



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización de la participación de dos genes MADS – box tipo II (*AGL14* y *AGL19*) en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTNER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**Mónica Duhyadi Oliva García**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Adriana Garay Arroyo**

**2013**



## **Agradecimientos**

A la Dra. Adriana Garay Arroyo por las enseñanzas técnicas y teóricas durante la realización de esta tesis.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Alicia Gamboa de Buen, Dr. Charles Stewart Gillmor II, Dra. Berenice García Ponce de León y a la Dra. Guillermina Murguía Sánchez por todas las sugerencias que enriquecieron esta tesis.

A la Dra. Yamel Ugartechea Chirino, por su dirección y aporte de ideas durante la realización de esta tesis. Así como por su atención en interés prestada en este proyecto.

A Diana Romo Ríos por su constante apoyo administrativo.

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos de investigación: UNAM, PAPIIT: IB201212-2; IN2044011-3; IN229009-3; IN226510-3; IN204011-3. CONACYT: 152649; 81542; 81433; 167705; 105678; 180098 y 180380. Red Temática de Investigación CONACYT: “Complejidad, Ciencias y Sociedad” 124909. UC –MEXUS CN 12 – 623.

## **Agradecimientos a título personal**

*“Es algo difícil crecer sabiendo que la cosa de donde podemos agarrarnos para enraizar está muerta. Con nosotros, eso pasó (¡Diles que no me maten!, Juan Rulfo). **Conmigo eso paso, y si, es difícil más no imposible porque están contigo siempre los recuerdos”***

A mi madre (Patricia García Calvo), desde 2008 no estás físicamente, me hiciste falta (muchísima). A pesar de ello estuvieron conmigo siempre tus enseñanzas de vida que pude aprender junto a ti en el hospital. Porque a pesar de que tu enfermedad era grave tú siempre supiste sonreír. Y sabes....porque en realidad siempre estuviste conmigo, en cada momento en los que pensaba que ya no podría seguir venían a mi mente tus frases célebres:

*“Me quiebro, me quiebro, me quiebro pero no me doblo. **PORQUE SOY COMO UN ROBLE QUE SE QUIEBRA PERO NO SE DOBLA”***

*“¿Qué es lo peor que puede pasar?”*

*“Ya es el último jalón”*

A mi padre (Oscar Humberto Oliva Chávez) a pesar de las diferencias que tuvimos demostraste que estabas junto a mí apoyándome.

A mi hermano (Oscar Humberto Oliva García) si bien es cierto no estuve contigo para apoyarte de la forma más adecuada, tu si lo hiciste escuchándome.

Sin ustedes tres la culminación de esta tesis no hubiera sido posible.

Gracias por todo

A mis tíos Lourdes Oliva Chávez y Abel Barrueta Jaimes por su apoyo ofrecido en el período de 2010- 2011.

A la Dra. Irma Romero, quien fue parte importante en mi formación dentro de un laboratorio.

Bueno y dicen por ahí, que detrás de una gran tesis, hay unos grandes amigos ¿Quién dice eso? Yo.

A mis amigos:

**Alfa y Mariana:** gracias por escucharme y aterrizarme a su forma (Like a rolling Stone). Por cierto Mariana de nuevo gracias por esas posadas eventuales.

**Alejandra Celeste:** gracias por la posadas eventuales, y demostrar una amistad sincera en poco tiempo de conocernos. Espero no deberte hartó.

**Erandi:** siempre estuviste cerca, escuchándome, incluyéndome en tus proyectos, abrazándome y ofreciendo tu apoyo incondicional.

**Gaby:** que puedo decir... cuando más te necesite hiciste algo no por mí sino por mi madre.

**Gerado Salazar:** solo me queda decir gracias.

**Karla Citlali:** gracias por esa forma tan graciosa de animarme.

**Minely:** gracias por escucharme y ofrecer tu apoyo.

**Sergio:** estuviste ahí cuando más lo necesite.

**Úrsula:** gracias por impulsarme. Como olvidar aquellos días en los que me mantuve alejada de la facultad y no te olvidaste de incluirme y animarme a retomar la carrera.

**Aurora:** casi no convivimos y a pesar de eso me diste ánimos.

A las chicas del C3: Esther, Eli, Moni y Libertad.

