabajo y por sonreír con nosotras aunque a veces te cueste trabajo, a la Ternurita gracias por ser tan buena compañía y por ser tan linda conmigo, a Silvia de verdad eres una niña muy especial e inteligente. Y bueno a todos les agradezco los buenos momentos en la comida, que divertidas y extensas pláticas.

Creo que lo más difícil de una carrera es poder terminar amando lo que uno estudio. Pero ahí es donde recae la pasión del individuo, en hacer lo que ama un hobby. Disfrutar plenamente el trabajo para tener grandes resultados y destacar como profesionalista.

La razón no me ha enseñado nada. Todo lo que yo sé me ha sido dado por el corazón.

Leon Tolstoi (1828-1910) Escritor ruso.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	v
1.INTRODUCCIÓN	
1.1 Organización del ADN en eucariotas	1
1.2 Regulación de la expresión génica en eucariotas	2
1.3 Epigenética y factores epigenéticos	3
1.4 Grupo Trithorax	4
1.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo	4
1.6 Generación de mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> para estudio de funciones génicas	5
1.7 Embriogénesis en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.MARCO TEÓRICO	11
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	12
4.2 Objetivos Específicos	12
5.METODOLOGÍA	
5.1 Cultivo y condiciones de crecimientos de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
5.1.1 Germinación de las semillas	13
5.1.1.1 Estratificación en frío o vernalización artificial de semillas para cultivo	13
5.1.1.3 Cultivo en suelo	13
5.2 Recolección de semillas	13
5.3 Análisis del fenotipo en las líneas silvestre y mutante	14
5.4 Genotipificación de la línea mutagenizada <i>atx3</i>	14
5.5 Determinación de la expresión de <i>ATX3</i> y genes relacionados con el desarrollo embrionario de <i>A. thaliana</i> en distintos tejidos de la línea silvestre y de la mutante	17
5.5.1 Extracción de ARNm de diferentes tejidos de la línea silvestre y mutante para generación de ADNc	18
5.6 Clonación del promotor de <i>ATX3</i> en pCambia1303 y transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
6.RESULTADOS	
6.1 Análisis fenotípico de la línea silvestre y la línea mutante	27
6.1.1 Comparación del desarrollo, crecimiento y fenotipo de <i>Columbia 0</i> y <i>atx3</i> .	27
6.1.2 Comparación del desarrollo embrionario de <i>Columbia 0</i> y mutante (<i>atx3</i>)	32
6.2 Genotipificación de la línea mutagenizada <i>atx3</i>	33
6.3 Determinación de la expresión de <i>ATX3</i> en línea silvestre y mutante en distintos estadios y tejidos	35

6.4 Clonación de promotor de <i>ATX3</i> en pCambia1303 y transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	37
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	
7.1 Análisis comparativo del desarrollo temprano en la línea mutante y silvestre	46
7.2 Análisis comparativo del desarrollo embrionario en las líneas mutante y silvestre	47
7.3 Expresión de <i>ATX3</i> en la línea silvestre y mutante (<i>atx3</i>)	48
7.4 Genotipificación de la línea mutagenizada (<i>atx3</i>)	50
7.5 Variabilidad en la expresión de genes homeóticos debido a la mutación del gen <i>ATX3</i>	50
8. CONCLUSIONES	54
8.1 Perspectivas a futuro del laboratorio de cromatina y epigenética	55
9. PROTOCOLOS	56
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido DesoxirriboNucléico
ADNc	ADN complementario
Arg, R	Arginina
ARN	Ácido Riboucléico
ARNm	Ácido Riboucléico mensajero
<i>ASH1</i>	<i>Absent, Small, or Homeotic disc 1</i>
<i>ATHB53</i>	<i>At HB53 homeobox-8</i>
<i>ATX 1</i>	<i>Arabidopsis Trithorax Homolog 1</i>
<i>ATX 2</i>	<i>Arabidopsis Trithorax Homolog 2</i>
<i>ATX 3</i>	<i>Arabidopsis Trithorax Homolog 3</i>
<i>ATX 4</i>	<i>Arabidopsis Trithorax Homolog 4</i>
<i>ATX53</i>	<i>Arabidopsis Trithorax Homolog 5</i>
<i>atx3</i>	Mutante de <i>Arabidopsis Trithorax Homolog 3</i>
ChIP	Inmuno Precipitación de Cromatina
ChvE	sugar binding protein
<i>Col 0</i>	<i>Columbia 0</i> (Línea silvestre de <i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>CRANE/IAA18</i>	<i>Indole-3-Acetic Acid Inducible 18</i>
<i>CYP71</i>	<i>Cyclophilin 71</i>
E(z)	Enhancer zeste
<i>EXO70A1</i>	<i>Exocyst subunit EXO70 family protein A1</i>
<i>FBL17</i>	<i>Ubiquitin-protein ligase</i>
<i>FUS</i>	<i>Several fusca</i>
<i>GUS</i>	<i>β-glucoronidasa</i>
H1	Histona 1
H2A	Histona 2 A

H2B	Histona 2 B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
H5	Histona 5
<i>KNAT1/BP</i>	<i>Knotted-Like Arabidopsis thaliana 1</i>
<i>KNAT6</i>	<i>Knotted-Like Arabidopsis thaliana 6</i>
<i>KNAT2</i>	<i>Knotted-Like Arabidopsis thaliana 2</i>
<i>KNOX</i>	<i>Knotted-like homeobox</i>
LB	Medio Luria-Bertani
<i>LBa1</i>	<i>Left border primer a1</i>
<i>LBb1.3</i>	<i>Left border primer b1.3</i>
<i>LEC</i>	<i>Leafy cotyledon1</i>
<i>LP</i>	<i>Left Primer</i>
<i>LRP1</i>	<i>Lateral Root Primordial</i>
<i>LR</i>	<i>Large Reverse Primer</i>
Lys, K	Lisina
MCS	Sitios de clonación múltiple
MS	Medio Murasshige and Skoog
<i>NF-YB6</i>	<i>Nuclear Factor Y, Subunit B6</i>
N-terminal	Extremo amino
pb	pares de bases
<i>PcG</i>	Grupo Polycomb
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Plásmido Ti	Plásmido inductor de Tumores
<i>RP</i>	<i>Right primer</i>

<i>RPD1</i>	<i>Root Primordim Defective 1</i>
RT-PCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
Ser,S	Serina
SET	Dominio presente en Su (var)- E (z)- Trithorax
<i>ShF</i>	<i>Short Forward Primer</i>
<i>ShR</i>	<i>Short Reverse Primer</i>
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
STM	<i>Shoot Meristemless</i>
Su (var)	Supresor de variegación
T-DNA	ADN de Transferencia
TM	Temperatura de alineamiento
<i>trxG</i>	Grupo Trithorax
UV	Ultra violeta
<i>vir A</i>	two-component VirA-like sensor kinase
<i>vir B</i>	<i>type IV secretion system pilin subunit VirB2</i>
<i>vir C</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>vir D</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>vir E</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>vir F</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>vir G</i>	<i>operon transcriptional activator</i>

UNIDADES INTERNACIONALES

°C	grados centígrados
fm	femtomoles
h	horas
Kv	Kilo Volts
m ²	metros cuadrados
mg	miligramos
ml	mililitros
ng	nanogramos
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
μl	microlitros
μm	micromoles

RESUMEN

Con el secuenciamiento del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, se iniciaron una serie de estudios para conocer la función de cada uno los genes presentes en este organismo. Actualmente se están realizando investigaciones para conocer si la función de genes pertenecientes al Grupo Trithorax (inicialmente identificados en *Drosophila melanogaster*), y en particular de factores epigenéticos pertenecientes a la familia Trithorax, es similar tanto en animales como en plantas. Con este fin, nos hemos dado a la tarea de estudiar en *Arabidopsis thaliana* la función del gen *ATX3*, el cual es homólogo al gen trithorax de *Drosophila* (miembro del Grupo Trithorax y con una probable función en el desarrollo embrionario), el gen *ARABIDOPSIS TRITHORAX HOMOLOG-3*, *ATX3*, y del cual hasta el momento no existe reporte alguno sobre su función específica en plantas. En las plantas mutantes (*atx3*) se observa un fenotipo en el que se ve afectado principalmente el desarrollo embrionario. Este fenotipo se puede relacionar directamente a la mutación presente en *A. thaliana*, debido a que las líneas con las que hemos trabajado son homocigóticas a la mutación (*atx3*), lo cual se confirmó mediante una genotipificación, y con lo que se asegura la interrupción del gen en ambas cadenas del ADN; característica conferida mediante la inserción del T-DNA presentes en las líneas mutadas. Una vez que determinamos la presencia de la mutación en *A. thaliana* se llevó a cabo un análisis de la expresión tanto de *ATX3* como de otros genes relacionados con el desarrollo embrionario. De esta forma se pudo establecer una conexión entre la reducción en la expresión de *ATX3* y los cambios de expresión de algunos genes seleccionados, en diferentes tejidos de la planta. Relación aparentemente estrecha si se parte de la probable función de *ATX3* como metiltransferasa de histonas.

Esta afectación en la expresión génica y en el desarrollo embrionario revela grandes hallazgos respecto a la posible función de este gen, lo que permite tener grandes expectativas a nuevos hallazgos que permitan establecer la función molecular de *ATX3* en plantas.

Otra forma de conocer la expresión de *ATX3* es mediante fusión de la región promotora del gen a un gen reportero (GUS), la transformación de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens*, y la determinación espacio-temporal de la expresión del reportero. Hemos iniciado con estos estudios y el análisis de su expresión complementará los análisis realizados por RT-PCR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Organización del ADN en eucariotas

La organización del ADN en las células de los organismos eucariotas, presenta un elevado nivel de compactación determinado por interacciones del ADN con proteínas (cromatina). Esta compactación permite que toda la información genética se encuentre agrupada en el núcleo de la célula (Recillas *et al.*, 2004).

La cromatina tiene como unidad estructural al nucleosoma, una estructura conformada por histonas y ADN. Las histonas son proteínas conservadas evolutivamente que se agrupan en un octámero proteico, esto es, un tetrámero conformado por las histonas H3/H4 y dos dímeros de H2A/H2B (Figura 1A); en el cual se enrolla el ADN y de cuya estructura central sobresalen los extremos amino ricos en aminoácidos básicos, como lisinas (Lys, K), argininas (Arg, R) y serinas (Ser, S). Además otras proteínas histónicas denominadas “linker histones”, como por ejemplo H1 ó H5, las cuales tienen la función de enlazar los nucleosomas para formar de un nivel de compactación superior (Figura 1B) (Recillas, 2000).

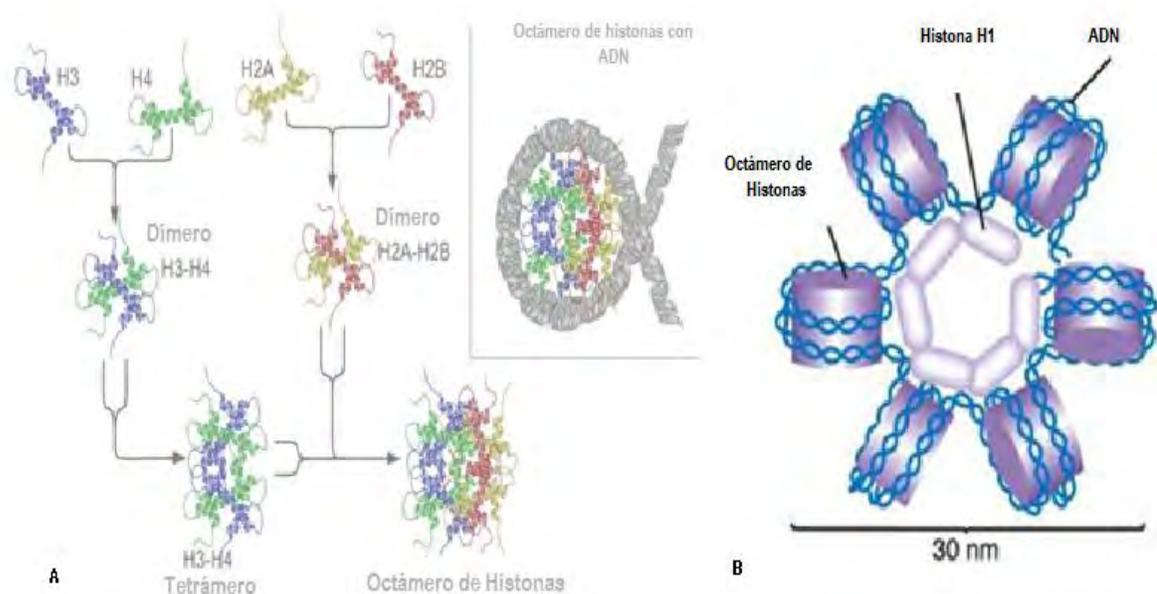


Figura 1. Tipos de histonas, conformación del octámero y estructura de nucleosoma. **A.** Tipos de histonas. Estructuración de la histonas H2A,H2B, H3 y H4 para la formación del octámero. **B.** Estructura del nucleosoma. Enrollamiento del ADN alrededor del octámero para la formación del nucleosoma.

1.2 Regulación de la expresión génica en eucariotas

La expresión genética en los eucariotas está altamente controlada por mecanismos activadores o represores de la expresión de genes, influenciados tanto por la estructura de la cromatina como por las interacciones con los factores de transcripción con el promotor. Estructuralmente la cromatina puede presentar diferentes grados de empaquetamiento pudiéndose encontrar en forma muy compacta (heterocromatina) o en forma ligeramente compactada (eucromatina). El nivel de compactación de la cromatina es un factor determinante en la expresión génica. La presencia del estado menos empaquetado de la cromatina (eucromatina), permite la formación de complejos que promueven la activación de la expresión génica, debido a que el ADN se encuentra más expuesto. Mientras que la heterocromatina donde el nivel de compactación de ADN es mayor, se vea silenciada la expresión génica, debido a la poca disponibilidad de estructuras del ADN que permitirían la formación de complejos activadores de la expresión génica.

Además, el nivel de compactación de la cromatina afectarse debido a las posibles interacciones de las histonas con otras proteínas, y a que las histonas presentan una región amino terminal más accesible a sufrir modificaciones químicas post-traduccionales (Verdone *et al.*, 2006). Dentro de estas modificaciones se encuentran, por ejemplo: la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinización, etc; todas éstas con efectos sinérgicos o antagónicos en la regulación transcripcional de un gen (Ooi *et al.*, 2007).

La metilación de las histonas tiene distintos efectos en la expresión génica, activándola o silenciando su expresión. Estas modificaciones son llevadas a cabo por enzimas que reciben el nombre de metiltransferasas de histonas. Las metiltransferasas de histonas regulan la expresión génica a partir de modificaciones covalentes, al adicionar un grupo metilo principalmente a las lisinas o argininas en el N-terminal de las histonas, alterando así la estructura de la cromatina. Por lo que la metilación se define como un marcaje que regula la expresión génica en eucariotas (Sims *et al.*, 2003).

Se ha visto que la metilación en la histona 3 (H3) principalmente interviene principalmente en la regulación de la expresión génica en eucariotes. Esta regulación se relaciona con las modificaciones químicas que se dan en los extremos amino presentes en la proteína (Peterson *et al.*, 2004).

Actualmente se han identificado cinco lisinas dentro de la histona H3 que son las más frecuentemente afectadas por la adición del grupo metilo. Estas lisinas son: Lys 4, 9, 27, 36 y 79. Se denominan así por el lugar que ocupan en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En estudios recientes ha demostrado que la metilación de las Lys 9 y 27 están relacionadas con el silenciamiento de genes en mamíferos, en donde uno de los procesos más sobresalientes afectados por la modificación química es la inactivación del cromosoma X. Por el contrario, las metilaciones en las Lys 4 y 36 se asocian más con la activación génica debido a la participación que tienen en las vías de activación de transcripción de genes para la regulación del desarrollo en eucariotes (Tariq *et al.*, 2004).

1.3 Epigenética y factores epigenéticos

Las modificaciones de la estructura en la cromatina que regulan la expresión genética son consideradas como parte de la regulación epigenética. La epigenética estudia los cambios a nivel estructural de la cromatina y se refiere a los cambios meióticos y/o mitóticos en la expresión génica que no son debidos a cambios en la secuencia del ADN. El análisis de los mecanismos que regulan activación de la expresión o represión de los genes mediante modificaciones en la estructura de la cromatina suele tener un mayor alcance cuando se han identificado los polipéptidos productos de la expresión génica. Estos polipéptidos pueden ser proteínas que forman complejos con la cromatina, modificándola y afectando la expresión de los genes.

La regulación de la expresión de los genes entre animales y vegetales presenta grandes diferencias. Estas diferencias se deben principalmente a que el ambiente, desarrollo y reproducción no presentan características en común. Sin embargo, debido a la similitud de procesos biológicos existentes en estos dos grupos se ha sugerido que los factores y/o procesos por los cuales se regula la expresión de ciertos genes en diferentes estadios del desarrollo presentan homólogos en ambos grupos. Actualmente han sido ampliamente estudiados genes de factores epigenéticos de mamíferos en comparación con el estudio de los genes homólogos en plantas, poco se sabe acerca de las funciones que tienen estos genes en el desarrollo y reproducción de las plantas.

Algunos de los fenómenos epigenéticos son la metilación del ADN, el RNA de interferencia, la co-supresión, paramutación, modificación de histonas, variantes de las histonas y regulación de estados epigenéticos por proteínas con dominio SET (**Su**(var)3-9, **E**(z), **Trithorax**) y forman parte estos últimos de los Grupos Polycomb (*Pcx-G*, por sus siglas en inglés) y Grupo Trithorax (*trx-G*, por sus

siglas en inglés). El dominio SET de estas proteínas es un dominio altamente conservado, formado por 130 aminoácidos y con una función muy importante ya que puede metilar lisinas específicas presentes en las histonas (Rea *et al.*, 2000), provocando cambios en la estructura de la cromatina, y logrando mayor o menor afinidad hacia factores de transcripción.

Estos grupos se identificaron inicialmente en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): el Grupo Polycomb por la función que tienen de reprimir la expresión de genes y Grupo Trithorax el cual mantiene estados activos de expresión génica.

1.4 Grupo Trithorax

El Grupo Trithorax incluye proteínas involucradas en el control epigenético, las cuales se encargan de mantener activa la expresión de genes (Jones *et al.*, 1993; Dorn *et al.*, 1993; Tschiersch *et al.*, 1994; Stassen *et al.*, 1995). Este grupo codifica para proteínas nucleares, las cuales presentan características de dedos de Zinc y otras que poseen el dominio SET altamente conservado y localizado en el extremo carboxilo (Yu *et al.*, 1998).

Los productos obtenidos a partir de la expresión génica de los miembros del Grupo Trithorax, y en particular de los miembros de la familia Trithorax (genes homólogos al gen trithorax de *Drosophila*), presentan actividad de metiltransferasa de histonas. La transferencia del grupo metilo a las Lys presentes en las regiones amino-terminales de las histonas representa un marcaje fundamental en la regulación génica. Esta modificación química promueve la formación de complejos que a su vez permitirán activación de la expresión génica.

El Grupo Trithorax incluye tanto la familia de genes homólogos al gen *trithorax* como a la familia de genes homólogos al gen *ASH1* de *Drosophila*. Los genes que constituyen estas familias son responsables de controlar ciertos mecanismos de la regulación genética en eucariotas (Dorn *et al.*, 1993).

1.5 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

El uso de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo se debe principalmente a la facilidad con la que se puede manipular esta especie. Un organismo modelo es aquel en el que se concentran gran número de investigaciones con el fin de obtener conclusiones que puedan ser aplicables a otras especies similares (Bolker, 1995). En la elección de una planta modelo se deben tomar en cuenta características que la hacen propicia para realizar estudios en ella. En el caso de *A. thaliana*, estas

características son: tamaño pequeño, ciclo de vida corto, presenta un genoma pequeño (125 Mb) repartido en cinco pares de cromosomas (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), presenta un tamaño pequeño y condiciones de desarrollo modificables (Bennett *et al.*, 2003). La secuenciación del genoma de *A. thaliana* así como de otras plantas ha permitido identificar familias de genes homólogos a genes de animales metazoos lo cual abre un nuevo campo de estudio en las plantas. El descubrimiento de estas familias de genes homólogos abre un nuevo campo de estudios el cual incrementará el conocimiento actual de la función de los mismos en las plantas. Una de estas familias encontradas en el genoma de *A. thaliana* es la familia de genes homólogos pertenecientes al Grupo Trithorax (Álvarez-Venegas *et al.*, 2002).

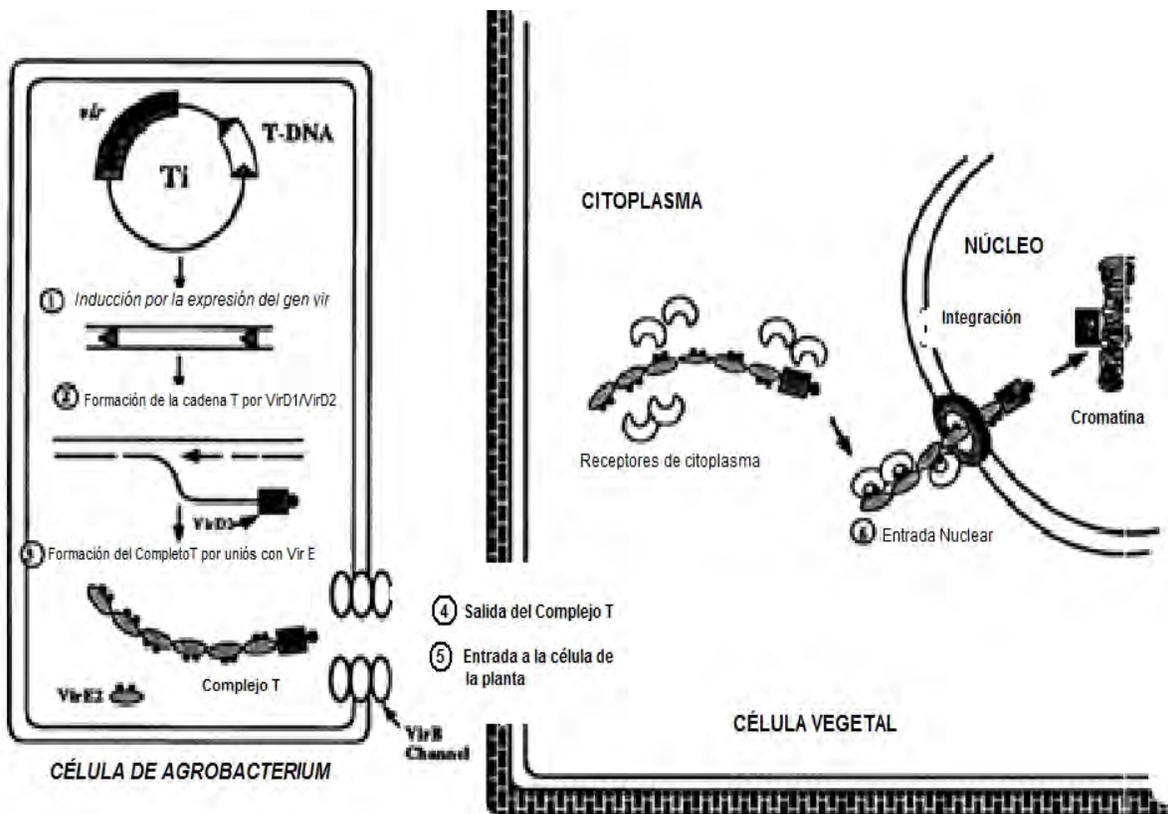
1.6 Generación de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para estudio de funciones génicas

La generación de mutantes a través de herramientas de la ingeniería genética es una técnica comúnmente utilizada para conocer el efecto que tiene el silenciamiento parcial o total de un gen. Con ello se intenta explicar: la función del gen en el organismo y los mecanismos de regulación génica involucrados a la expresión del mismo. Las mutaciones en muchas ocasiones involucran un fenotipo característico que ayuda al mejor entendimiento de lo esencial que representa la expresión del gen en el organismo.

La transformación de *A. thaliana* puede generarse por distintos métodos: como genéticos (T-ADN, transposones), agentes químicos (etil metano Sulfonato), físicos (UV), biológicos (inserción de virus). Una de las técnicas de mayor uso es la transformación de *Arabidopsis thaliana* con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria contiene un plásmido que induce a la formación de tumores denominado plásmido Ti, por sus siglas en inglés. Dentro de este plásmido se encuentra una secuencia denominada ADN de transferencia (T-DNA por sus siglas en inglés) que es la parte del plásmido que se transfiere al genoma de la planta. La bacteria usa ciertas señales químicas de la planta como son la presencia de compuestos como monosacáridos, fenoles, bajo pH o bajos niveles de fosfato. La infección se logra debido a la transferencia y expresión de ADN de oncogenes contenidos en el T-ADN de *A. tumefaciens* a la planta.

El plásmido Ti dentro de su estructura presenta los genes *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* y *virG*, importantes en el sistema de transducción de señales. Estas señales se logran ya que se activa *virG* mediante fosforilación, lo que coordina la expresión de los demás genes *virA-virG*. Las proteínas obtenidas de la expresión de estos genes junto con una proteína denominada ChvE

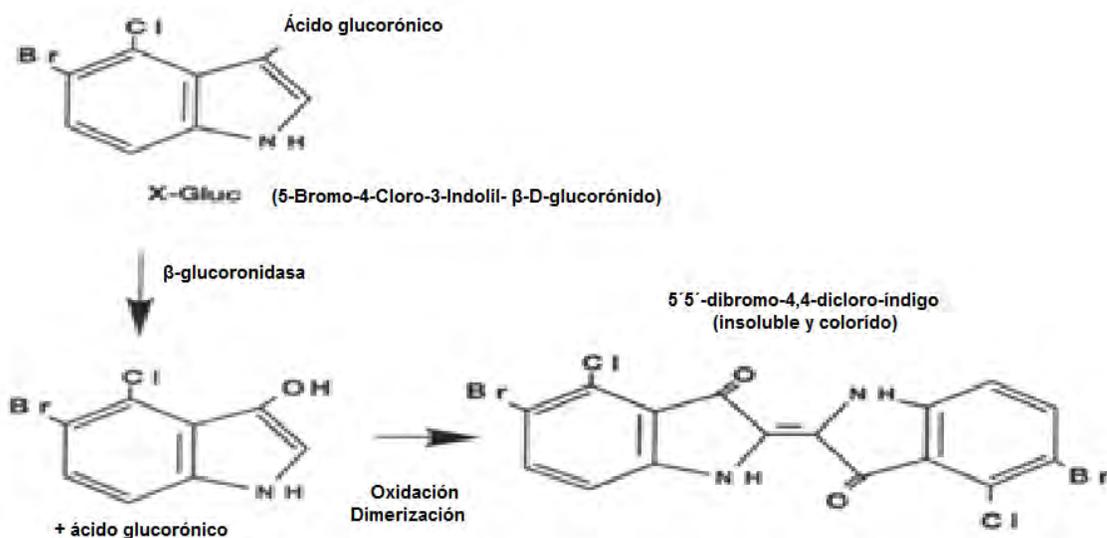
(Proteína de unión de azúcares), media la percepción de la bacteria con la planta. Este complejo proteico induce a dos fases de la infección: a) Se procesa el T-ADN para llevar a cabo la transferencia de un sustrato llamado Complejo T y b) posteriormente se libera el complejo T a la planta (Esquema 1). El T-ADN es integrado en el genoma de la planta mediante transferencia y expresión de oncogenes, esto trae como consecuencia la desregulación del ciclo celular de las células infectadas y por tanto induciendo la formación de tumores (Christie, 1997). Y en el caso de la generación de plantas mutagenizadas, el T-ADN integrado en el genoma de la planta permite la alteración de la secuencia génica.



Esquema 1. Mecanismo de infección de *Agrobacterium tumefaciens* a la planta (Zupan *et al.*, 1995)

Desde que se tuvo conocimiento del genoma de *A. thaliana* y con el aprovechamiento del mecanismo de infección natural de la bacteria a la planta se generó una biblioteca de mutantes, para estudio de las diferentes familias de genes que existen en la planta (Bent *et al.*, 2000). Existen diferentes líneas mutagenizadas para un mismo gen, dependiendo del lugar donde se realice la

inserción del T-ADN, como son en el promotor, en los exones y en los intrones. Las mutaciones en el promotor pueden afectar o no completamente la expresión del gen, ya que la expresión del mismo puede afectarse por otros factores que contribuyan a su expresión, como son la formación de complejos proteicos dependientes del tejido y estadio del desarrollo de la planta. Sin embargo las secuencias utilizadas en las transferencias de ADN son producidas de forma artificial. Además, en estos plásmidos se puede agregar una secuencia de un gen que se denomina gen reportero. El uso de genes reporteros en este tipo de ensayos ayuda al análisis en la expresión del gen de interés. El gen reportero es una secuencia que va a depender de la expresión de la secuencia regulatoria que nos interesa expresar en la planta. La expresión de estos genes podrá ser verificada mediante métodos químicos. En este caso particular se utiliza el gen reportero *GUS* que codifica para la enzima β -glucoronidasa, la cual en presencia del reactivo X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónico) éste reacciona con la enzima producida en el tejido y se torna azul (Esquema 2).



Esquema 2. Reacción química de la enzima β -glucoronidasa con el reactivo ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónico (X-gluc).

Dentro de estas bibliotecas de mutantes se encuentra la mutación en el gen *ATX3*. Gen que presenta homología al presente en *Drosophila*, como anteriormente se mencionó, y que basado en lo que se ha observado en mamíferos se busca dilucidar su función en plantas. La mutante (*atx3*)

presenta un fenotipo característico ya que afecta al desarrollo embrionario en *A. thaliana*, lo cual nos permite profundizar acerca de la función de *ATX3* en el desarrollo de la misma.

1.7 Embriogénesis en *Arabidopsis thaliana*

La flor es la estructura de la planta que dará lugar a más generaciones de la misma especie. Las estructuras que la conforman son los pétalos, sépalos, gineceo y estambres (Figura 2). El gineceo es la parte femenina de la planta debido a que en este se encuentran los óvulos y donde se llevará a cabo la polinización. Esta fecundación se debe a los granos de polen que se encuentran en los estambres, parte masculina de la planta.

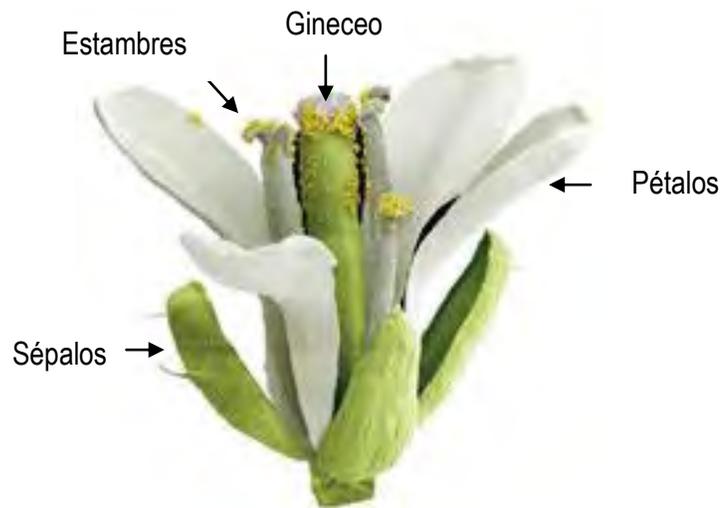


Figura 2. Esquema de las estructuras que conforman la flor de *A. thaliana*. Sépalos, pétalos, estambres y gineceo.

La autopolinización en *A. thaliana* comienza con la formación del tubo polínico que deposita el polen dentro de los óvulos. Dos células son depositadas para llevar a cabo una doble polinización. La polinización se lleva a cabo en la célula central y la célula huevo, células presentes en el óvulo (Figura 3).

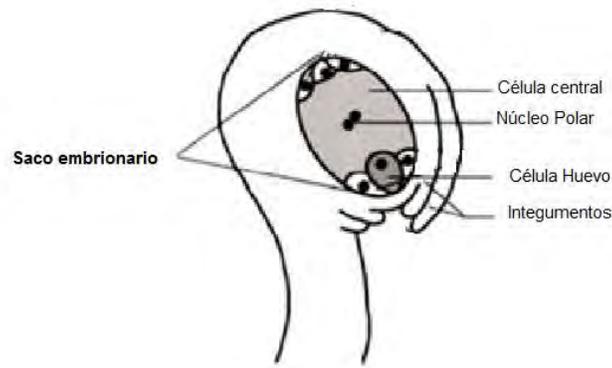


Figura 3. Esquema del óvulo. Se observan el saco embrionario como capa exterior. Dentro de éste se observa la célula central y la célula huevo que son las estructuras donde se lleva a cabo la polinización para la formación del embrión. (Berleth T and Chatfield S, 2002).

Cuando la célula huevo es polinizada, dará origen a una célula diploide que tendrá como resultado la generación de semillas que darán lugar a una nueva generación de la planta, y la otra polinización es en la célula central, la cual servirá para formar el endospermo, una estructura de almacenamiento de lípidos y carbohidratos que funciona como fuente energía para la germinación de las semillas. La formación del embrión da lugar a diferentes etapas de división celular y diferenciación, que concluirá con la formación de una semilla madura (Figura 4).

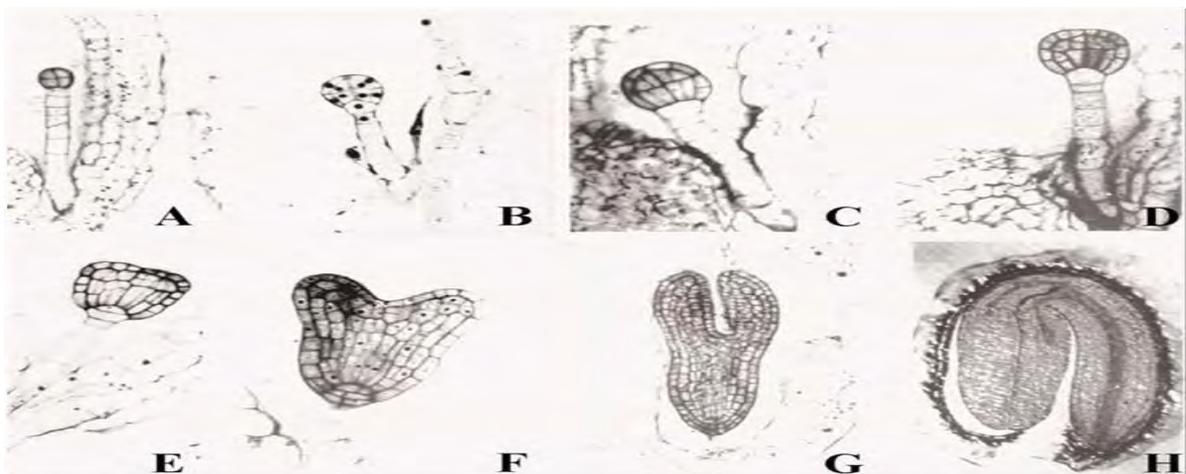


Figura 4. Etapas de formación del embrión. A Etapa octante en la cual se observan cuatro cuadrantes por lo que se tienen de 8 células. B Etapa Dermatogeno. C Etapa globular. D. Etapa Procambial. E. Etapa Triangular. F Etapa Corazón. G. Estapa Media torpeda. H. Etapa cotyledon doblado (West M and Harada J 1993).

Una vez que comienza el desarrollo embrionario queda sólo la estructura central de la flor (silicua) debido a la pérdida de pétalos, sépalos y estambres (Figura 5). Al término de las etapas de desarrollo embrionario dará lugar a las semillas.



Figura 5. Silicua. Estructura donde se lleva a cabo el desarrollo embrionario y posteriormente la maduración de las semillas (Gusti A. *et. al*; 2009).

2. MARCO TEÓRICO

Recientemente se han encontrado genes homólogos de la familia de genes Trithorax en *A. thaliana*, denominados *ATX* ("Arabidopsis trithorax homologs" por sus siglas en inglés). En estos estudios sólo se ha mencionado la presencia de cinco genes pertenecientes a la familia Trithorax, *ATX1-ATX5* (Baumbusch *et al.*, 2001; Álvarez-Venegas *et al.*, 2002). Esta clasificación es por el orden en que se identificaron los genes en el genoma de la planta.

De estos cinco genes homólogos presentes sólo se han llevado a cabo estudios parciales sobre la caracterización de los genes *ATX1* y *ATX2*, presentes en el cromosoma 2 y 1, respectivamente, y que presentan gran similitud entre ellos tanto en su estructura como en la variedad de aminoácidos que lo conforman (Saleh *et al.*, 2008).

Se ha encontrado igualdad de función de *ATX1* y *ATX2* en la regulación genética. Esto es, ambas proteínas poseen actividad de metiltransferasa de histonas, ambas metilan la lisina 4 (K4) de la histona 3 (H3), pero se ha descrito que *ATX1* presenta actividad de trimetilasa y *ATX2* es una dimetilasa. (Álvarez-Venegas *et al.*, 2003). Se encontró que la mutación de *ATX1* tiene un efecto pleiotrópico en el desarrollo de la planta. La mutación en esta línea presentó diferencias físicas visibles a pocos días de su desarrollo, esto comparado con la línea silvestre (Álvarez-Venegas *et al.*, 2003).

La mutante de *ATX2* (*atx2*) sintetizó ARNm incompleto, los fenotipos que se expresan en esta mutación no fueron fácilmente distinguibles a los pocos días de su desarrollo. Se observó que el 20% de las flores sufrían un retraso en el crecimiento después de la fertilización, a diferencia de la línea mutada *atx1* (Álvarez *et al.*, 2003).

Actualmente no existe información disponible de su posible función del gen homólogo *ATX3*, sólo se conoce el fenotipo que causa la mutación de este gen, que es un desarrollo embrionario incompleto.

3. HIPÓTESIS

Arabidopsis Trithorax Homolog-3, *ATX3* tiene una función homóloga al gen encontrado en mamíferos por lo que la mutante de este gen debe afectar al desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar el efecto de la mutación en el gen *Arabidopsis Trithorax Homolog-3*, *ATX3*, el desarrollo embrionario: fenotípica y molecularmente.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Genotipificar la línea mutante (*atx3*).
- 4.2.2 Determinar la expresión de *ATX3* en la línea silvestre en distintos tejidos.
- 4.2.3 Determinar la expresión de *ATX3* en la línea mutante.
- 4.2.4 Analizar fenotipo y tipo de mutación.
- 4.2.5 Determinar la expresión de distintos genes homeóticos, tanto en la línea silvestre y la mutante como en distintos tejidos.
- 4.2.6 Clonar el promotor de *ATX3* en el vector binario pCambia1303 y transformar *Arabidopsis thaliana*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo y condiciones de crecimientos de las líneas de *Arabidopsis thaliana*

5.1.1 Germinación de las semillas

5.1.1.1 Estratificación en frío o vernalización artificial de semillas para cultivo

Las semillas de la línea silvestre de *A. thaliana* (*Col 0*) y las líneas mutagenizada *atx3* (Salk_077913 y Salk_103054C) se almacenaron a 4° C por 72 h. La temperatura favoreció la germinación uniforme de las plantas en las condiciones de desarrollo que se describen posteriormente.

5.1.1.2 Desinfestación de semillas y cultivo en caja Petri

Posteriormente, las semillas se desinfestaron (Protocolo I) y se sembraron en cajas Petri con medio MS sólido (Protocolo II). Una vez desinfestadas se colocaron en agua y con una micropipeta se distribuyeron en toda la caja Petri (aproximadamente 50 semillas en cada caja). Todo el procedimiento se llevó a cabo en la campana de flujo laminar. Posteriormente las cajas se incubaron en una cámara de crecimiento (modelo AR36L3C8 PERCIVAL) bajo las siguientes condiciones: Temperatura 24° C, 50% de humedad relativa, con un periodo de luz de 16 h y un periodo de oscuridad de 8 h con una intensidad luminosa de 250 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$.

5.1.1.3 Cultivo en suelo

Después de 8 días de incubación, las plantas se transfirieron a macetas (350 ml) con suelo. Estas macetas se colocaron en charolas (12 macetas en cada charola), y se cubrieron para evitar que las semillas de las distintas líneas se mezclaran debido a la propagación. Las macetas se mantuvieron en la misma cámara y bajo las condiciones adecuadas para su crecimiento. Las plantas se regaron con agua cada 3 días para no someterla a estrés y con ello alterar el crecimiento y desarrollo normal. Las macetas se fertilizaron una vez cada semana con una dilución de medio B5-A (Protocolo III), con el fin de que la planta tuviera los nutrientes necesarios para su desarrollo.

5.2 Recolección de semillas

La recolección de semillas se realizó 2 ó 3 semanas (aproximadamente) después de la autopolinización. La semillas se recolectaron cuando alcanzaron su etapa de madurez (2-3 semanas aproximadamente) fueron recolectadas. La desecación de las silicuas hace visible esta etapa de

madurez. Las semillas se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml etiquetados y se mantuvieron a 4°C. Esta recolección tiene el propósito de mantener el germoplasma de las líneas estudiadas.