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	II
AGRADECIMIENTO TITULO PERSONAL .....	III
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Diferencias del desarrollo embrionario entre plantas y animales .....	4
1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo .....	5
1.3 Desarrollo embrionario en plantas .....	6
1.3.1 Tipos de embriogénesis .....	9
1.4 Desarrollo embrionario en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
1.5 Conformación de la semilla en Angiospermas .....	18
1.6 Factores de transcripción y sus implicaciones en la Biología del desarrollo .....	19
1.7 Familia de factores transcripcionales tipo MADS – box. ....	20
1.7.1 Familia de genes MADS box en el desarrollo embrionario de <i>Arabidopsis thaliana</i> ....	22
1.8 Transporte de auxinas durante el desarrollo embrionario de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
1.8.1 Factores de transcripción en el desarrollo embrionario de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
1.9 Cómo detectar posibles alteraciones en el desarrollo embrionario a través del fenotipo.....	27
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....	29
3. HIPÓTESIS .....	30
4. OBJETIVOS .....	30
4.1 General .....	30

4.1.1. Objetivos Particulares .....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
5.1 Material biológico utilizado.....	31
5.2 Plantas y condiciones de crecimiento.....	32
5.3 Número de semillas en desarrollo, silicuas desarrolladas correctamente y abortadas . .	33
5.4 Determinación del tamaño de la semilla y análisis citológicos del embrión maduro. ....	33
5.5 Análisis citológicos de embriones maduros e inmaduros.....	34
5.6 Análisis Estadísticos.....	34
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
6.1 Existe un menor número de semillas desarrolladas en etapas tempranas del desarrollo embrionario en <i>agl19-3</i> . .....	34
6.2 <i>AGL19</i> regula procesos de homeostasis celular durante el desarrollo embrionario .....	37
6.3 El meristemo apical de la radícula se establece adecuadamente en <i>agl19-3</i> .....	38
6.4 La falta de <i>AGL19</i> no afecta la proliferación y expansión celular en la radícula.....	42
6.5 El tercer plano de división está afectado en <i>agl19-3</i> .....	46
6.6 Las diferencias en color en las semillas en desarrollo en <i>agl19-3</i> no explican el fenotipo menor número de semillas en desarrollo.....	48
6.7 <i>AGL19</i> podría estar participando en el desarrollo del fruto (silicua).....	49
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>9.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>

<b>11. APENDICE .....</b>	<b>58</b>
<b>11.1 Apéndice A. Metodología .....</b>	<b>66</b>
<b>11.2 Apéndice B. Estadística.....</b>	<b>70</b>
<b>12 MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>72</b>



## Resumen

La familia de genes MADS-box participa en múltiples procesos de desarrollo en plantas, sin embargo, muy poco se conoce de su participación en el desarrollo embrionario. Hasta ahora únicamente se tiene reportada la expresión de *AGL15*. Sin embargo, análisis celulares del desarrollo embrionario en *agl15* y *agl15 agl18* (*AGL15* y *AGL18* genes homólogos) no presentan alteraciones durante el desarrollo. Este trabajo se centra en determinar si *AGL14* y *AGL19* (genes MADS-BOX tipo II), podrían participar en el desarrollo embrionario, ya que regulan transportadores de auxina (*PIN*s) post-embrionariamente, algunos de los cuales son fundamentales para la embriogénesis. Además *agl19* tiene un fenotipo de semilla más grande (fenotipo caracterizado en este proyecto). Para ello se determinaron parámetros indicadores de alteraciones en el desarrollo embrionario (número de semillas desarrolladas y tamaño de la semilla) en las mutantes sencillas y en la doble mutante. *agl19-3* presentó el fenotipo más evidente: menor número de semillas en desarrollo y tamaño de semilla más grande (fenotipo que no pudo explicarse en la radícula). Por esta razón únicamente en *agl19-3* se realizaron caracterizaciones celulares de la radícula y de las primeras etapas de desarrollo. Se encontraron defectos en la organización celular del meristemo radicular y en la especificación del tercer plano de división celular durante el desarrollo embrionario. Estos resultados refutan la idea de que para detectar alteraciones en el desarrollo embrionario es necesario realizar mutantes múltiples de esta familia de genes.