5.3 Análisis del fenotipo en las líneas silvestre y mutante

El fenotipo nos permite observar los rasgos físicos visibles que se presentan en una línea mutante. Se analizaron las líneas mutagenizadas de *atx3*: Salk_077913 (inserción del T-ADN en el promotor) y Salk_103054C (inserción del T-ADN en la región UTR3'), estas líneas presentaron un fenotipo característico, ya que en esta línea se observó un desarrollo embrionario incompleto debido a la mutación del gen *ATX3* sin importar el lugar en el que se presente la inserción del T-ADN. Estas características fenotípicas de la línea mutante fue lo que impulsó a realizar un análisis exhaustivo para conocer que otras implicaciones tiene *ATX3* en el desarrollo de *A. thaliana*.

El análisis se realizó mediante un seguimiento del desarrollo de la línea silvestre y la mutante *atx3* (Salk_077913). Se llevó a cabo una documentación del crecimiento de ambas líneas mediante toma de fotografías en diferentes etapas de desarrollo. Una vez que ambas líneas presentaron silicuas se llevó a cabo una prueba de viabilidad de la semilla de la línea mutante mediante la determinación de su porcentaje de germinación.

5.4 Genotipificación de la línea mutagenizada *atx3*

La genotipificación permite conocer la variabilidad de alelos presentes en un organismo. Así como también las consecuencias en el fenotipo debido a mutaciones presentes en cada una de estas variantes alélicas. En este caso se buscaron líneas homocigóticas que llevarán el inserto del T-ADN en los dos alelos del mismo tipo, con el fin de asociar completamente el fenotipo visible (desarrollo incompleto de embriones) en las líneas mutadas. De esta manera confirmaremos la presencia de generaciones de mutantes homocigóticas, debido a la inserción del elemento T-DNA.

Para llevar a cabo la genotipificación se extrajo ADN de hojas tanto de la línea mutante como de la silvestre, mediante el Método de Urea (Protocolo IV). A través de la técnica molecular de PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen) se utilizaron oligonucleótidos para amplificar las secuencias específicas del inserto de T-ADN en cada una de las líneas.

Con ello se esperaba la amplificación de secuencias del inserto únicamente en el ADN de la línea mutante y ningún producto amplificado proveniente del ADN de la línea silvestre.

La técnica para la amplificación del inserto consistió en el uso de distintos pares de oligonucleótidos (Tabla 1). En las reacciones de PCR para la genotipificación se utilizaron las siguientes mezclas de oligonucleótidos: *LP-RP* y *LBa1-RP* ó *LP-RP* y *LBb1.3-RP*.

Tabla 1 .Oligonucleótidos para genotipificación Nombre, secuencia, tamaño de fragmento amplificado y TM de PCR de los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la genotipificación.

Nombre de Oligonucleótidos	Secuencia de oligonucleótido Forward	Secuencia de oligonucleótido Reverse	Tamaño de fragmento amplificado	TM de PCR
Left Primer- Right primer	TTCAGGATTCGTGGCACTATC	ATGAAGGAGACACACACCGTC	900 pb	56° C
LBa1 -Right primer	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	ATGAAGGAGACACACACCGTC	500 pb	56° C
LBb1.3 - Right primer	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	ATGAAGGAGACACACACCGTC	600 pb	56° C

Las secuencias blanco del par de oligonucleótidos *LP-RP*, son interrumpidas por la inserción del T-ADN en el ADN genómico de la línea silvestre, de tal manera que se espera que únicamente en la línea silvestre el par de oligonucleótidos *LP-RP* amplifique un producto. En la Figura 6 se observa una representación gráfica de la inserción del T-ADN en el ADN genómico de la línea silvestre de *A. thaliana*. Esta inserción interrumpe la secuencia específica para los oligonucleótidos *LP-RP*.

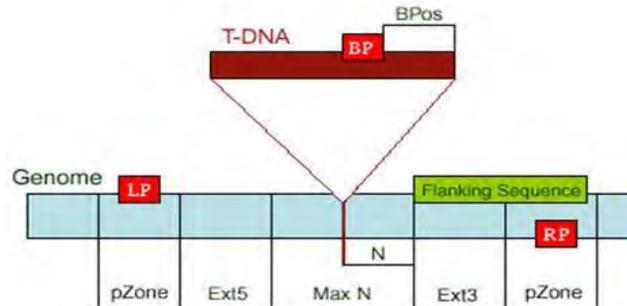


Figura 6. Inserción del T-ADN en el ADN genómico de la línea silvestre de *A. thaliana* para la generación de líneas mutantes.(<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Los otros pares de oligonucleótidos *LBa1-RP* y *LBb1.3-RP* deberían amplificar secuencias presentes solamente en la línea mutante, debido a que estas secuencias forman parte de la inserción del T-ADN.

Después de realizar la reacción de PCR con el ADN de las dos líneas usando las distintas combinaciones de oligonucleótidos los fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1.2% (Protocolo V), lo que nos permitió observar la presencia o no de la inserción del T-ADN en cada una de estas líneas, así como comprobar la homocigocidad de la línea mutante.

La Figura 7 es una representación gráfica de los productos que se esperan observar en la genotipificación, después de haber utilizado las diferentes mezclas de oligonucleótidos en la reacción de PCR. En esta se muestran los productos que se observarían en las variantes alélicas de la planta.

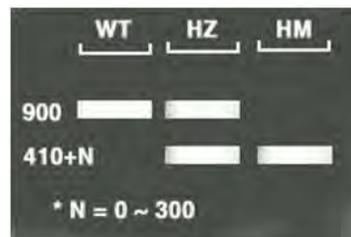


Figura 7. Productos obtenidos de la reacción de PCR para la genotipificación de las líneas de *A. thaliana*. se muestran las siglas **WT**, **HZ** y **HM**. Cada una de ellas corresponde a los siguientes términos: **WT** (línea silvestre), **HZ** (línea heterocigótica) y **HM** (línea homocigótica). (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

El producto visible en el espacio correspondiente a **WT** representa la amplificación correspondiente a la secuencia complementaria para los oligonucleótidos *LP-RP*, aunque en la misma reacción tenga el otro par de oligonucleótidos *LBa1-RP* ó *LB1.3-RP*, no amplificarían ninguna secuencia debido a que en la línea silvestre no hay presencia de T-ADN que es la secuencia complementaria de estos oligonucleótidos. Sin embargo para el caso **HZ** se presentan dos productos de amplificación correspondiente a la secuencia complementaria de los oligonucleótidos *LP-RP* debido a que en esta línea se conserva uno de los alelos silvestres, el segundo producto de amplificado es debido a los oligonucleótidos *LBa1-RP* ó *LBB1.3-RP*, ya que el otro alelo presente en esta línea tiene la inserción de T-ADN que es la secuencia complementaria de estos oligonucleótidos. Y la línea **HM** presenta sólo un producto de amplificación debido los oligonucleótidos *LBa1-RP* ó *LBB1.3-RP* que amplifican secuencias complementarias presentes únicamente en la inserción T-ADN y en esta línea ambos alelos presentan la inserción.

5.5 Determinación de la expresión de *ATX3* y genes relacionados con el desarrollo embrionario de *A. thaliana* en distintos tejidos de la línea silvestre y de la mutante.

La determinación de la expresión de genes relacionados con el desarrollo embrionario de *A. thaliana* es de particular importancia, debido a que el fenotipo de las mutantes *atx3* presenta un desarrollo embrionario incompleto. Debido a que *ATX3* forma parte del Grupo Trithorax, familia de genes que presentan como producto génico proteínas con actividad de metiltransferasa, se sospecha que *ATX3* podría tener una actividad similar. Actividad que sería de gran importancia en la regulación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo del embrión. La actividad enzimática de *ATX3* provocaría la transferencia de un grupo metilo a residuos de Lys presentes en las histonas, lo que induciría la remodelación de la cromatina en donde se encuentran localizados estos genes. Esta remodelación traería como consecuencia la activación de la expresión de los mismos, si *ATX3* presentara homología con la función reportada en *ATX1* (Álvarez- Venegas *et al.*, 2001).

Basados en la hipótesis anterior se determinó conocer cómo está siendo afectada la expresión de estos genes en la línea mutante, debido a que la mutante *atx3* podría presentar bajos niveles o nula expresión para este gen. Se ha reportado que los genes *EXO70A1*, *KNAT2*, *KNAT6*, *CYP71*, *LRP1*, *CRANE/IAA18*, *ATHB53*, *KNAT1*, *FUS*, *LEC*, *NFYB6F*, *FBL17F*, *WRKY25F* y *PAD1* están involucrados de forma directa o indirecta en algún estadio del desarrollo embrionario de la planta. Por lo que se decidió determinar la expresión de estos genes en distintos tejidos de la línea mutante. Los niveles de expresión observados en la línea silvestre para cada uno de los genes estudiados permitieron conocer la expresión normal de cada uno de ellos en el desarrollo de la planta.

A la vez también se obtuvo el patrón de expresión del gen *ATX3* con el fin de confirmar que efectivamente el fenotipo de desarrollo embrionario incompleto observado en la línea mutante estuviese asociado a la baja o nula expresión de este gen. Por lo que también, además de los genes mencionados anteriormente, se determinó la expresión de éste gen en diferentes tejidos de la línea mutante. El patrón de expresión de *ATX3* en la línea mutante fue comparado con el patrón de expresión del mismo en la línea silvestre para poder conocer su expresión en el desarrollo normal de *A. thaliana*.

5.5.1 Extracción de ARNm de diferentes tejidos de la línea silvestre y mutante para generación de ADNc

Para llevar a cabo la determinación de la expresión génica, se siguió la metodología que se presenta a continuación. Se extrajo ARNm (Protocolo XII) de hojas y flores de ambas líneas (silvestre y mutante). La calidad de este ARNm se verificó mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (Protocolo XIII). Una vez que se observó el ARNm de ambos tejidos se utilizó para generar ADNc por medio de una RT siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). De esta RT se obtuvo ADNc de hoja y ADNc de flores que sirvió para producir la amplificación de las secuencias de cada uno de los genes, mediante las reacciones de PCR en las que se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen (Tablas 2-3).

Se utilizó ADNc de hoja y ADNc de flores para las determinaciones de la expresión de *ATX3*. Se realizaron distintas mezclas para llevar a cabo reacciones de PCR siguiendo condiciones recomendadas por el fabricante (Invitrogen). En una de estas mezclas se utiliza el ADNc de hojas y en otra el ADNc de flores.

En ambas reacciones se utilizaron los oligonucleótidos específicos para *ATX3* *ADNc* y como control positivo se usó el gen *actina* *ADNc* (Tabla 2).

Tabla 2 .Oligonucleótidos para la determinación de la expresión de *ATX3* en diferentes tejidos de las líneas estudiadas. Nombre, secuencia, tamaño de fragmento amplificado y TM de PCR de oligonucleótidos.

Gen	Secuencia de oligonucleótido Forward	Secuencia de oligonucleótido Reverse	Tamaño de fragmento amplificado	TM de PCR
<i>ATX3 ADNc</i>	TAGTAATTGATGCCACAGACTCTGGG	TCAAGGGATTTCCCGTAAGCTAGC	370 pb	56° C
<i>Actina ADNc</i>	GGC CGT TCT TTC TCT CTA TGC C	GGC TGT CTC TAG CTC TTG CTC G	290 pb	56° C

Los productos obtenidos de esta amplificación mediante la reacción de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.2% (Protocolo V). Las bandas observados en el gel fueron reconocidos por el peso molecular esperado según la tabla 2, lo cual permitió conocer la expresión de *ATX3* en las líneas estudiadas.

Para determinar la expresión de los demás genes se utilizó tanto el ADNc de flores como ADNc de hojas de las dos líneas. En ambas mezclas se utilizaron cada uno de los oligonucleótidos específicos para cada gen descritos en la Tabla 3. Los productos de amplificación obtenidos de la reacción de PCR se observaron de la misma forma que para *ATX3*.

Tabla 3. Oligonucleótidos para la determinación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario de *A. thaliana*.

Gen	Secuencia de oligonucleótido Forward	Secuencia de oligonucleótido Reverse	Tamaño de amplificado	TM de PCR
<i>ATX3</i>	TAGTAATTGATGCCACAGACTCTGGG	TCAAGGGATTTCCCGTAAGCTAGC	370 pb	56 °C
<i>EXO70A1</i>	GATGAGTTGCATCAGAGACAATCG	TTGACACTGCATATACAATAGCAACG	357 pb	56 °C
<i>KNAT2</i>	GAAGCTACCAAGAGAAGCAAGACAAGC	CCAATACAATGTCTCGTTACGCC	389 pb	56 °C
<i>KNAT6</i>	CTCTTCTTGATTGGTGAATCTCC	TGAGTGAGTGAAGATCCATTTTCAT	339 pb	56 °C
<i>CYP71</i>	GCTACACCGTGGCTAGACAATAAGC	AACATTGGTGTGTCGTGTTGTCG	504 pb	56 °C
<i>LRP1</i>	GGATGATGAGTACGCGTACCAAGC	ATCTGTCGATACGTCGCTGTTGC	386 pb	56 °C
<i>CRANE/IAA18</i>	GCTCTTCAGAGGTCTTCTTGACAGC	TGCACTGTTTGGTCTTTGAGTTCC	453 pb	56 °C
<i>ATHB53</i>	AGGAATTGATGCAGAGGATGTTCCG	ATGAAGCTTCCCGTAATTTCTCG	358 pb	56 °C
<i>KNAT1</i>	TGCCAACTCGAGTCTCAGATATTG	CATGAGTTGCATCAATAAAGCACG	295 pb	56 °C
<i>FUS</i>	CAAGGATCGAAAACACTGTGG	CACCATCAAGAATACCATGAGC	339 pb	56 °C
<i>LEC</i>	AGAGACCGATCGTGGTCTG	CAACACTTTTCTTAAAGAAGCAAC	390 pb	56 °C
<i>NFYB6F</i>	GCCTAATGGGACCATGACC	CTTTACCACAAGACAGATCAGATG	362 pb	56 °C
<i>FBL17F</i>	GAACCATATGCCACGGAAAC	CGAAGCAATTGGAGAACAATG	291 pb	56 °C
<i>WRKY 25F</i>	CATGGATTCCGAAGATCACAAGAG	CCACTCTACATGGCCTAATTAATGAT	279 pb	56 °C
<i>PAD1</i>	TTAAGCTTGCTATCCGTGCTCTGC	CAACTGACAAGTATCGAAACTCCGC	377 pb	56 °C

5.6 Clonación del promotor de *ATX3* en pCambia1303 y transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación de *A. thaliana* se realizó para poder observar el patrón de expresión espacio-temporal del gen *ATX3* en diferentes tejidos de la planta y principalmente en la etapa de desarrollo embrionario. La transformación se generó mediante la inserción de las secuencias del promotor de *ATX3* en el vector binario pCambia1303 (GenBank #AF234299.1). De manera general, el vector utilizado en este trabajo es un plásmido bacteriano con estructura de ADN circular de doble cadena, capaz de replicarse en diversas bacterias y que presenta resistencia a algún antibiótico como método de selección. En nuestro caso pCambia1303 presenta resistencia a kanamicina. Los vectores de expresión tienen sitios múltiples de clonación (MCS, por sus siglas en inglés) que son secuencias de ADN que contiene sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción que

permiten insertar secuencias de un gen de interés. El vector pCambia 1303 está preparado con la secuencia del gen reportero denominado *GUS* que codifica para la enzima β -glucuronidasa descrito anteriormente.

Se llevaron a cabo 2 tipos de construcciones debido a que la secuencia única del promotor podría no ser suficiente por sí misma para que el gen se transcriba, por lo que se llevó a cabo la clonación de una construcción que incluyera la región del promotor más la secuencia del primer exón del gen *ATX3*. Este primer exón presenta un gran tamaño, lo cual es indicativo de que posiblemente dentro de esta secuencia se encuentran regiones que estén regulando la transcripción del mismo. Por lo tanto, los dos tipos de secuencias insertadas en este vector corresponden a la región del promotor y del promotor + el primer exón (Figura 8).

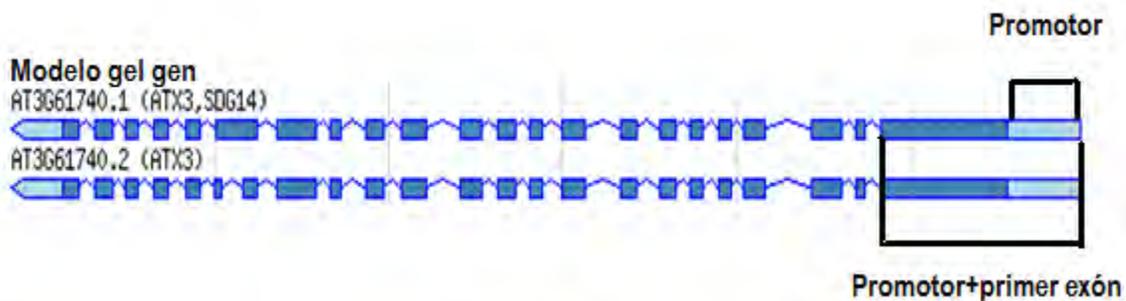


Figura 8. Esquema del Gen *ATX3* en el cual se indican las secuencias del gen que se clonaran, Promotor y Promotor+ Primer exón.

La transformación del tejido de *A. thaliana* con el vector pCambia1303 que acarrea las secuencias del promotor de *ATX3* se realizó mediante el método conocido como Floral Dip (Protocolo XI). La identificación de las plantas transformadas se realizó en un medio de selección MS+ antibiótico higromicina. La higromicina es el antibiótico marcador para el cual el vector pCambi1303 contiene resistencia. Las plantas que resulten transformadas deberían presentar resistencia a este antibiótico, además de la expresión del gen reportero. Sin embargo, estos resultados no forman parte de la presente tesis.

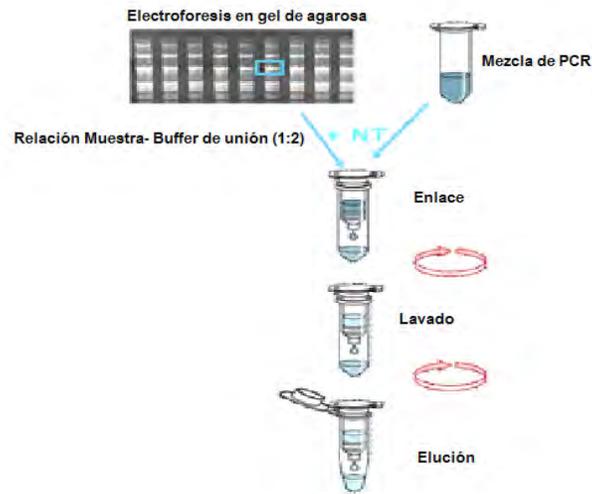
Previo a la inserción de las secuencias correspondientes al promotor del gen *ATX3* en el vector pCambia1303, se amplificaron directamente del ADN genómico extraído de hojas de la línea silvestre por el método de urea.

Para insertar en el vector pCambia1303 las secuencias correspondientes al promotor del gen *ATX3*, estas fueron amplificadas directamente de ADN genómico extraído de hojas de la línea silvestre por el método de urea (Protocolo IV). Para llevar a cabo dicha amplificación por PCR siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante (Invitogen) se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 4). El par de oligonucleótidos *ShF-ShR* se usó para amplificar secuencias únicas del promotor, mientras que con el par de oligonucleótidos *ShF-LR* se amplificó la misma secuencia de la región Promotora unida al primer exón de *ATX3*. Como control positivo en ambas amplificaciones se utilizó el gen de *actina 2/7* (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para amplificación de promotor de *ATX3* (F: Forward- R: Reverse) y del gen de control *actina 2/7*.

Gen	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño de fragmento amplificado	TM PCR
<i>Promotor ATX3 (ShF)</i>	F: ACTgACggATCCTCAGAACACAAAGATCCTTCTCC R: TgACgTCCATggTATCCTACCTAAgCAATCCTCgC	347 pb	56 °C
<i>Promotor + 1 exón de ATX3 (ShF-LR)</i>	F: TgACgTCCATggTCCTCTgAgTTCCATCCTTggAg R: TgACgTCCATggTATCCTACCTAAgCAATCCTCgC	1151 pb	56 °C
<i>Actina 2/7</i>	F: GGC TGG TTT TGC TGG TGA TG R: GGC ATA GAG AGA AAG AAC GGC C	270 pb	56 °C

Los productos amplificados (promotor y promotor +primer exón) se cortaron del gel y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml para proceder a su purificación mediante el uso de un Kit especial y el procedimiento seguido fue el recomendado por el fabricante (LG). La purificación permitió eliminar los reactivos que se utilizaron durante la reacción de amplificación. Con este procedimiento obtuvimos los fragmentos deseados libres de contaminación (Esquema 3).



Esquema 3. Ejemplo de un proceso de purificación de fragmentos amplificados a partir de gel de agarosa (http://www.cultek.com/index.asp?p=oferta&id_off=45).