## Abstract

The family of MADS-box genes involved in multiple developmental processes in plants, however, little is known of their involvement in embryonic development. Until now we have only reported *AGL15* expression. However, cellular analysis of embryonic development and *agl15 agl15 agl18* (*AGL15* and *AGL18* genes homologous) no alterations during development. This paper focuses on whether *AGL14* and *AGL19* (MADS-box genes type II), could be involved in embryonic development and regulating auxin transporters (PINs) post-embryonic, some of which are essential for embryogenesis. Furthermore *agl19* has a larger seed phenotype (phenotype characterized in this project). We identified parameters indicative of abnormal embryonic development (number and size of seeds developed seed) in the single mutants and the double mutant. *agl19-3* presented the most obvious phenotype: fewer developing seeds and larger seed size (phenotype that could not be explained in the radicle). For this reason only *agl19-3* cell characterizations were performed and the radicle of the early stages of development. Defects were found in the root meristem cellular organization and the specification of the third plane of cell division during embryonic development. These results refute the notion that to detect alterations in embryonic development must perform multiple mutants of this family of genes.

## 1. Introducción

La biología del desarrollo trata de comprender cómo es que: *“una masa celular relativamente simple y homogénea puede diferenciarse en un organismo relativamente complejo y heterogéneo semejante a sus progenitores”* (Robert, 2004 en: Caballero, 2008).

En las últimas décadas se ha incorporado el contexto evolutivo al estudio de la biología del desarrollo (Evolutionary Developmental Biology; Evo – Devo), partiendo del siguiente postulado: *“nada en biología tiene sentido si no es a la luz de la evolución”* (Dobzhansky, 1964). La Evo-Devo es una disciplina que trata de explicar la diversidad fenotípica existente a través de la biología del desarrollo. Se puede definir como el estudio de los mecanismos de desarrollo que han dado lugar a cambios evolutivos importantes y se apoya en las relaciones filogenéticas entre los organismos analizando los patrones de desarrollo de los mismos (Bertossa, 2011).

El objetivo principal de esta disciplina, es tratar de comprender cómo ha ido evolucionando el patrón corporal que constituye a un organismo y cuáles son los mecanismos genéticos (redes de regulación genética) que subyacen el establecimiento del mismo. Es decir, intenta reconocer aquellos elementos esenciales que determinan el desarrollo del plan corporal de diferentes organismos. Un ejemplo, sería establecer cuál es el programa genético básico encargado del establecimiento del plan corporal en el reino animal, para lo cual, hay que reconocer un *“conjunto mínimo”* de genes involucrados en dicho establecimiento, desde cnidarios hasta vertebrados. De este ejemplo surge la siguiente pregunta: *“¿porqué a través de la evolución ha ido incrementado la complejidad del plan corporal, si , este es el resultado únicamente de un incremento reducido de genes en dicho conjunto mínimo esencial para el desarrollo?”* (Ten Tusscher y Hogeweg, 2011). Esta pregunta trata de ser abordada desde la disciplina Evo–Devo, enfocándose en investigar los cambios espacio / temporal de los patrones de expresión génica y las diferencias en la arquitectura que las redes de desarrollo generan en los diferentes organismos (Ten Tusscher y Hogeweg, 2011).

De manera conjunta, la biología del desarrollo y la teoría de la evolución tratan de dar respuesta a los siguientes cuestionamientos: ¿Cómo se diferencian las células tras las divisiones en el cigoto?, ¿cómo se integra esa organización en distintos tejidos y órganos? y ¿qué elementos subyacen en la formación de nuevos patrones corporales?

Actualmente las plantas han resultado un modelo muy adecuado para llevar a cabo estudios de desarrollo, ya que poseen dos zonas meristemáticas expuestas (apical y radical) en las que se encuentra un nicho de células troncales. Esto último permite tener en cualquier momento del desarrollo procesos celulares de diferenciación y proliferación, de los cuales depende el desarrollo y crecimiento de cualquier órgano de una planta. El meristemo apical forma continuamente hojas y tallos y puede ser reprogramado para formar estructuras reproductivas: primero un meristemo de inflorescencia que es indeterminado y luego muchos meristemas florales que son determinados. El meristemo radical es el encargado del establecimiento de todos los tipos celulares que constituyen la raíz (Scheres, 2007).

## **1.1 Diferencias en el desarrollo embrionario entre plantas y animales**

El desarrollo de los eucariontes incluye la generación de un plan corporal, especie específico (Friml *et al.*, 2003) que está antecedido por un proceso de organización multicelular a partir del cigoto, es decir, la célula totipotencial a partir de la cual, tras divisiones subsecuentes, se originan una gran cantidad de células que, durante la embriogénesis de plantas, adoptarán destinos celulares específicos acorde a posiciones relativas (Ugartechea, 2007).