Una vez puros, los insertos y el vector se digirieron con las mismas enzimas de restricción, para crear extremos compatibles entre vector e insertos. Las enzima utilizadas fueron BamHI y NcoI y las condiciones usadas para la reacción de digestión fueron las recomendadas por el fabricante (Invitrogen). Estas enzimas de restricción cortan en secuencias compatibles a las presentes en el plásmido al que se añadirá el inserto (Esquema 4).



Esquema 4. Metodología para llevar a cabo para la clonación de una secuencia específica en un plásmido.

Una vez generados los extremos compatibles tanto del vector como de los insertos mediante la reacción de digestión, se volvieron a purificar. En el caso de los insertos se purificaron mediante Kit siguiendo recomendaciones del fabricante (LG) y en el caso del vector se purificó a través de un gel siguiendo las recomendaciones del fabricante (QIAGEN).

La purificación se llevo a cabo para eliminar las enzimas y buffers utilizadas la reacción de digestión. Después de la segunda purificación los insertos fueron puestos en contacto con el vector para lograr su inserción dentro del vector mediante una reacción de ligación. Esto se llevó a cabo en dos reacciones independientes para cada inserto.

Previo a la reacción de ligación las cantidades de inserto y vector se cuantificaron, para estimar la cantidad necesaria de ambos en la reacción de ligación. La cuantificación se determinó en un espectrofotómetro tipo Nano Drop (modelo ND-1000). Para lograr una buena eficiencia de inserción en la reacción de ligación se recomienda que la relación de las concentraciones inserto a vector sea 3:1. Para determinar esta relación se usan cantidades en femtomoles (fm) o nanogramos (ng) de cada una de las secuencias.

Para el cálculo de estas cantidades se utilizaron las siguientes fórmulas:

Cálculos para vector $40 \text{ fm} * (1/3000) * (\text{Peso molecular del vector pb} / 1000 \text{ pb}) = \text{ng de Vector}$

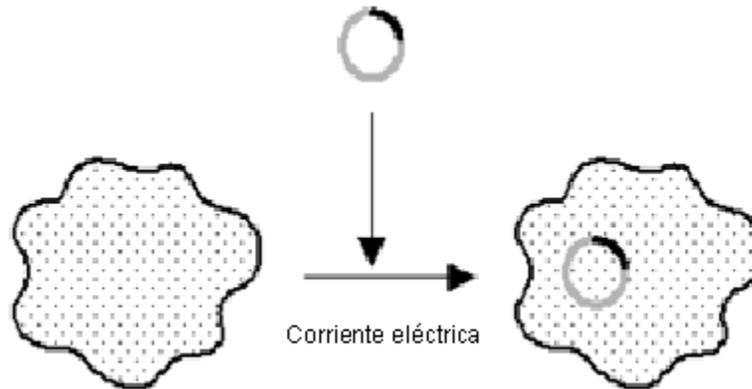
Cálculos para insertos $120 \text{ fm} * (1/3000) * (\text{Peso molecular del inserto pb} / 1000 \text{ pb}) = \text{ng de inserto}$

Una vez que se calcularon las cantidades para tener una relación 3:1 se procedió a realizar la reacción de ligación de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).

Una alícuota de la reacción de ligación se utilizó para transformar células bacterianas con el fin de poder seleccionar aquellas células que contengan únicamente el vector con el fragmento insertado. La reacción de transformación para introducir los vectores a las bacterias se realizó mediante la técnica de electroporación (Esquema 5). Este método se basa en el paso de corriente eléctrica por una mezcla que contiene el cultivo bacteriano con el plásmido modificado, para lograr debilitar la membrana celular de las bacterias y permitir el paso del vector dentro de la célula. Las células hospedero electrocompetentes que se usan para la transformación son cepas de *Escherichia coli* (cepa DH5α electrocompetentes) (Protocolo VI) como hospedero.

La reacción de transformación se realizó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf de 250 µl se colocaron 20 µl de este cultivo con 3 µl de la reacción de ligación que se realizó anteriormente.

Una vez que se homogenizaron: la mezcla se colocó en las celdas de electroporación. Las condiciones de electroporación una corriente eléctrica de 2.5 Kv, 25 uFaradays y 200 ohms por 10-15 micro-seg.



Esquema 5. Inserción del plásmido modificado en la bacteria mediante técnica de electroporación (<http://www.cecalc.ula.ve/bioinformatica/BIOTUTOR/pregs/t9p17.gif>).

Inmediatamente después de la electroporación, las células se colocaron en 0.5 ml de medio SOC líquido (Protocolo VII) y se incubaron a 37°C por 1 h. Este paso permitió la recuperación celular después del paso de la corriente eléctrica a través de ellas. Pasado este tiempo el cultivo se sembró en placa, en medio sólido LB+ kanamicina 50 mg/μl (Protocolo IX) en condiciones asépticas. La kanamicina en el medio es para seleccionar las transformadas, debido a que el plásmido contiene secuencias que le confieren resistencia a este antibiótico. De tal manera que sólo crecerán las células que se hayan transformado con el plásmido.

Para probar que las células resistentes a kanamicina también tengan el inserto de forma paralela se sembraron controles. El control positivo fue un cultivo bacteriano transformado previamente con el plásmido (pCambia1303) sin inserto. En las placas de este control se espera que haya un crecimiento en tapete en medio LB y que se formen colonias definidas en medio LB+ kanamicina. Como control negativo se utilizó el mismo cultivo bacteriano sin plásmido. En este control se espera que haya crecimiento en medio LB y que no haya crecimiento en el medio LB+ kanamicina, debido a que la resistencia a este antibiótico es conferida por el plásmido.

Estos controles se sembraron en medio LB y LB + kanamicina $50 \text{ mg}/\mu\text{l}$ (Protocolo IX). Todos los cultivos se incubaron 16 h a 37°C . Después de este periodo, se seleccionaron algunas colonias, las cuales se resembraron en 5 ml medio líquido LB + kanamicina $50 \text{ mg}/\mu\text{l}$ (Protocolo VIII). Se incubaron a 37°C por 16 h con agitación constante (225 rpm). Una vez que pasaron las 16 h se tomaron 3 ml para obtener el vector. La extracción del vector del cultivo bacteriano se llevó a cabo mediante lisis alcalina (Protocolo X). Una vez que se obtuvo el plásmido de las células, se verificó si contenía la inserción mediante una reacción de digestión. En esta reacción se utilizaron las mismas enzimas con las que se digirieron los fragmentos anteriormente (BamHI/NcoI), así como las mismas condiciones recomendadas por el fabricante (Invitrogen). El producto que se obtuvo de esta reacción se sometió a una electroforesis en gel de agarosa 1.2% (Protocolo V). La presencia de ambos fragmentos (vector e inserto) en el gel de agarosa permitió seguir con el protocolo.

Una vez que se comprobó la presencia del inserto, el vector se introdujo en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) para transformar a *Arabidopsis thaliana* con el nuevo material genético mediante el método "Floral Dip" (Protocolo XI).

La transferencia del vector con el inserto a *A. tumefaciens* se realizó mediante electroporación igual que para la transformación de *E. coli* (Protocolo VI) como hospedero. En un tubo eppendorf de $250 \mu\text{l}$ se colocó una mezcla que contenía $20 \mu\text{l}$ de células de *A. tumefaciens* electrocompetentes con $3 \mu\text{l}$ del vector extraído de *E. coli*. La mezcla se colocó en celdas especiales para electroporación. Posteriormente se les incidió una corriente eléctrica de 2.5Kv, 25 $\mu\text{Faradays}$ y 200 ohms en un equipo marca Bio-Rad modelo Gene Pulser II System.

Inmediatamente después de la electroporación, se adiciono 1 ml de medio LB líquido (Protocolo VIII), y la mezcla se incubó a 28°C , durante 3 h para recuperación celular. Después de la recuperación celular, las bacterias se platearon en medio sólido LB+ kanamicina $50 \text{ mg}/\mu\text{l}$ + estreptomycin $300 \text{ mg}/\mu\text{l}$ + rifampicina $100 \text{ mg}/\mu\text{l}$ (Protocolo IX) en condiciones asépticas. De forma paralela se sembraron controles. El control positivo fueron bacterias de *A. tumefaciens* que contienen el plásmido (pCambia1303). Como control negativo se utilizó el mismo cultivo celular pero sin plásmido. Estos controles se platearon en medio sólido LB+ kanamicina $50 \text{ mg}/\mu\text{l}$ + estreptomycin $300 \text{ mg}/\mu\text{l}$ + rifampicina $100 \text{ mg}/\mu\text{l}$ (ver Protocolo IX). Todos los cultivos se incubaron por 48 h a 28°C .

Se seleccionaron colonias definidas, las cuales se resembraron en 10 ml medio líquido LB+ kanamicina $50 \text{ mg}/\mu\text{l}$ + estreptomycin $300 \text{ mg}/\mu\text{l}$ + rifampicina $100 \text{ mg}/\mu\text{l}$ (ver Protocolo VIII). Se incubaron a 28°C por 48 h con agitación constante (225 rpm). Una vez que pasaron las 48 h se tomaron 3 ml

para determinar las colonias que contienen el vector con el inserto mediante el método de lisis alcalina (Protocolo X). Una vez que se aisló el vector de las células, se verificó si contenían la inserción. Esta verificación se llevó a cabo mediante una reacción de PCR. En esta reacción se utilizaron los oligonucleótidos con los que se amplificaron las secuencias correspondientes a la región del promotor del gen *ATX3* (Tabla 4). Los controles utilizados en estas reacciones fueron ADN genómico como control positivo y pCambia 1303 sin inserto como control negativo.

Los productos obtenidos de esta amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1.2% (Protocolo V). La confirmación de la presencia del inserto en el plásmido permitió hacer un stock de glicerol de las bacterias recombinantes para mantener la línea celular. Para realizar el stock, se adicionaron 500 µl del cultivo bacteriano líquido a 500µl de glicerol al 70%. Se mezcló perfectamente y se almacenaron a -80°C.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis fenotípico de la línea silvestre y la línea mutante

6.1.1 Comparación del desarrollo, crecimiento y fenotipo de *Columbia 0* y *atx3*.

Se llevó a cabo un análisis de las diferencias observadas en diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas de ambas líneas, tanto la línea silvestre como la línea mutagenizada, comenzando desde la germinación. Las diferentes etapas analizadas se compararon con las etapas de crecimiento y desarrollo para *A. thaliana* descritas por Boyes *et al.* (2001). Las etapas se describen en las tablas que se presentan a continuación:

Tabla 5.1. Etapas de desarrollo de *A. thaliana*. Descripción y características de las etapas de desarrollo de *A. thaliana*. (Traducida y modificada de Boyes *et al.*, 2001)

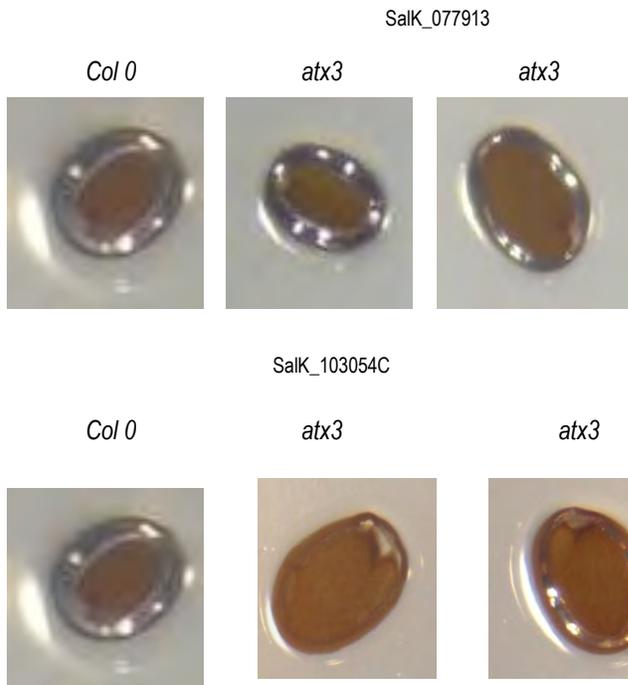
Etapas de crecimiento de <i>Arabidopsis</i> análisis fenotípico		
Etapas	Descripción	Datos <i>Col 0</i> Días
Etapa de crecimiento Principal 0	Germinación de semilla	
0.10	Imbibición de semilla	3.0
0.50	Emergencia de radícula	4.3
0.70	Emergencia de cotiledones e Hipocotiledón	5.5
Etapa de crecimiento Principal 1	Desarrollo de hojas	
1.0	Cotiledones totalmente abiertos	6.0
1.02	2 hojas rosetas > 1mm	10.3
1.04	4 hojas rosetas > 1mm	14.4
Etapa R6	Más del 50% de las semillas tienen raíces primarias ≥ 6 cm de longitud	---

Tabla 5.1.1. Continuación de las Etapas de desarrollo de *A. thaliana*. Descripción y características de las etapas de desarrollo de *A. thaliana*. (Traducida y modificada de Boyes *et al.*, 2001).

Etapas de crecimiento de <i>Arabidopsis</i> análisis fenotípico		
Etapa	Descripción	Datos Col 0
		Días
Etapa de crecimiento Principal 1	Desarrollo de hojas	
1.02	2 hojas rosetas > 1mm	12.5
1.03	3 hojas rosetas > 1mm	15.9
1.04	4 hojas rosetas > 1mm	16.5
1.05	5 hojas rosetas > 1mm	17.7
1.06	6 hojas rosetas > 1mm	18.4
1.07	7 hojas rosetas > 1mm	19.4
1.08	8 hojas rosetas > 1mm	20.0
1.09	9 hojas rosetas > 1mm	21.1
1.10	10 hojas rosetas > 1mm	21.6
1.11	11 hojas rosetas > 1mm	22.2
1.12	12 hojas rosetas > 1mm	23.3
1.13	13 hojas rosetas > 1mm	24.8
1.14	14 hojas rosetas > 1mm	25.5
Etapa de crecimiento Principal 3	Crecimiento de Rosetas	
3.20	Roseta esta al 20% de su tamaño final	18.9
3.50	Roseta esta al 50% de su tamaño final	24.0
3.70	Roseta esta al 70% de su tamaño final	27.4
3.90	Roseta está en su tamaño final	29.3
Etapa de crecimiento Principal 5	Emergencia de inflorescencia	
5.10	Emergen los primeros botones de flores	26.0
Etapa de crecimiento Principal 6	Producción de flor	
6.00	Una flor abierta	31.8
6.10	10% de la flores producidas están abiertas	35.9
6.30	30% de la flores producidas están abiertas	40.1
6.50	50% de la flores producidas están abiertas	43.5
6.90	Todas las flores abiertas	49.4
Etapa de crecimiento Principal 8	Maduración de silicuas	
8.10	Primera silicua	48.0
Etapa de crecimiento Principal 9	Senescencia	
9.70	Senescencia completa: listo recolectar semillas	---

Después de 48 h de germinación de las semillas de ambas líneas (correspondiente a la etapa 0.1), se realizó la primera observación, no se identificó ninguna diferencia en la germinación entre ambas líneas (Imagen 1), ya que todas las plantas en esta etapa no presentan diferencias entre sí de acuerdo a la clasificación de Boyes *et al.*, 2001 (Tabla 5). A las 96 h se presentó la protrusión de las raíces fuera de la cubierta de las semillas en todas las líneas (etapa 0.5). Sin embargo 7 de las 16 plantas analizadas de *atx3* (SalK_077913) presentaron menor longitud que la línea silvestre (Imagen 2).

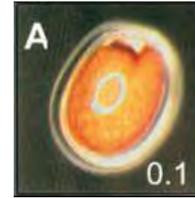
Desarrollo de líneas germinadas



Etapas de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

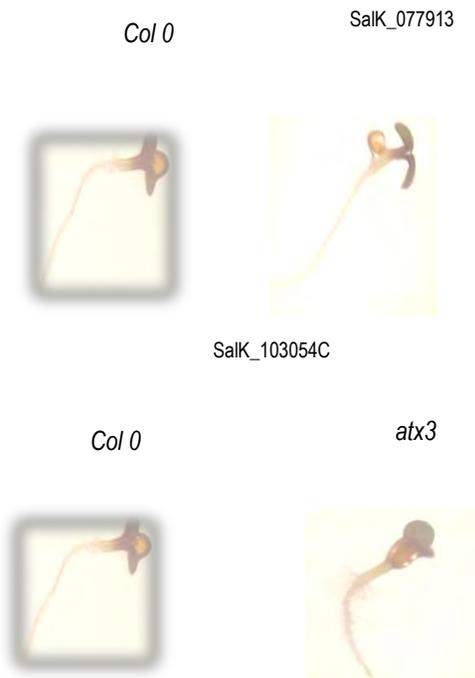
**Estado de crecimiento principal
Etapa 0**

Imbibición de semillas

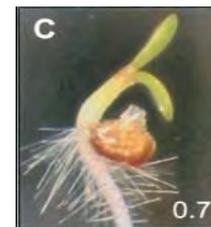


Desarrollo normal de semillas de *A. thaliana*

Imagen 1. Semillas de Línea silvestre y línea mutante a 48 horas de haber sido sembradas y desarrollo normal de *Col 0* a los 5 días. (Boyes *et al.*, 2000)



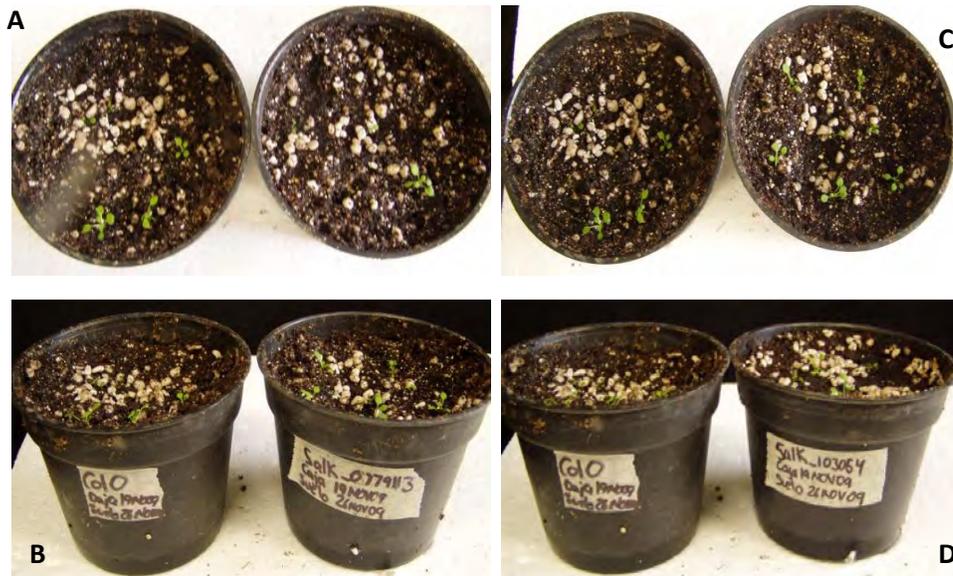
Emergencia de Cotiledon e Hipocotiledon



Desarrollo normal de semillas de *A. thaliana*

Imagen 2. Raíces a la línea silvestre y línea mutante a 96 horas de haber sido sembradas (Boyes *et al.*, 2000).

En las etapas posteriores (0.7 -1.03) no se observaron diferencias y ambas líneas presentaron el mismo desarrollo hasta los 15 días (Imagen 3).



Imagen

3. Comparación del desarrollo de las diferentes líneas de plantas estudiadas. **A-B** *Col 0* y *atx3* (Salk_077913) y **C-D**. *Col 0* y *atx3* (Salk_103054C) a 15 días de haber sido pasadas a suelo. A 22 días de haber sido sembradas.

Posterior a la etapa 1.03 se presentaron diferencias notables en el desarrollo de ambas líneas (Imagen 4). En la imagen se puede apreciar que la línea silvestre de *A. thaliana* tiene mayor crecimiento que la línea mutante, correspondiendo a su desarrollo normal. En este periodo la línea silvestre *Col 0* ya se encuentra en la etapa 1.10 con 10 rosetas mayores a 1mm, mientras que las líneas mutantes (Salk_077913) se encontraron en la etapa 1.07 con 7 hojas rosetas mayores a 1 mm.

Estado de crecimiento principal.
Etapa 1

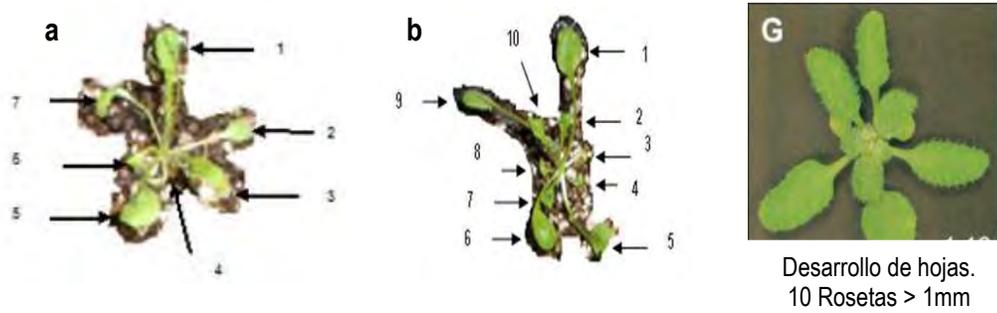


Imagen 4. Comparación con el desarrollo de hojas en las diferentes líneas de plantas estudiadas. **a.** *atx3* **b.** *Col*, **b.** y **G.** Desarrollo normal de *Col0* a los 22 días de haberse puesto a germinar. (Boyes *et al.*, 2000).

A pesar de las diferencias observadas en la etapa anterior (a los 22 días), las plantas de ambas líneas aparentemente continúan con un desarrollo similar hasta los 28 días, no habiendo retraso en el establecimiento de la floración, ni en el tamaño de las hojas, ni estatura de la planta en la línea mutante comparada con la línea silvestre (Imagen 5).

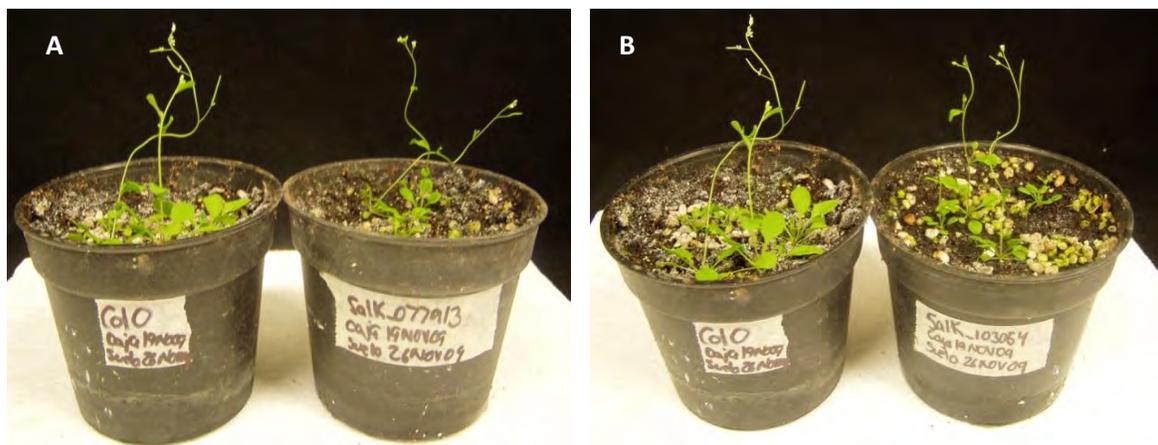


Imagen 5. Comparación en el desarrollo de las diferentes líneas de plantas de interés. **A** *Col0* y *atx3* (Salk_077913), **B** *Col0* y *atx3* (Salk_103054C) a 21 días de haber sido pasadas a suelo. A 28 días de haber sido sembrada.

Los resultados de este análisis nos permitieron confirmar que la mutación del gen *ATX3* afecta de manera muy ligera al fenotipo en estadios tempranos del desarrollo de *A. thaliana* ya que las variaciones que presentó la línea mutante (Salk_077913) fue una longitud menor de raíz a las 72 h de haber sido puestas a germinar y en la etapa 1.10-1.11 en la que hubo un retraso en la cantidad de rosetas presentes en su estructura.

6.1.2 Comparación del desarrollo embrionario de *Columbia 0* y mutante (*atx3*)

Hasta los 28 días de desarrollo de ambas líneas no se observaron diferencias notables en la germinación, crecimiento y floración, sin embargo en la etapa 8 (aproximadamente a los 40 días) cuando las silicuas se están produciendo después de la autopolinización de las plantas, se observó en la línea mutante un desarrollo embrionario incompleto y no alcanzan la etapa de maduración. En los diferentes paneles de la Imagen 6 se observan los distintos fenotipos para el desarrollo embrionario de las líneas estudiadas. En el panel A se observa el desarrollo completo de la línea silvestre (*Col 0*), mientras que en los paneles B-D se observa un desarrollo incompleto que se presenta en la línea mutante para *atx3*.

En la observación de las silicuas se determinó que aproximadamente el 45% de los embriones que están en una sola silicua no se desarrollaron, mientras que el 55% restante de los embriones son viables. Sin embargo hay variaciones entre embrión a embrión dentro de esta misma silicua, ya que hay embriones que llegaron a desarrollarse completamente dentro de la misma. El fenotipo característico de la línea mutante se presenta en la siguiente Imagen 6.

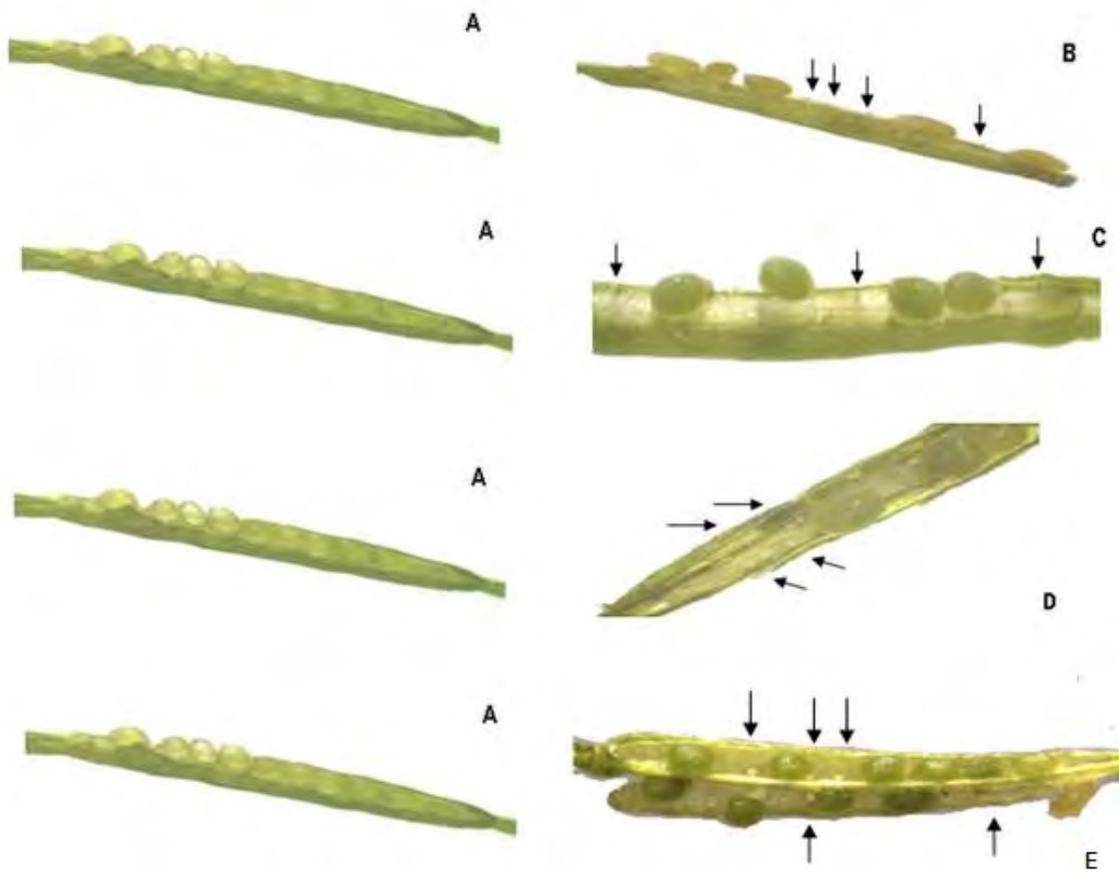


Imagen 6. Comparación del desarrollo embrionario de la línea silvestre y línea mutante. **A.** Desarrollo embrionario normal de la línea silvestre Col 0. **B- F** Desarrollo embrionario incompleto en líneas mutagenizadas **B-C** *atx3* (Salk_077913) y **D-E** *atx3* (Salk_103054C)

6.2 Genotipificación de la línea mutagenizada *atx3*

En la Imagen 7 se presenta el ADN genómico extraído para llevar a cabo la genotipificación. En los carriles 1-2 se observa ADN obtenido de hojas de la línea silvestre, y del 3-6 corresponden al ADN obtenido de hojas de la línea mutante (*atx3*).

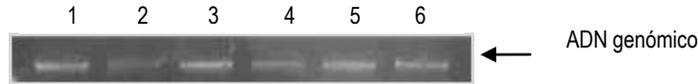


Imagen 7. ADN genómico de *Columbia 0* y *atx3*.

La Imagen 8 muestra el gel con los productos de dicha genotipificación. En el carril 1 de los paneles **a-e** se observa el producto de la reacción de PCR en el que se utilizó el ADN de la línea silvestre, sólo se observa la banda correspondiente a la secuencia amplificada por los oligonucleótidos *LP-RP* (900 pb); como se había mencionado anteriormente, esta secuencia sólo está presente en los alelos de la línea silvestre. En los carriles 2 y 3 del panel **a** se colocaron las reacciones de PCR en las que se utilizó el ADN obtenido de la línea mutante (*Salk_077913*), se observa en ambos carriles una sola banda correspondiente a la secuencia amplificada por los oligonucleótidos *LbA1-RP* (500 pb), los cuales sólo amplifican secuencias correspondientes T-ADN debido a la inserción. Mientras que en los carriles 2-3 del panel **b** se observan los productos de amplificación de las reacciones en las que se utilizó el ADN de las línea mutante (*Salk_077913*), en ambos carriles se observa una sola banda correspondiente a la secuencia amplificada por los oligonucleótidos *LbB1.3-RP* (600 pb), los cuales sólo amplifican secuencias correspondientes al T-ADN debido a la inserción. En los carriles 2-3 del panel **d** se utilizó el ADN de la línea mutante (*Salk_103054C*) y se observan los productos de amplificación correspondientes a la banda *LbB1.3-RP* (600 pb). Finalmente, el control positivo se observa en los paneles **c** y **e**, en cuya reacción se utilizaron oligonucleótidos para *Actina 2/7* y el producto amplificado que se observa es de 270 pb.

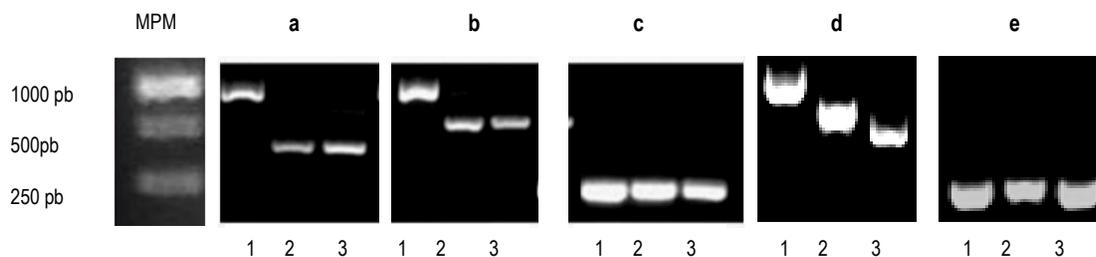


Imagen 8. Geles de genotipificación de *Col 0*, *atx3* (*Salk_077913* y *Salk_103054C*). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular y se señalan las bandas de peso molecular 250, 500 y 1000 pb.

6.3 Determinación de la expresión de *ATX3* en línea silvestre y mutante en distintos estadios y tejidos

Para definir si existen diferencias importantes en la expresión del gen *ATX3* entre la silvestre y la mutante, se extrajo el ARNm de hoja y flores (Imagen 9). Este ARNm fue utilizado en la síntesis de ADNc a partir del cual se amplificó el producto de expresión del gen con oligonucleótidos específicos. En ambos geles se observan las 2 bandas del ARN ribosomal correspondientes a 28S y 18S. Estas bandas deberán presentar relación 2:1 ó 1:1 (relación ARN28S/ARN18S) para que se considere un ARNm de buena calidad, como es el caso.

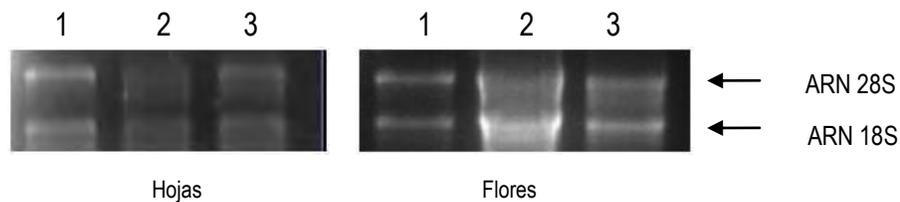


Imagen 9. ARNm Total obtenido de hojas y flores de la línea silvestre y mutante. En ambos geles el carril etiquetado con número 1 corresponde al ARNm de la línea silvestre. En el gel etiquetado como hojas los carriles 2-3 es ARNm de la línea mutante. Y el gel etiquetado como flores los carriles 2-3 corresponden al ARNm obtenido de la línea mutante

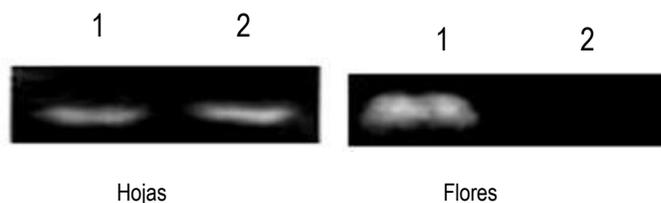


Imagen 10. Geles con la banda correspondiente a la secuencia de *ATX3* 370 pb. En ambos geles carril 1 corresponde a la expresión de *ATX3* en la línea silvestre, mientras que en el carril 2 muestra la expresión de la línea mutante.

Claramente se observa que hay una regulación a la baja de la expresión de *ATX3* en flores de la línea mutante (*atx3*). Es importante mencionar que a pesar de que la línea mutagenizada *atx3* en una línea homocigótica para la inserción del T-DNA, queda claro que hay expresión del gen en la hoja.

La determinación de la expresión de genes relacionados con el desarrollo del embrión, permite realizar una recopilación de las posibles funciones que tienen cada uno de los genes, las cuales se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Genes homeóticos relacionados con el desarrollo embrionario de *Arabidopsis*.

GEN	Posible Función Molecular	Posible función en procesos biológicos
ATX3	Proteína de enlace	Interviene en el desarrollo embrionario, regulación en transcripción.
EXO70A1	Proteína de enlace	Morfogénesis de raíz lateral y desarrollo de raíz.
KNAT2	Actividad como factor de transcripción	Especificación para identidad de carpel.
KNAT6	Unión al DNA	Mantener meristemo
CYP71	Unión a cromatina y a Histonas	Proteína plegable, Regulación del desarrollo floral y raíz, desarrollo de estambres, regulación de metilación de histonas, formación de tejido de hojas
LRP1	Proteína con actividad de homodimerización	Responsable de estímulos de auxina y desarrollo de raíz.
CRANE/IAA18	Actividad de factor de transcripción	Responsable de estímulos de auxina
RPD1	Actividad ubiquitin tioesterleasa	Regulación negativa de proliferación celular, morfogénesis de la raíz lateral.
ATHB53	Unión al ADN	Regulación transcripción, desarrollo de raíz, dependiente del ADN, respuesta a estímulo de auxina.
KNAT1/BP	Actividad de factor de transcripción	Determinación de funciones en células, formación de tejidos vasculares
FUS	No se conoce	Especificación para identidad floral, regulación negativa de morfogénesis, respuesta a estímulo de auxina
LEC1	Actividad de factor de transcripción y activador de transcripción	Regulación positiva de transcripción, desarrollo del embrión dentro de la semilla inactiva.
NFYB6	Activador de transcripción por unión	Regulación de transcripción, Regulación de transcripción específica de gen
FBL17	Actividad de proteína ligasa ubiquitina	Proteína dependiente de ubiquitina en procesos catabólicos, desarrollo de polen y embrionario, desarrollo de semillas.
WRKY 25	Actividad de factor de transcripción	Regulación de transcripción, dependiente del ADN
PAD1	Actividad Endopeptidasa	Proteína dependiente de ubiquitina en procesos catabólicos

Tabla 7. Expresión de genes relacionados con el desarrollo embrionario de *A. thaliana*

GEN	HOJA	FLOR
EXO70AFTR		
KNAT2		
KNAT6		
CYP71		
LRP1		
CRANE		
RPD1		
ATHB53		
KNAT1		
FUS		
LEC		
NFYB6		
FBL7		
WKY25		
PAD1		
Actina		

Los resultados de la expresión de los diversos genes se compilan en la Tabla 7 (expresión en hoja para línea silvestre y mutante, y expresión en flor para línea silvestre y mutante). En esta tabla se observa que no todos los genes son afectados por la mutación del gen *ATX3*.

6.4 Clonación de promotor de *ATX3* en pCambia1303 y transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para estudiar la regulación del gen *ATX3* se utilizó un vector que contiene la secuencia del gen de la β glucuronidasa que es un gen reportero. Este gen se puso bajo el control del promotor de *ATX3* y de *ATX3*+primer exón. La utilización del *ATX3*+exón se debe a que se ha informado en otros genes que el exón 1 tiene regiones reguladoras que podrían estar involucradas en la alta o baja expresión del gen.

Una de las formas en que se puede cumplir este objetivo es mediante la clonación del promotor en un vector que presenta un gen reportero. Las secuencias clonadas se obtuvieron mediante una amplificación por PCR en el cual se utilizó ADN genómico de la línea silvestre (Imagen 11), en esta Imagen los 3 carriles de gel muestra el ADN que se extrajo de las hojas de la línea silvestre.

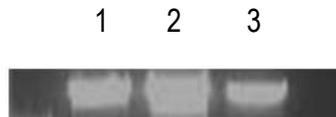


Imagen 11. Gel en el que se muestra el ADN genómico obtenido de hojas de *Columbia 0*.

Mediante PCR se llevó a cabo la amplificación de las secuencias correspondientes al promotor de *ATX3* con el uso de los oligonucleótidos *ShF-ShR* y la secuencia correspondiente al Promotor + el primer exón con el uso de los oligonucleótidos *ShF-LR*. En la imagen 12 se observan los geles en los que se corrieron los productos de cada una de las reacciones de amplificación. En el gel A se observa la banda correspondiente al promotor con un peso molecular correspondiente a 437 pb y el gel B muestra la banda correspondiente Promotor + primer exón con un peso molecular de 1151 pb.



Imagen 12. Geles en los que se muestran los productos de amplificación de los promotores obtenidos de la reacción. Se observan 2 geles en los que se corrieron los productos de amplificación de cada una de las secuencias respectivamente (MPM= Marcador de Peso Molecular).

Se hicieron varias reacciones con el fin de obtener una mayor cantidad de secuencias amplificadas, para cada uno de los fragmentos de interés.

En el primer carril de los 3 geles de la imagen 13 se presenta el marcador de peso molecular y se señala el peso de la banda que se está representando y en los carriles restantes se colocó el

producto de estas amplificaciones. En el gel **i** se presentan las secuencias amplificadas de la región del Promotor (437 pb), y en el gel **ii** presenta el producto de amplificación de la región del Promotor + primer exón. En el gel **iii** se presentan los controles positivos para cada una de las reacciones, en ambos carriles se muestra la banda correspondiente al control positivo de *actina* (270 pb), utilizando mismo el ADN que para las reacciones de amplificación de las regiones del promotor.

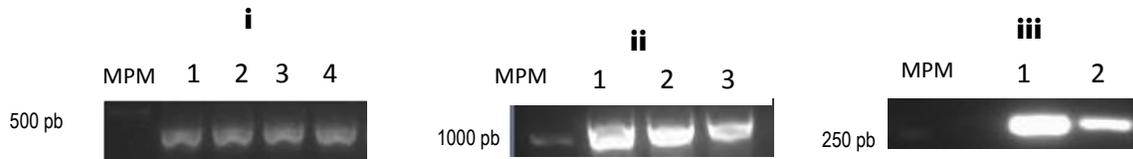


Imagen 13. Productos de las reacciones de amplificación de las secuencias correspondientes a la región del promotor de *ATX3* y *actina 2/7* como control positivo.

Y las secuencias obtenidas después de la primera purificación se observan en la Imagen 14.



Imagen 14. Secuencias pertenecientes a la región del Promotor de *ATX3* purificados.

En la Imagen 14 se observan 2 geles, en ambos presentan el marcador de peso molecular en el primer carril. En el gel **a** presenta la banda correspondiente a la secuencia perteneciente a la región del promotor de *ATX3* después de la purificación. Y en el gel **b** presenta la banda de la secuencia perteneciente a la región del promotor+ primer exón de *ATX3* después de la purificación. Esta imagen nos ayudó a verificar que se tenía suficiente cantidad de las secuencias amplificadas para llevar a cabo la ligación.