Como resultado de una historia evolutiva divergente entre plantas y animales, se han generado diferentes procesos y estrategias de desarrollo. Por ejemplo, las plantas se caracterizan por tener un desarrollo post embrionario, esto quiere decir que sus órganos se especifican después de la germinación. Mientras que en animales terminada la embriogénesis están conformados todos los órganos y

tejidos que los constituyen, aún cuando existen células madre en el organismo terminando el desarrollo embrionario. Otra diferencia es que son organismos sésiles, esto se relaciona con la capacidad que tienen para integrar decisiones de diferenciación o de morfogénesis en respuesta a cambios ambientales (Cruz, D. 2010). A nivel celular, las células vegetales tienen una posición fija debido a la presencia de una pared celular rígida que les impide moverse durante el desarrollo, mientras que las células animales tienen movilidad (Ugartechea, 2007).

## **1.2 *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo**

Un organismo modelo, es aquel sistema experimental en el cual se centran varios grupos de investigación con el fin de generalizar información que pueda ser aplicable a otras especies (Bolker, 1995).

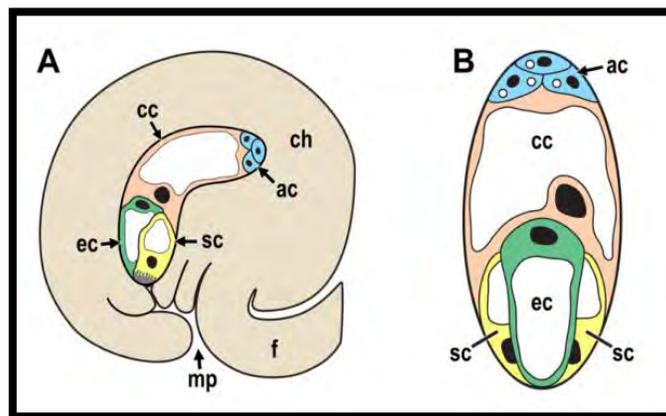
*Arabidopsis thaliana*, es el modelo experimental de plantas más utilizado en genética y biología molecular, debido a que posee un ciclo de vida corto y es de tamaño pequeño, lo cual, hace que su manipulación en condiciones de laboratorio sea muy accesible. Por otro lado, es capaz de producir hasta 10,000 semillas por planta, es autógama y con un genoma pequeño repartido en cinco cromosomas cuya secuencia ha sido determinada y está disponible en <http://www.arabidopsis.org/> (The Arabidopsis Information Resource; TAIR). Además, se cuenta con mutantes para casi todos sus genes, esto permite saber más de su función, además posibilita el estudio de mutantes de genes que normalmente no serían viables en animales (Meyerowitz, 2001). *A. thaliana* presenta características típicas de las angiospermas, por lo que la investigación generada sirve como base para otras especies de plantas. Recientemente se consideró como un buen modelo de estudio para la comprensión molecular de algunas enfermedades humanas, ya que de los genes que se relacionan con el cáncer *Arabidopsis* cuenta con el 70 % de los genes ortólogos (Jones *et al.* 2008).

### 1.3 Desarrollo embrionario en plantas

Las espermatofitas se dividen en dos grandes grupos: gimnospermas y angiospermas. La estructura de los órganos reproductivos es el carácter distintivo entre ambos grupos. En las gimnospermas se les llama estróbilos o conos, son unisexuales y generalmente son dioicas, aunque también pueden ser monoicas; mientras que en las angiospermas el órgano reproductivo es la flor que, generalmente, es hermafrodita y con frecuencia hay especies con flores unisexuales. (Frohlich, 2003). Otra diferencia entre estos dos grupos, se debe al proceso de fertilización. En las plantas con flor, existe una doble fertilización que da como resultado un embrión diploide y un tejido extraembrionario triploide, denominado endospermo, cuya función es nutrir al embrión. Mientras que, en las gimnospermas, no existe la doble fertilización, el gametofito femenino es el encargado de nutrir al embrión; en algunas especies pueden formarse poliembriones, esto, considerado desde el punto de vista evolutivo, como la antesala de la conformación del endospermo (Baroux *et al.* 2002). A pesar de estas diferencias el desarrollo y la organización básica del plan corporal del embrión es muy similar entre las espermatofitas (Cairney y Pullman, 2007).