Los insertos y el vector se sometieron a la reacción de digestión y se purificaron por segunda ocasión. Los productos obtenidos se verificaron en geles, los cuales se muestran en la siguiente

Imagen. En la Imagen 15 presenta los geles en los que están las secuencias amplificadas pertenecientes a la región del promotor de *ATX3*, purificadas de la reacción de digestión. En ambos geles en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular indicando la banda correspondiente, así como las secuencias de interés digeridas y purificadas. En el carril 1 del gel **a** presenta el producto de amplificación correspondiente al Promotor, y en el carril 1 del gel **b** se observa el producto de amplificación correspondiente al Promotor+ primer exón. En los carriles 1-3 presenta el pCambia1303.

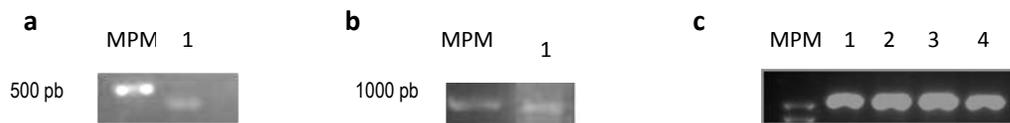


Imagen 15. Secuencias de amplificadas de la región del Promotor de *ATX3* y pCambia1303 digeridos con BamHI/NcoI y Purificados.

Se determinó la concentración de ambas secuencias que permitieron los cálculos necesarios para la reacción de ligación. La concentración del vector pCambia1303 fue de 2.005 ng/μl, mientras que las concentraciones obtenidas para el fragmento Promotor fueron: 16.55 ng/μl, 16.85 ng/μl y 5.55 ng/μl; y para el promotor+ primer exón fue de 23 ng/μl

Una vez que se obtuvieron las cantidades de las concentraciones de vector e inserto, se realizaron los siguientes cálculos, a partir de las fórmulas recomendadas por el fabricante.

Cálculos para Vector (pCambia 1303)

$$40 \text{ fm} * (1/3000) * (11\ 549 \text{ pb} / 1000 \text{ pb}) = 154 \text{ ng de Vector}$$

Cálculos para insertos

$$\text{Promotor } 120 \text{ fm} * (1/3000) * (437 \text{ pb} / 1000 \text{ pb}) = 17.48 \text{ ng de inserto}$$

$$\text{Promotor + primer exón } 120 \text{ fm} * (1/3000) * (1151 \text{ pb} / 1000 \text{ pb}) = 46.04 \text{ ng de inserto}$$

En las Figuras 9-10 se muestran las construcciones obtenidas después de la reacción de ligación.

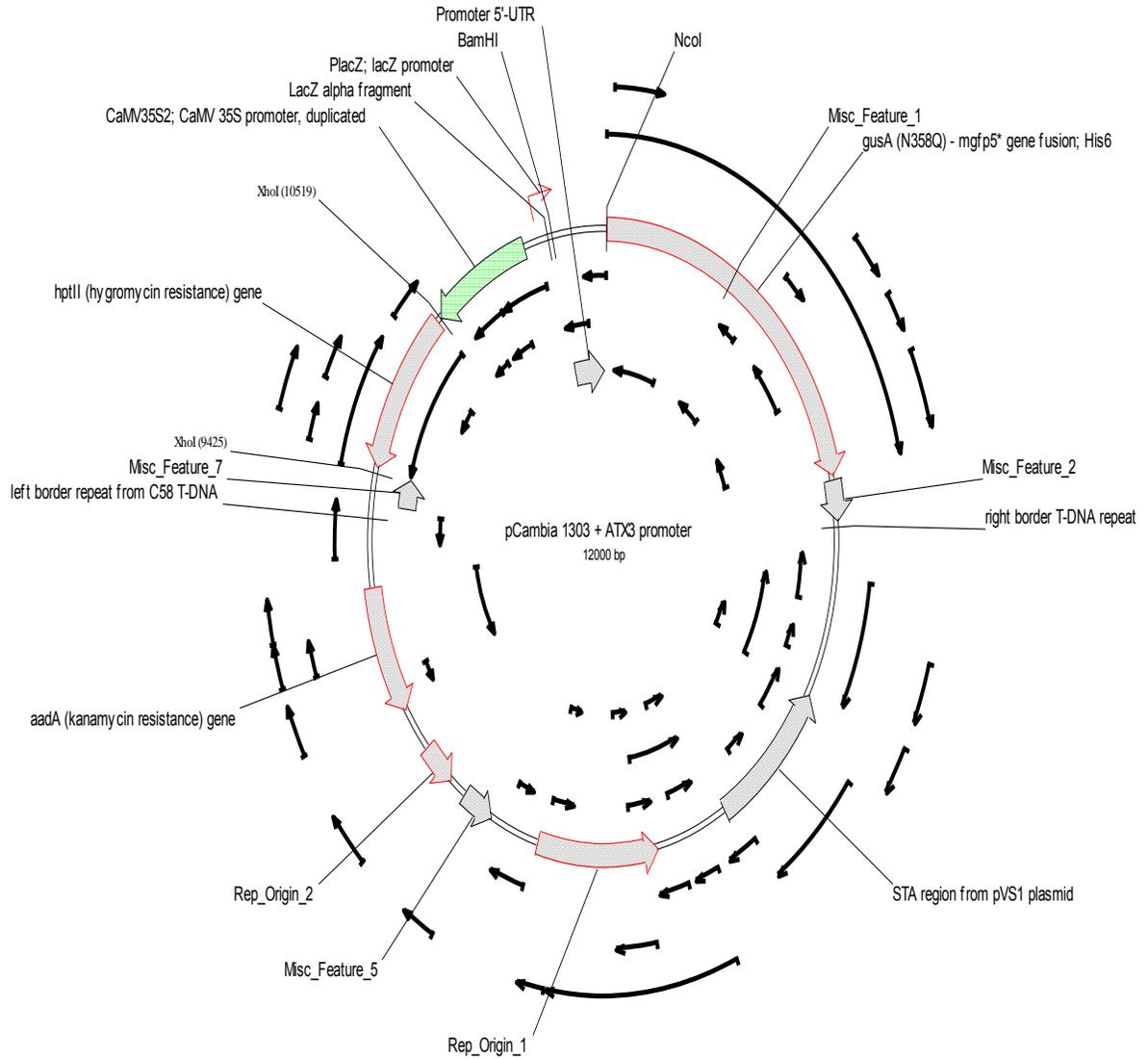


Figura 9. Mapa de pCambia 1303+ *Promotor*. Plásmido obtenido de la ligación utilizado para transformación de células (Mapa generador con el programa Vector NTI, Invitrogen).

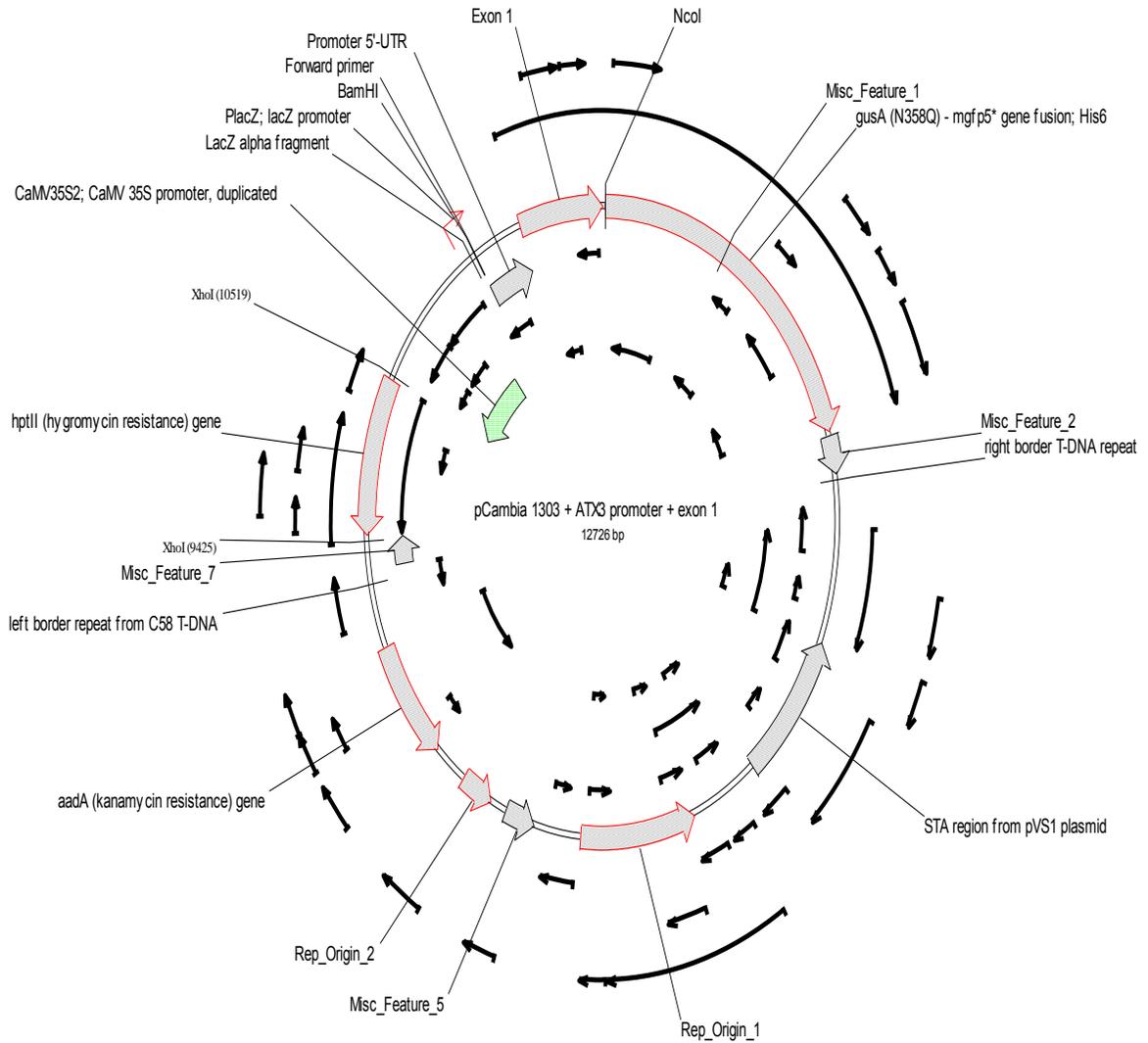


Figura 10. Mapa de pCambia 1303+ *Promotor + primer exón*. Plásmido obtenido de la ligación y utilizado para transformación de células (Mapa generador con el programa Vector NTI, Invitrogen).

Después se llevó a cabo la ligación (para cada uno de los insertos). Se introdujo el vector a las células *E. coli* DH5 α por electroporación. Las células transformadas se platearon en cajas Petri con medio sólido. Los cultivos que se hicieron fueron los siguientes:

Controles	Medio sólido en el que se sembraron
Negativo DH5 α	LB LB +Kanamicina (50 mg/ μ l)
Positivo DH5 α + pCambia1303	LB LB +Kanamicina (50 mg/ μ l)

Células Transformadas

DH5 α + pCambia1303+ *Promotor ATX3* 3 μ l Ligación LB+ Kanamicina (50 mg/ μ l)

Posteriormente las colonias que presentaron resistencia a kanamicina se seleccionaron y se inocularon en medio líquido. Una parte del medio de cultivo se usó para aislar el vector mediante lisis alcalina.

Una vez aislado el vector se sometió a una reacción de digestión. Los productos de la reacción de digestión se presentan en las imágenes 16-17. En ambos geles se presentan el marcador de peso molecular. En los carriles 1-2 de la Imagen 16 se presentan los productos obtenidos de esta reacción digestión para el vector que contiene el Promotor. En la imagen correspondiente se puede observar la presencia del vector en la parte superior del gel y del fragmento digerido de 437 pb correspondiente a la secuencia del promotor de *ATX3* en la parte inferior.

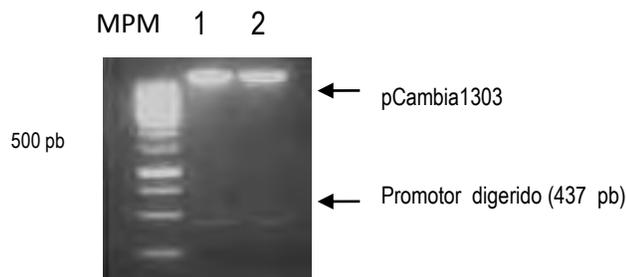


Imagen 16. Verificación de fragmentos obtenidos a a partir de la reacción de digestión del Vector pCambia1303+ Promotor. Vector obtenido de las células DH5 α y digeridos con BamHI/NcoI.

La presencia del inserto Promotor+ primer exón en el vector se verificó mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos con los que se amplificó el fragmento insertado en el vector. Los oligonucleótidos utilizados fueron los mismos que se utilizaron previamente para amplificar el fragmento insertado en el vector. Los productos obtenidos se analizaron en un gel que se presenta en la Imagen 17. El primer carril contiene el marcador de peso molecular y los carriles 1-3 se los productos que contiene a la secuencia perteneciente a la región del promotor + primer exón de ATX3.

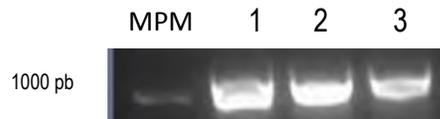


Imagen 17. PCR del Vector pCambia1303+ Promotor+ primer exón obtenido de las células DH5α.

Después de confirmar la presencia de los vectores con el inserto en las células se hicieron stocks de glicerol al 35% y se conservaron a -80° C.

Con los vectores extraídos de *E. coli* se llevó a cabo la transformación de *A. tumefaciens*. Teniendo los siguientes cultivos:

Medio sólido en el que se sembraron	
Controles	
Negativo <i>Agrobacterium</i>	LB
	LB+ kanamicina 50 mg/μl+ estreptomycin 300 mg/μl + rifampicina 100 mg/μl
Positivo <i>Agrobacterium</i> + pCambia1303	LB
	LB+ kanamicina 50 mg/μl+ estreptomycin 300 mg/μl + Rifampicina 100 mg/μl
Células Transformadas	
<i>Agrobacterium</i> + pCambia1303 +Promotor	LB+ kanamicina 50 mg/μl+ estreptomycin 300 mg/μl + rifampicina 100 mg/μl
<i>Agrobacterium</i> + pCambia1303 +Promotor+ primer exon	LB+ + kanamicina 50 mg/μl+ estreptomycin 300 mg/μl + rifampicina 100 mg/μl

De estos cultivos en medio sólido se seleccionaron colonias aisladas para inocularlas en medio líquido. De este medio líquido se extrajeron los vectores a través de lisis alcalina. El plásmido

extraído se sometió a una reacción de PCR, en la que se utilizaron los mismos oligonucleótidos que para amplificación del fragmento insertado (Tabla 4).

En la Imagen 18 se observan los geles en los que se analizaron los vectores extraídos de las células de *A. tumefaciens*. Ambos geles presentan en el primer carril el marcador de peso molecular. En los carriles 1-4 del gel **A** se presentan los productos de la amplificación de los vectores extraídos de las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con pCambia1303+ Promotor, el carril 5 es el producto amplificado del ADN genómico de la línea silvestre que se utilizó como control positivo y el carril 6 es al producto amplificado del pCambia1303 sin inserto utilizado como control negativo. En el carril 1 del gel **B** se presentan los productos de la amplificación de los vectores extraídos de las colonias de *A. tumefaciens* transformadas, el vector pCambia1303+ Promotor+primer exón, en el carril 2 el producto amplificado del ADN genómico de la línea silvestre que se utilizó como control positivo y el carril 3 es el producto amplificado del pCambia 1303 sin inserto utilizado como control negativo.

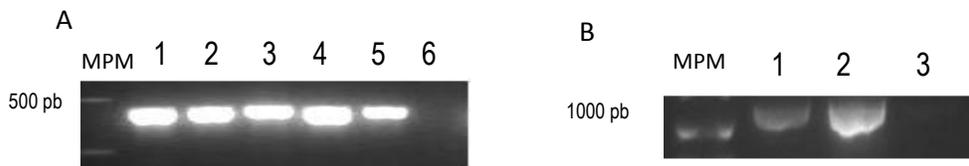


Imagen 18. Geles para verificación de la transformación de *A. tumefaciens* con pCambia1303+ secuencias correspondientes a la región del promotor de *ATX3*.

Estos plásmidos recombinantes permitirán proseguir con el método de “Floral Dip” para la transformación de *A. thaliana*.

7. ANÁLISIS DE RESULTADO

7.1 Análisis comparativo del desarrollo temprano en la línea mutante y silvestre

El análisis del desarrollo temprano de la línea silvestre como de la mutante *atx3* (Salk_077913 y Salk_103054C) de *A. thaliana* (Boyes D *et. al.* 2001) presentaron un comportamiento similar. Sin embargo, la línea mutante Salk_077913 presentó ligeros retrasos, a los 4 días la longitud de las raíces de esta línea presentaron menor longitud (7 de 16 plantas observadas), así como también a los 22 días de haber sido sembradas se observó un retraso en el desarrollo de las hojas que a los 21 días debe tener 10 pero la mutante tiene 7 en las mismas condiciones de crecimiento, según las etapas descrita por Boyes (2001) para el desarrollo de *A. thaliana*.

Etapas de crecimiento de <i>Arabidopsis</i> análisis fenotípico		
Etapa	Descripción	Datos Col 0 Días
Etapa de crecimiento Principal 1	Desarrollo de hojas	
1.02	2 hojas rosetas > 1mm	12.5
1.03	3 hojas rosetas > 1mm	15.9
1.04	4 hojas rosetas > 1mm	16.5
1.05	5 hojas rosetas > 1mm	17.7
1.06	6 hojas rosetas > 1mm	18.4
1.07	7 hojas rosetas > 1mm	19.4
1.08	8 hojas rosetas > 1mm	20.0
1.09	9 hojas rosetas > 1mm	21.1
1.10	10 hojas rosetas > 1mm	21.6
1.11	11 hojas rosetas > 1mm	22.2
1.12	12 hojas rosetas > 1mm	23.3
1.13	13 hojas rosetas > 1mm	24.8
1.14	4 hojas rosetas > 1mm	25.5
Etapa de crecimiento Principal 3	Crecimiento de Rosetas	

Figura 11. Tabla de descripción de las etapas de desarrollo normal de *A. thaliana* (Traducida y modificada de Boyes *et. al.*; 2001)

7.2 Análisis comparativo del desarrollo embrionario en las líneas mutante y silvestre

La autopolinización se llevó a cabo de forma normal; lo que se ve afectado en la línea mutante es el desarrollo embrionario. Los embriones pasan por diferentes etapas, en donde en cada una de éstas, la división celular da lugar a estructuras que conformarán la estructura final del embrión, hasta formar la estructura completa y finalmente las semillas de la planta (Figura 12).

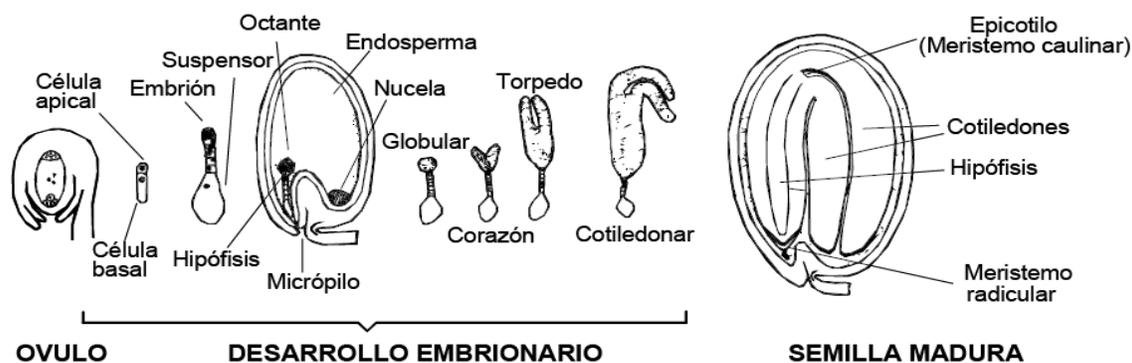


Figura 12. Desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana* (Meinke 1994, modificado)

El fenotipo que presentan estas líneas mutantes (*atx3*) es un desarrollo embrionario incompleto, lo cual se confirma con la baja expresión de *ATX3* en flores, un órgano de la planta en el que se encuentra estructurado el gineceo y que es donde se fertilizan los óvulos. Ya que para ninguna de estas dos líneas mutagenizadas no hay un fenotipo documentado, lo que motivó la investigación de la presente tesis.

En esta tesis se analizaron dos líneas mutantes de *ATX3*, una de ellas presenta la mutación por inserción de T-ADN en la región del promotor y la otra, en la región UTR3' (región terminal no codificadora). Fenotípicamente, las plantas con estos dos tipos de mutaciones presentan desarrollo incompleto de embriones. Lo que indica claramente que la mutación en el gen *ATX3* da como resultado este fenotipo.

7.3 Expresión de *ATX3* en la línea silvestre y mutante (*atx3*)

En el caso de las líneas homocigóticas para la mutación, cuya expresión de *ATX3* en flores se afectó, ya que se observó una disminución de su expresión, sin embargo, en la expresión en hojas no se observa gran variación, lo que puede deberse a la expresión basal (expresión espacio temporal) del gen en este tejido. Si tomamos en cuenta que en las plantas mutagenizadas con la inserción de T-ADN en el promotor de *ATX3*, no debería existir expresión alguna en ningún tejido de la planta, nuestros resultados pueden tener varias explicaciones hipotéticas. Una de ellas, es que el gen *ATX3* podría tener una región que pudiese ser reconocida por ciertos factores de transcripción específicos de hojas (diferentes a los de flor). Aunque el producto que se formaría a partir de los transcritos detectados por la reacción de PCR, podría estar afectado, y por lo tanto, ser una proteína no funcional. Otra especulación es que podría ser un efecto producido por el proceso de remoción diferencial de regiones génicas o “splicing” que culminara con remoción del inserto de T-ADN (y por tanto con la pérdida de la mutación) durante la transcripción del ADN en la planta. Nuevamente, esto último debido a la expresión diferencial del gen de forma espacio-temporal. Aunado a todo esto, tenemos el hecho de que al momento no existen líneas mutagenizadas para *ATX3* en regiones exónicas, las cuales probablemente son mutaciones letales para el organismo.

Diversos laboratorios han llevado a cabo estudios de la expresión de los diferentes genes que conforma el genoma de *A. thaliana* mediante la técnica de microarreglos (microarrays). En estos estudios, de manera masiva se busca conocer la expresión de todos los genes de la planta o de un tejido, bajo una determinada condición al mismo tiempo. De forma muy general, los análisis de los microarreglos están basados en la hibridación de moléculas de ácidos nucleicos (ADN, ADNc u oligonucleótidos) que funcionan como sondas, con ácidos nucleicos complementarios que se encuentran unidos a una matriz. La hibridación es detectada mediante algún tratamiento químico o físico que emite alguna señal radiactiva o fluorescente. A partir de este tipo de estudios se ha permitido tener conocimiento previo acerca de los niveles de expresión de *ATX3* en diferentes tejidos de *A. thaliana*, los cuales se muestran en la Figura 13, y se ha observado expresión en hojas, en flores y claramente se observa que en donde está la mayor expresión es en la silicua. En concordancia con este reporte, es en la silicua en donde se observa el fenotipo de desarrollo embrionario incompleto debido a la mutación de este gen.

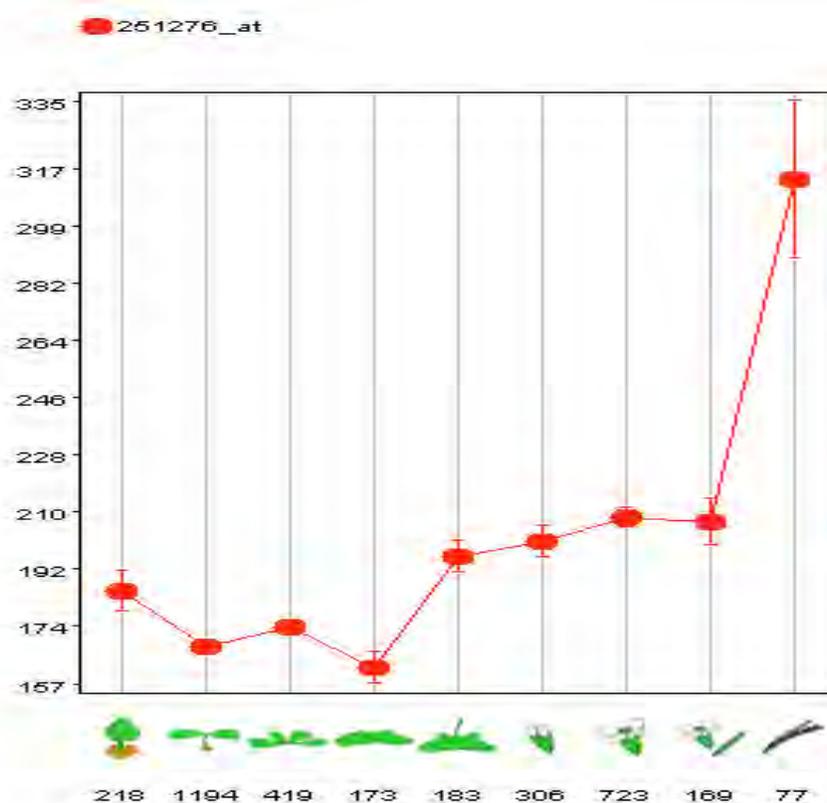
Niveles de expresión de *ATX3* en diferentes tejidos de *A. thaliana*

Figura 13. Esquema de la determinación de la expresión de *ATX3* en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*, conocida a través de microarreglos (www.geninvestigator.com).

Además, nuestros resultados indicaron una disminución de la expresión del gen en las flores, lo cual concuerda con lo esperado (una menor expresión), debido a que es en dicho órgano donde se observa la mayor afectación en el fenotipo del organismo a causa de la mutación. Así también, es posible que el porcentaje de embriones viables nos indique que el efecto de la mutación pudiera tener un efecto dependiente del tipo de gametofito (femenino o masculino).

7.4 Genotipificación de la línea mutagenizada (atx3)

Los resultados del análisis de genotipificación de las líneas mutantes confirmaron que efectivamente este trabajo experimental se realizó con líneas homocigóticas mutagenizadas por la inserción del T-ADN, y que por lo tanto, el fenotipo bajo estudio se debe a que los niveles de *ATX3* se ven afectados por la mutación. Esta conclusión deriva de que sólo se amplificó una banda para la línea silvestre con los oligonucleótidos *LP-PR*, presentes en los dos alelos de ADN, y en las líneas homocigóticas, que fueron el objeto principal de nuestro interés, sólo se observa una banda en el gel debido a que los dos alelos del ADN presentes en estas líneas contienen la inserción transferida por el plásmido, lo cual se comprobó con los productos obtenidos a través de la reacción de PCR observados en un gel.

7.5 Variabilidad en la expresión de genes homeóticos debido a la mutación del gen *ATX3*

La baja expresión de este gen imprescindible se puede asociar a la variación en la expresión de otros genes involucrados en el desarrollo embrionario debido a que el *ATX3* pertenece a la familia *Trithorax*, la cual presenta genes que codifican para metiltransferasas, productos que tienen una función que se ha asociado a la activación de factores de transcripción en plantas (Álvarez-Venegas R. *et al.*, 2003) y aunque todavía no se ha comprobado científicamente esta función para *ATX3*, su posible asociación con la expresión de otros genes es el inicio de una nueva línea de investigación.

Por lo mismo, se realizó el análisis de algunos otros genes relacionados con el desarrollo embrionario en *A. thaliana*. La prioridad de este análisis fue la búsqueda de genes cuya función se pudiera relacionar con la etapa de desarrollo en la que se ha observado la mayor afectación debido a la mutación de *ATX3*. Los resultados de este análisis son muy importantes, debido a que nos dan una idea amplia acerca de qué factores pudieran estar interviniendo en el fenotipo estudiado a partir de la mutación de *ATX3*.

Debido a las relaciones que pudieran existir entre las funciones de estos genes y el fenotipo observado, se determinó detectar la expresión de varios de ellos en el tejido de hoja y en flores de la línea mutante. Se detectó una diferencia en la expresión de genes como *KNAT6* y *KNAT1* respecto al tipo de tejido, ya que en las hojas no se expresaron ambos genes, pero sí en las flores.

Sugerimos que la disminución en la expresión de *KNAT1* y *KNAT6* en la mutante, puede estar asociada a que la diferenciación de las distintas estructuras (hojas, Meristemo y raíces) en el embrión de la línea mutante, este siendo afectada; lo cual se comprueba al observar la baja expresión de los genes en estos tejidos en comparación con los niveles de expresión de estos genes en el desarrollo normal de la planta silvestre. Al respecto, en estudios recientes se ha confirmado la presencia de la familia de genes *knotted-like homeobox (KNOX)* en *A. thaliana*, que se divide en 4 diferentes clases *KNOX*: *STM*, *KNAT1*, *KNAT2* y *KNAT6*. La clase *KNAT1* presenta expresión mayoritariamente en el Meristemo y en el tallo de la planta (Lincoln, 1994), que son estructuras que se diferencian desde la etapa de la embriogénesis; además también está relacionado con la etapa de florecencia de la planta (Venglat S.P. *et al.*, 2002). Mientras que *KNAT6* es un gen que está asociado con el desarrollo de raíces en *A. thaliana*, cuya organogénesis está relacionada con la embriogénesis debido a que la formación de raíces laterales es un ejemplo de una organogénesis post-embriónica (Konishi *et al.*, 2006).

En cuanto a la expresión del gen *LRP1*, en hojas no presenta gran variación entre la expresión observada en la mutante respecto a la línea silvestre, pero sí lo hace en flores, en donde hay una mayor expresión en la línea mutante *atx3* que en la silvestre *Col 0*. La flor es la parte donde se llevará a cabo la polinización y formación de embriones, esta variación puede estar asociada al fenotipo presente en las plantas debido a que se ha observado que la mutación de *LPR1* provoca que la embriogénesis se detenga en la fase globular.

El gen *FUS* presenta una mayor expresión en las hojas de *Col 0* que en las de la mutante *atx3*, mientras que en flores se observa una mayor expresión en *atx3* que en *Col 0* en flores. Esto sugiere que *ATX3* activa, en la flor, un represor de la expresión de *FUS*, mientras que en hoja parece estar directamente involucrado en la activación de *FUS*. En acuerdo a nuestro resultado, previamente se ha sido documentado que este gen presenta actividad biológica en la maduración de la semilla (Luerßen H *et al.*, 1998), así como también se ha comprobado que es un gen esencial en el desarrollo embrionario de *A. thaliana*. La expresión de este gen es importante para estos procesos ya que en estudios realizados en plantas mutantes en la expresión de este gen, se han encontrado que acumulan mayor cantidad de antocianinas, lo que indica insuficiencia de nitrógeno o fósforo por lo cual el desarrollo de la planta no se lleva de manera normal. Finalmente, esta mutación presenta un fenotipo en el que se observan manchas púrpuras en embriones y hojas (Castle and Meinke,

1994), tejidos en donde se observa la importancia del gen. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la expresión de *FUS* se afectó en ambos tejidos (tanto en hoja como en flor).

El gen *LEC* presenta una menor expresión en *atx3* que en *Col 0* en hojas, y una mayor expresión en *atx3* que en *Col 0* en flores. Se ha encontrado una relación de este gen con el desarrollo de la etapa de embriogénesis y funciona regulando la absorción de los nutrientes, mediando la resistencia a la desecación, así como las condiciones adecuadas para la maduración del embrión (To A. *et al.*, 2006). Las mutantes de este gen han presentado fenotipos con diferentes estructuras afectadas en *A. thaliana* (Meinke *et al.*, 1994) como hojas y meristemo. La alta expresión de este gen en flor de la línea mutante podría asociarse a la importancia que tiene en la embriogénesis.

El gen *NFYB6* presenta la misma expresión para ambas líneas en hoja, pero mayor expresión en las flores de las líneas mutantes. Se ha determinado que este gen tiene una función como factor activador de *LEC* (Yamamoto A *et al.*, 2009). Por lo que al existir una mayor expresión de *LEC* en flores también tendría que existir mayor expresión de este gen en el mismo tejido.

El gen *FBL17* es considerado esencial en el desarrollo de *A. thaliana* debido a que en estudios recientes (Gusti *et al.*, 2009) se ha demostrado que afecta la formación de gametofitos masculinos y se ha mostrado que las mutantes heterocigotos para este gen presentan un 44% de embriones no desarrollados (Gusti *et al.*, 2009). Consecuentemente se observa mayor expresión de *FBL17* en flores que en hojas, que es donde radica su principal función. Sin embargo, aparentemente sus niveles de expresión no son alterados, ya que ambas línea silvestres y mutante, presentaron la misma expresión tanto en hoja como en flor en líneas silvestres y mutantes.

Algunos de estos genes analizados no presentan mayor variación. El gen *CRANE* presenta mayor expresión en flores pero no existe variación alguna entre *atx3* y *Col 0*. No se detectó expresión de los genes *RPD1*, *ATBH53*, *PAD1*, en ninguno de los tejidos tanto de *Col 0* como de *atx3*. En estos experimentos se utilizó el gen de *actina 2/7* como control debido a que este gen no se afecta por la mutación en *atx3*.

La regulación de estos genes a partir de la mutación en *ATX3* puede ser por una relación directa o indirecta con la mutación. Si el gen *ATX3* funcionara como activador de los mismos, debido a su posible función como metiltransferasa. Incluso también podrían verse afectados de manera indirecta

debido a que *ATX3* puede funcionar en la activación de factores de transcripción de los cuales son dependientes estos genes para su expresión. De tal manera, proponemos que al no haber expresión de *ATX3* no habría activación de varios factores de transcripción y en consecuencia no se expresarían los genes relacionados bajo estudio. Esta meta es un aspecto muy importante dentro de las líneas de investigación a futuro en nuestro laboratorio. La cual consistirá en la búsqueda de la función de *ATX3* mediante la inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP* por sus siglas en inglés) para constatar la función específica como metiltransferasa que hasta el momento se le atribuye y, por lo tanto, de las modificaciones que sufren las cromatinas de los genes blanco de *ATX3*.

8. CONCLUSIONES

- Identificación de líneas mutantes homocigóticas para *ATX3* con un fenotipo mutante visible: afectación en el desarrollo embrionario en *A. thaliana*, sin embargo no afecta el desarrollo temprano de la misma.
- Este fenotipo se asocia directamente a la baja expresión de *ATX3* en las flores en la línea mutante.
- La expresión de *ATX3* no es nula ya que no existen líneas mutantes homocigóticas que presenten esta condición, lo cual indicaría que se trata de una mutación letal.
- La expresión de genes homeóticos como *LEC*, *FUS* y *KNAT1* pueden estar dependiendo de la expresión de normal de *ATX3*, puesto que la expresión de estos genes se ve afectada debido a la mutación de este gen.

8.1 Perspectivas a futuro del laboratorio de cromatina y epigenética

Debido al tiempo requerido para la transformación de *A. thaliana* mediante el método Floral Dip, se ha quedado en el laboratorio como pendiente la verificación de la expresión de *ATX3* en diferentes tejidos (hoja y flor principalmente) mediante el sistema GUS de una de las clonaciones que se realizó durante este trabajo que es la región correspondiente al Promotor y el Promotor + primer exón de este gen.

Posteriormente, se llevarán estudios en los cuales se determine la función de *ATX3* en *Arabidopsis thaliana*, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChiP, por sus siglas en inglés), con lo cual se comprobará la actividad de este gen y la regulación que tiene sobre otros genes de manera directa o indirecta. Así como también se plantea el estudio de este gen en complejos proteicos formados a partir de los productos de este gen con otros que se hayan visto afectados por la mutación del mismo. Y la manera en qué estos complejos intervienen en el desarrollo de la planta.

9. PROTOCOLOS

I. Desinfestación de semillas

1. Colocar las semillas en tubos eppendorf de 1.5-2 ml. Etiquetar cuidadosamente.
2. Agregar 1.5 ml de etanol o isopropanol a cada tubo y agitar lentamente 1 min dejar asentar las semillas y remover el alcohol.
3. Agregar 1.5 ml de blanqueador comercial al 50% (50% blanqueador 50% Agua estéril)
4. Mezclar 30 seg y dejar reposar 5 min* y remover blanqueador.
5. Agregar 1.5 ml de agua estéril, mezclar 30 seg y dejar asentar las semillas, remover el agua.
6. Colocar las semillas en medio sólido sin antibiótico
7. Transferir a cámara de crecimiento

*Nota: Tiempos mayores a 5 min disminuyen viabilidad de las semillas en un 70%

II. Medio MS (Murashige and Skoog salts) sólido para crecimiento de plantas 1L

Sacarosa 1%
0.8% Agar
pH 5.7

Esterilizar (autoclave) después dejar enfriar y agregar Vitaminas Vitamina B5 (1X).

*NOTA: Si el medio es para selección de plantas transformadas se agrega el antibiótico (Higromicina 10%, Kanamicina).

III. Medio B5-A para fertilización de plantas (Gamborg, *et. al*; 1968)

SOLUCIÓN 1B-5

REACTIVO	Fórmula	[mM]	mg/L	g/L5X
Nitrato de potasio	KNO ₃	25.0	2500.0	12.5
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .H ₂ O	1.0	150.0	0.75
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0	250.0	1.25
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	134.0	0.67
Yoduro de potasio	KI	0.0045	0.75	0.00375
Acido bórico	H ₃ BO ₃	0.05	30.0	0.15
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	0.06	10.0	0.05
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.007	2.0	0.01
Molibdato de sodio*	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.001	0.25	0.5 mL
Sulfato cúprico**	CuSO ₄ .5H ₂ O**	0.0001	0.025	0.5mL

*Preparar solución que contenga 2.5 mg/mL que

**Preparar solución que contenga 0.25 mg/mL

Cloruro de cobalto**	CoCl ₂ .6H ₂ O**	0.00011	0.025	0.5mL
----------------------	--	---------	-------	-------

* Preparar una solución

**Preparar una solución

SOLUCIÓN 2B-5

REACTIVO	Fórmula	[mM]	mg/L	g/L100X	g/0.5L100x
Fosfato monobásico de sodio	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.1	150.0	15.0	7.5

SOLUCIÓN 3B-5

REACTIVO	Fórmula	[mM]	mg/L	g/0.25 L 50X	g/0.5 L 50X
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.100	27.85	0.348	0.696
Na ₂ EDTA.H ₂ O	N ₃₂ EDTA.2H ₂ O	0.100	37.3	0.466	0.933
Inositol			100.0	1.25	2.5
Clorhidrato de piridoxina *			1.0	2.5 mL	S.0mL
Acido nicotínico *			1.0 J	2.5mL	S.0mL
Clorhidrato de tiamina**			10.0	12.5 mL	25.0mL

Preparar una solución que contenga 5 mg/mL ** Preparar una solución que contenga 10 mg/mL

PREPARACIÓN DEL MEDIO:

SOLUCIÓN 1B-5[5X] 200 mL

SOLUCIÓN 2 B-5 [100X] 10 mL

SOLUCIÓN 3 B-5 [50X] 20 mL

La dilución se hace con 67.8 ml de medio SB en 1 L de agua para cada charola de macetas.

IV.Método Urea para extracción de ADN

- a) Se obtiene el tejido de interés, se colecta en un tubo eppendorf de 1.5-2 ml.
- b) Colocar el tubo con el tejido en nitrógeno líquido, esperar hasta que este congelado.
- c) Moler el tejido, manteniendo condiciones de temperatura para que no haya degradación del ADN.
- d) Añadir 300 µl de Buffer de extracción de urea¹ y mezclar 4 min
- e) Adicionar 300 µl de Fenol:cloroformo (1:1). Agitar en vortex y centrifugar 5 min
- f) Transferir la fase acuosa (parte superior) a un tubo nuevo y agregar 4 µl de NaCl 5M en 100 µl de solución.
- g) Añadir el doble de volumen de etanol absoluto (100%), agitar por inversión y centrifugar* a 4° C por 15 min
- h) Decantar el sobrenadante y agregar 750 µl de etanol al 70% para lavar pastilla de ADN. Centrifugar* 4 min. Repetir este paso 1 vez más.
- i) Eliminar el etanol y dejar secar la pastilla de ADN.
- j) Resuspender la pastilla en 50 µl de agua destilada con RNAsa.

*Nota: todas las centrifugaciones son a 14 000 rpm

Buffer de UREA (100 ml)

42 g de Urea
6.25 ml NaCl 5M

10 ml de Tris-HCl
 4 ml de EDTA 0.5 M pH 8
 1g de sarcosina (N-laurilsarcosil)*
 *si no hay sarcosina utilizar 500 µl de tween 20 y 0.5 g de SDS

V. Electroforesis en Gel de Agarosa

Se prepara un gel de agarosa y se corre en Buffer TAE 1X, el voltaje varía dependiendo de la distancia entre los electrodos.

Gel de agarosa 1.2%

Se pesa el 1.2% de agarosa (W/V), se disuelve en TAE 1X, se calienta hasta disolver completamente la agarosa en el TAE 1X. Después de disolver la agarosa se agrega 1:100 000 del Colorante Gel Red (especificaciones Anexo 8).