La embriogénesis o desarrollo del embrión es el proceso mediante el cual se transforma una célula fecundada (el cigoto) en una plántula, proceso complejo que incluye eventos coordinados como son la proliferación, diferenciación celular y la morfogénesis (Gifford y Foster, 1989; en Cairney y Pullman, 2007). En angiospermas, éste proceso involucra la fertilización de la célula huevo por una de las células espermáticas, ambas células se encuentran dentro del gametofito femenino y masculino respectivamente. El gametofito femenino (Figura 1), también conocido como saco embrionario o megagametofito, está conformado por varios tipos celulares: una célula central, tres células ubicadas hacia la parte apical de la célula central (antípodas) y dos células que se encuentran rodeando a la célula huevo (sinérgidas). El gametofito masculino, grano de polen o microgametofito se desarrolla dentro de la antera y está conformado por dos células espermáticas encerradas dentro de una célula vegetativa.

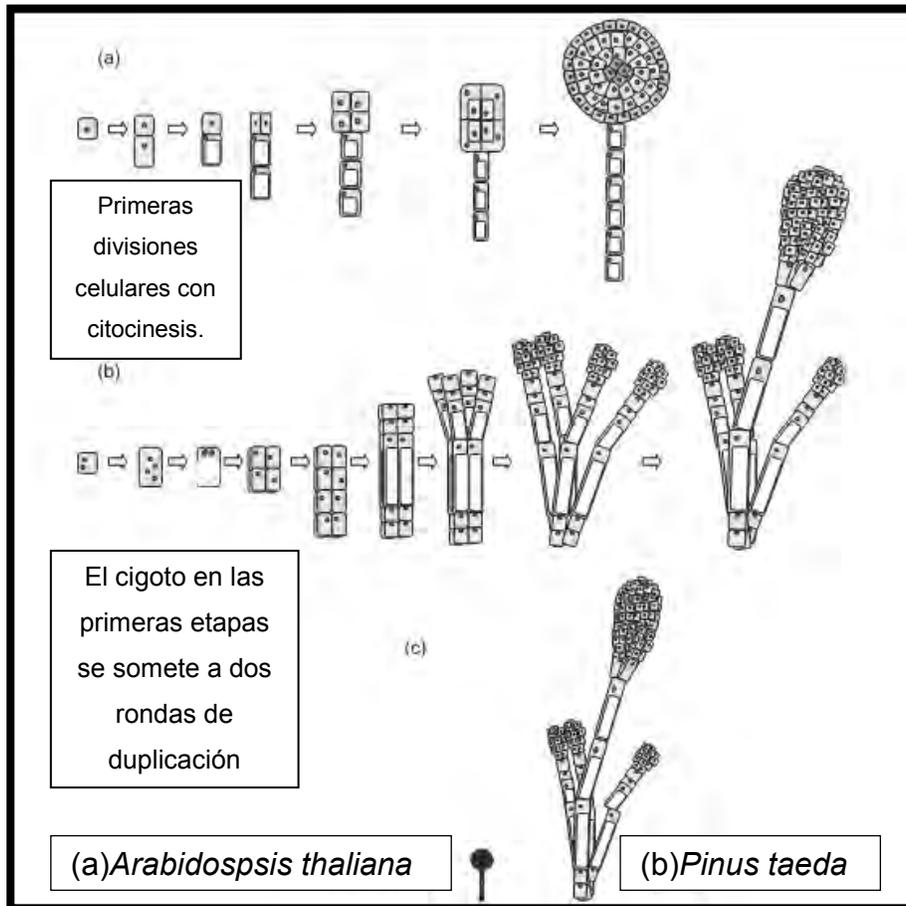
Dentro del gametofito femenino, la célula huevo y las sinérgidas ocupan el polo micropilar y las antípodas se encuentran ubicadas hacia la chalaza. Ésta polarización es importante para la fertilización (eje chalaza–micrópilo) ya que el tubo polínico alcanza al gametofito femenino a través del micrópilo, teniendo acceso directo para llevar a cabo la fertilización de la célula huevo y la célula central a través de las dos células espermáticas que lo constituyen (Drews y Koltunow, 2011).