*1 µl de Gel red a cada 100 ml de agarosa preparada. En el primer carril procurar poner el marcador de peso molecular¹.

TAE 50X (1L)

Tris-base	242 g
Ácido Acético (100%)	57.1 ml
EDTA 0.5M	100 ml

Afore con H₂O destilada a 1L

Para hacer TAE 1X, diluya 20 ml de TAE 50X y se afora con 980 ml de H₂O desionizada

El gel se expone a luz UV (cámara de UV), en un fotodocumentador. Debido a que la exposición a luz UV permite identificar las bandas debido a que el colorante utilizado para la preparación del gel se intercala entre el ADN y produce fluorescencia. Se observaron e identificaron las bandas correspondientes a cada amplificación debido al peso molecular de cada una. El marcador de peso molecular que se utiliza es de Fermentas.

VI. Preparación de células electrocompetentes

1. Sembrar en 10 ml de medio LB líquido una colonia de la cepa de interés y dejar crecer toda la noche en condiciones adecuadas para cada bacteria a 225 rpm.
2. Inocular 1 l de medio líquido de LB con los 10 ml del cultivo fresco.
3. Crecer el cultivo bacteriana a agitación constante (225 rpm) hasta que lleguen a una OD_{600nm} 0.5-08
4. A partir de este paso trabajar todo en frío. Enfriar recipiente que contiene el cultivo bacteriano por 15-30 min en hielo, posteriormente centrifugar a 5000 rpm por 15 min. Desechar sobrenadante
5. Resuspender en un litro de agua fría estéril y centrifugar 15min a 5000 rpm. Desechar sobrenadante.
6. Resuspender en 500 mlde agua fría y centrifugar 15 min a 5000 rpm. Desechar sobrenadante
7. Resuspender en 20 ml de glicerol al 10% frío
8. Tomar alicuotas de 50 µl en tubos eppendor y congelarlas en Nitrógeno líquido
9. Almacenar a -70° C

VII. Medio SOC (1L)

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
H ₂ O destilada	950 ml
KCl (250 mM)	10 ml

Ajustar pH 7 con NaOH (5M) llevar el volumen a 980 ml, autoclave 20 min, dejar enfriar hasta 55° C. Posteriormente agregar 10 ml MgCl₂ (1 M) estéril y 10 ml de Glucosa (2 M) estéril.

VIII. Medio LB (Luria-Bertani) líquido (1L)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O destilada	950 ml

Ajustar pH 7 con NaOH (5 M) llevar el volumen a 1. Autoclave 20 min, dejar enfriar hasta 55° C.

IX. Medio LB (Luria-Bertani) Sólido (1L)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O destilada	950 ml
Agar	15 g

Ajustar pH 7 con NaOH (5 M) llevar el volumen a 1. Autoclave 20 min, dejar enfriar hasta 55° C.

NOTA: Si es necesario agregar los antibióticos a la concentración requerida, después de que se haya enfriado el medio, ya que altas temperaturas pueden provocar la hidrólisis de los antibióticos.

X. Lisis Alcalina

1. Resuspender la pastilla celular en 200 µl de Solución I (GTE)* y agregar lisozima (20 mg/ml).Centrifugar 10 min a 14000 rpm.
2. Agregar 400 µl de Solución II* (preparar al instante) mezclar por inversión y dejar reposar 5 min en hielo.
3. Agregar RNAsa (10 mg/ml), mezclar y dejar reposar 30 min en hielo.
4. Agregue 300 µl de Acetato de potasio (3M) dejar en hielo 5 min.
5. Centrifugar 10 min a 14 000 rpm. Recuperar sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo, desechar los restos celulares.
6. Adicionar 540 µl de isopropanol frío, mezclar y dejar reposar 2 min.
7. Centrifugue 1 min a 14 000 rpm y descarte sobrenadante.
8. Lavar con 1 ml de etanol frío, centrifugue 1 pulso a 14 000 rpm. Repetir este paso 3 veces.
9. Secar al aire por 10 min o hasta que se elimine el exceso de etanol.
10. Resuspender en 30 µl de agua milli Q.

*** Soluciones**

Solución I GTE (Glucosa- Tris HCl- EDTA)

	Volumen	final concentration
40% Glucosa estéril	2.27 ml	50 mM
0.5 M EDTA, pH 8	2.0 ml	10 mM
1M Tris-HCl, pH 8	2.5 ml	25 mM
H2O estéril	93.23 ml	
Total	100 ml	

Use la solución en condiciones de esterilidad y a 4° C

Solución II

	Volumen	Concentración final
1N NaOH	2.0 ml	0.2 N
10% SDS	1.0 ml	1%
H2O estéril	7.0 ml	
Total	10 ml	

Preparar justo en el momento de su uso.

Acetato de Potasio 3M

	Volumen
5 M KOAc	60 ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
H2O	28.5 ml
TOTAL	100 ml

RNAse (10 mg/ml)

Disuelva 100 mg RNAse A (RNAse Pancreática), in 10 ml de Tris-HCl 10 mM NaCl 15 mM. Caliente a 100° C por 15 min. Baje la temperatura lentamente hasta temperatura ambiente. Guarde alícuota a -20° C

XI. Método Floral dip

-Germinación de semillas para crecimiento de plantas para transformación

Las plantas de *Arabidopsis* se crecerán en la cámara de crecimiento. Regándola y cuidando las condiciones, hasta que aparezca florescencia. Las plantas con florescencia que sean mayores a 5 cm de altura son seleccionadas para inoculación con *Agrobacterium*.

-Inoculación de medio con *Agrobacterium*

Una vez transformada *Agrobacterium* (con el vector modificado, que contiene el gen de interés) se inocula en medio LB más antibiótico para el cual presente resistencia el plásmido y se incuba a 28° C toda la noche. Una vez crecido se resiembr en medio LB más antibiótico, se inoculan 300 µl de este anterior al nuevo y se incuba nuevamente a 28° C hasta llegar a una Densidad óptica de 0.6.

Centrifugar el medio a 5500g por 20 min. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en medio de infiltración* y incubar y dejar crecer hasta obtener una Densidad óptica de 0.6.

Las plantas deben ser inoculadas con la suspensión que contiene la bacteria o transformarla directamente adicionando gota a gota inoculando cada una de las flores usando micropipeta.

***Medio de infiltración (1L)**

5% Sacarosa

0.05% Silwett L-77

XII.Extracción de ARN (Basado en Krapp et al., 1993).

Para la obtención de ARN se realiza primero una lisis celular con detergentes (Triton X-100, SDS) en presencia de agentes que inactivan las RNAsas como tiocianato de guanina, EDTA, urea y betamercaptoetanol. Posteriormente se llevan a cabo extracciones parecidas a las de la obtención del ADN, y se ultracentrifuga en cloruro de cesio, esto porque sólo el RNA es capaz de travesar el gradiente, ya que el ADN es más denso el ARN.

1. Tomar el tejido de interés del cual se desea obtener ARN, congelar en nitrógeno líquido.
2. Agregar Buffer de extracción. Centrifuga a 10 000rpm 10 min a 4° C.
3. Remover el sobrenadante y colocalo en un tubo nuevo.
4. Agregar mezcla de Fenol:cloroformo (1:1)
5. Adicionar 1/10 volúmenes de Acetato de sodio 3M (700µl) y dos volúmenes de etanol, incubar 2 h a -80° C
6. Centrifugar 30 min a 4° C a 10 000rpm, Descarte el sobrenadante.
7. Resuspender el pellet in Buffer de resuspensión incube 1 h a 4° C.
8. Centrifugue 30 min a 4° C y descarte el sobrenadante.
9. Centrifugue 10 min a 8,500rpm a 4°C, y resuspenda en agua libre de RNAsa.

Basádo en Krapp *et. al;* (1993) Plant Journal 3:817.

Soluciones:

- Buffer de extracción de ARN
- 4M Tiocianato de Guanidina
- 20 mM EDTA
- 20 mM MES
- Ajustar el pH a 7.0
- Adicionar agua libre de RNAsa a un volumen final de 400 ml, filtrar y esterilizar.

- Adicionar 1.7ml (la concentración final es 50 mM) 2-mercaptoetanol a cada 400ml solución guarde a 4°C.
- Buffer para resuspender RNA
- 2M Cloruro de litio
- 10mM Acetato de sodio
- Ajuste el volumen final a 250 ml y pH 5.2
- Filtrar, esterilizar y guardar a 4°C

XIII. Verificación de ARN en gel de agarosa 1.2%

Debido a que el ARNm comprende sólo el 1-3% del total de muestras de ARN no es fácil de detectar, incluso con el más sensible de los métodos. El ARN ribosomal, por el contrario, constituye más del 80% del total de las muestras de ARN, con la mayoría de sus componentes el ARN ribosomal 28S y 18S. La calidad de ARNm históricamente ha sido evaluada por electroforesis de ARN total, este método se basa en el supuesto de que la calidad y la cantidad de ARN debido a 28S y 18S RNA ribosomal de 5 kb y 2 kb de tamaño, el teórico 28S: 18S proporción es aproximadamente 2.7:1, pero una relación de 2:1 ha sido considerado como el punto de referencia para el ARN intacto. Las bandas 28S/18S son indicativas de ARN intacto.

Se prepara un gel de agarosa de 1.2% y se coloca 1-3 µl de ARN con el Buffer de carga en una relación 1:3, se mezcla y se coloca a 65° C por 15 min. Posteriormente se carga en el gel y se corre 1.5 h a 65 volts.

Buffer de carga para ARN

Para 5 ml

MOPS ¹ (10X)	500 µl
Formaldehído	875 µl
Formamida	2.5 µl
Colorante de carga ²	500 µl
Brometidio (10mg/ml)	13 µl
H ₂ O destilada	625 µl

1 MOPS 10X (100 ml)

MOPS (200mM)	4.19 g
Acetato de potasio (20 mM)	0.27 g
EDTA (10 mM)	0.37 g

1 Colorante de carga (1ml)

Glicerol	500 µl
Azul de bromofenol (1%)	250 µl
H ₂ O destilada	250 µl

10. Referencias Bibliográficas

Alvarez-Venegas R, Avramova Z (2001), **Two *Arabidopsis* homologs of the animal trithorax genes: a new structural domain is a signature feature of the trithorax gene family**, *Gene*, 271 (2) pp. 215-221.

Alvarez-Venegas R, Avramova Z (2002), **SET-domain proteins of the Su(var)3-9, E(z) and Trithorax families**; *Gene*, 285 (1-2), pp. 25-37.

Alvarez-Venegas R, Pien S, Sadler M, Witmer X, Grossniklaus U & Avramova Z (2003) **ATX-1, an *Arabidopsis* Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes**; *Current Biology*, 13 (8) pp. 627-637.

Alvarez-Venegas R, Sadler M, Tikhonov A & Avramova Z (2006), **Origin of the Bacterial SET Domain Genes: Vertical or Horizontal?**, *Molecular Biology and Evolution* 24(2) pp 482-497.

Baumbusch L O, Thorstensen T, Krauss V, Fisher A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Ruter G & B. Aalen R (2001) ***Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes**; *Nucleic Acids Research*, 29 (21) pp 4319-4333.

Bennett M D, Leitch I J, Price H J & Johnston J S (2003) **Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 M**; *Annals of Botany* 91(5) pp 547-557.

Bent A (2000), ***Arabidopsis* in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species**; *Plant Physiology* 124 (4) pp 1540-1547.

Berleth T & Chatfield S (2002) **Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell**; *The Arabidopsis Book*; First published on September, Ed. The American Society of Plants Biologists pp 1-28

Bolker J A (1995), **Model systems in developmental biology**, *Bioessays* 17(5) pp 451-455.

Boyes Douglas C, Zayed Adel M, Ascenzi Robert, McCaskill Amy J, Hoffman Neil E, Davis Keith R, & Görlach Jörn (2001), **Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants**; *The Plant Cell* 13 (7) pp 1499–1510.

Breen T R & Harte PJ (1993), ***trithorax* regulates multiple homeotic genes in the bithorax and Antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promoter-specific effects on each**; *Development* 117 pp 119-134.

Castle L & Meinke D (1994), **A *FUSCA* Gene of *Arabidopsis* Encodes a Nove1 Protein Essential for Plant Development**, *The Plant Cell* 6 pp 25-41.

Christie P (1997); ***Agrobacterium tumefaciens* T-Complex Transport Apparatus: a Paradigm for a New Family of Multifunctional Transporters in Eubacteria**; *Journal of Bacteriology* 179(10) pp 3085–3094.

Clough SJ & Bent AF, (1998). **Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana***. *Plant Journal* 16 pp 735-743.

Dean G, Casson S & Lindsey K (2004) ***KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation**, *Plant Mol Biol.* 54 (1) pp 71–84.

Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G. & Saumweber, H. (1993). **The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, E(var)3-93D, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(23) pp 11376—11380.

Gamborg, OL, Miller, R.A. & Ojima, K (1968). **Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.** Exp. Cell Res. 50 pp 151-158.

Gusti A., Baumberger N., Nowack M, Pusch S, Eisler H, Potuschak T, De Veylder L, Schnittger A & Genschik P (2009); **The *Arabidopsis thaliana* F-Box Protein FBL17 Is Essential for Progression through the Second Mitosis during Pollen Development;** Plant Journal 58(5) pp 843-856.

Jenuwein T, Laible G, Dorn R & Reuter (1998), **SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin;** Cell Mol Life Sci. 54(1) pp 80-93.

Johnston A, Meier P, Gheyselinck J, Wuest S, Federer M, Schlagenhauf E, Becker J & Grossniklaus U (2007), **Genetic subtraction profiling identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte;** Genome Biology 8 (10) pp 204

Jones R S & Gelbart W M (1993), **The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax,** Mol Cell Biol 13(10) pp 6357-6366

Karcher, S. J. (2002), **Blue plants: Transgenic plants with the *GUS* reporter gene.** Tested studies for laboratory teaching, Volume 23 (M. A. O'Donnell, Editor). Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 392 pages, pp 29-42,

Krapp, A., B. Hofmann, C. Schafer and M. Stitt. 1993. **Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the sink regulation of photosynthesis.** Plant Journal 3: 817-828.

Konishi M & Sugiyama M (2006), **A Novel Plant-Specific Family Gene, *ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1*, Is Required for the Maintenance of Active Cell Proliferation,** Plant Physiol. 140 pp 591-602.

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. & Hake, S. (1994) **A *knotted1*-like Homeobox Gene in *Arabidopsis* Is Expressed in the Vegetative Meristem and Dramatically Alters Leaf Morphology When Overexpressed in Transgenic Plants,** Plant Cell 6 pp 1859-1876.

Luerßen H, Kirik V, Herrmann P & Misera S (1998), ***FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*;** Plant Journal 15(6) pp 755-764.

Martínez Trujillo M, Limones Briones V, Cabrera-Ponce J, & Herrera Estrella L (2004); **Improving Transformation Efficiency of *Arabidopsis thaliana* by Modifying the Floral Dip Method;** Plant Molecular Biology Reporter 22(1) pp 63-70

Meinke D, Muralla R, Sweeney C & Dickerman A (2008), **Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*,** Trends Plant Sci. 13(9) pp 483-491.

Meinke D, Franzmann L, Nickle T & Yeung E (1994) , ***Leafy Cotyledon* Mutants of *Arabidopsis*,** The Plant Cell 6 pp 1049-1064.

Ooi L & Wood I. (2007) **Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from *REST*;** Nature Reviews Genetics 8 pp 544-554.

Peterson C & Laniel M (2004); **Histones and histone modifications;** Current biology: Current Biology 14(14) pp 546-551.

Pien S, Fleury D, S. Mylne J, Crevillen P, Inze D, Avramova Z, Dean C, & Grossniklaus U (2008), **ARABIDOPSIS TRITHORAX1 Dynamically Regulates FLOWERING LOCUS C Activation via Histone 3 Lysine 4 Trimethylation**, Plant Cell. 20(3) pp 580-588.

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl D, Sun Z, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting C, Allis D & Jenuwein T (2000); **Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases**, Nature 10; 406(6796) pp 593-599.

Recillas F (2000); **La estructura de la cromatina y su relación con la regulación de la expresión genética**; Sociedad Mexicana de Bioquímica, BEB 20 (1) pp 6-18

Recillas F & Escamilla M (2004); **Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica**; MENSAJE BIOQUÍMICO, Vol. XXVIII pp 173-201.

Saleh A, Alvarez-Venegas,R, Yilmaz M, Oahn-Le, Hou G, Sadler M, Al-Abdallat A, Xia Y, Lu G, Ladunga I, & Avramova Z (2008), **The Highly Similar Arabidopsis Homologs of Trithorax ATX1 and ATX2 Encode Proteins with Divergent Biochemical Functions**; Plant Cell 20(3) pp 568-579.

Sambrook J & MacCallum P (2001); Cancer Institute, Melbourne, Australia; *David Russell*, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (Third Edition),

Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D. & Lohmann, J.U. (2005). **A gene expression map of Arabidopsis thaliana development**. Nat. Genet. 37 pp 501-506.

Sevilla S D, (2007); **Metodología de los estudios de asociación genética**, Insuficiencia Cardiaca 2 (3) pp 111-114

Sims R, Nishioka K & Reinberg D (2003); **Histone lysine methylation: a signature for chromatin function**; TRENDS in Genetics 19 (11) pp 629-639.

Stassen J, Bailey D, Nelson S, Chinwalla V, & Harte P (1995), **The Drosophila trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins**; Mechanisms of Development, 52 (2-3) pp. 209-223.

Tariq M & Paszkowski J (2004), **DNA and histone methylation in plants**; TRENDS in Genetics 20 (6) pp 244-251.

To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J & Parcy F (2006), **A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs Arabidopsis Seed Maturation**, Plant Cell. 18(7) pp 1642-1651.

Tschiersch B,Hofmann A,Krauss V,Dorn R, Korgel G & Reuter G (1994) **The protein encoded by the Drosophila positioneffect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes**, The EMBO Journal 13 (16) pp 3822-3831.

Venglat S.P., Dumonceaux T, Rozwadowski K, Parnell L, Babic V, Keller W, Martienssen R,Selvaraj G & Datla R (2002) **The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in Arabidopsis** Proceedings of the National Academy of Science 99 (7) pp 4730-4735.

Verdone L, Agricola E, Caserta M & Di Mauro E (2006), **Histone acetylation in gene regulation**; Briefings in Functional Genomics and Proteomics 5(3) pp 209-221.

Yamamoto A, Kagaya Y, Toyoshima R, Kagaya M, Takeda S & Hattori T (2009), **Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors**; The Plant Journal 58 pp 843-856

Yu B., HANSON B, HESS J, HORNING S & KORSMEYER S (1998), **MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 pp 10632–10636

West M & Harada J (1993); **Embryogenesis in Higher Plants: An Overview***The Plant Cell*, American Society of Plant Physiologists 5 pp 1361-1369.

Hipervínculos

Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* (2000), *Nature*.14;408(6814) pp 796-815. Fecha de consulta 8 de Febrero 2010.

<http://www.promega.com/tbs/9pim180/9pim180.pdf> Fecha de consulta 25 Octubre 2009

http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf Fecha de consulta 25 Octubre 2009

<http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/hybtech/liu/arabidopsirsna.html> Fecha de consulta 28 Noviembre 2009.

<http://www.arabidopsis.org/> (The Arabidopsis Information Resource) Fecha de consulta 30 Septiembre 2009

<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> Fecha de consulta 18 Octubre 2009.

http://www.arabidopsis.org/comguide/chap_3_dna_techniques/2_DNA_extraction.html Fecha de consulta 28 Noviembre 2009.

<http://wiki.duke.edu/display/rausherlab/Arabidopsis+floral+dip+transformation> Fecha de consulta Septiembre 2009

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/trujillo_lg/anexos.pdf Fecha de consulta Enero 8 2010.

http://departments.colgate.edu/chemistry/images/rowlett_athaliana.jpg Fecha de consulta Octubre 2009

<http://www.jornada.unam.mx/2000/12/18/Images/cien-arabid.jpg> Fecha de consulta 3 Febrero 2010. El autor es jefe de la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología de la UNAM

www.epigenome.eu/media/images/large/406.jpg Fecha de consulta 3 Febrero 2010 Diseño de by Tom Davis

http://www.biotium.com/product/product_info/Protocol/PI-41001.pdf Fecha de consulta 4 Febrero 2010 Copyright © Biotium, Inc. All rights reserved.

http://www.cultek.com/index.asp?p=oferta&id_off=45 Fecha de consulta 4 Febrero 2010

<http://www.cecalc.ula.ve/bioinformatica/BIOTUTOR/pregs/t9p17.gif> Fecha de consulta 4 febrero 2010

Vector NTI, Invitrogen