**Figura 1.** Gametofito femenino de *Arabidopsis* (estructura que puede generalizarse para las demás angiospermas). **A)** Óvulo y **B)** Gametofito femenino. Las abreviaturas indican: células antípodas (antipodal cells; **ac**); célula central (central cell; **cc**); región de la chalaza en el óvulo (chalazal; **ch**); célula huevo (egg cell; **ec**); funículo (funiculus; **f**); micrópilo (micropyle; **mp**) y células sinérgidas (synergid cells, **sc**). Figura tomada de Drews y Koltunow, 2011.

La embriogénesis en espermatofitas puede describirse en tres grandes fases. La primera fase ocurre después de la fertilización e incluye un proceso de morfogénesis durante el cual se establece el plan corporal básico; es decir, se conformará un eje apico-basal y uno radial. En la siguiente fase, hay divisiones celulares adicionales y se lleva a cabo el desarrollo de los meristemas que permiten que el crecimiento post embrionario sea establecido. La fase final es la desecación que prepara al embrión maduro para la latencia (West y Harada, 1993).

En angiospermas, la embriogénesis se caracteriza por tener divisiones asimétricas del cigoto, la primera de las cuales da lugar a una célula apical, destinada a formar al embrión propiamente y a una célula basal larga, la cual contribuye a la formación del suspensor, estructura involucrada en la nutrición del embrión. En contraste, en gimnospermas, el cigoto en las primeras etapas se somete a dos rondas de duplicación celular sin citocinesis conformando una célula con cuatro núcleos. Estos núcleos, en fases posteriores, se mueven hacia la base del proembrión (arreglándose de forma simétrica, característica distintiva de Pinaceae) por medio de procesos morfogenéticos para conformar, en esta zona, la pared celular. Divisiones adicionales conformarán al proembrión que estará constituido por ocho células; el primer conjunto de cuatro células conformará al embrión propiamente y en el segundo estarán destinadas a la formación del suspensor tras un proceso de elongación y divisiones limitadas (Figura 2; Dogra, 1967).

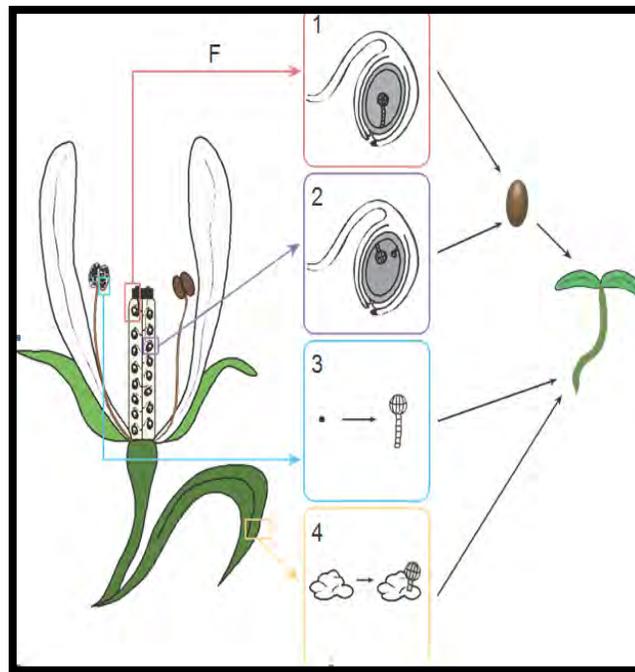


**Figura 2.** Representación esquemática de los eventos tempranos de embriogénesis en a) *Arabidopsis thaliana*, b) *Pinus taeda* y c) Tamaño relativo del embrión globular de *Arabidopsis* comparado con el embrión dominante de pino. Figura tomada de Cairney y Pullman, 2007.

### 1.3.1 Tipos de embriogénesis

En plantas se puede llevar a cabo la embriogénesis por vía asexual, es decir, sin necesidad de que exista la fertilización. Esto puede ocurrir de forma natural (apomixis), o bien puede inducirse a partir de un grano de polen, una célula somática o en un embrión en desarrollo. Todas estas vías alternas del desarrollo embrionario darán lugar a plantas con el mismo plan corporal (Peris *et al.* 2010). De manera interesante, únicamente en la embriogénesis por apomixis existe desarrollo de la semilla, esto puede estar relacionado con la capacidad que tiene

el gametofito femenino de estimular la formación del endospermo en ausencia de fertilización. Las especies apomíticas presentan mucha variación en el mecanismo de desarrollo que conduce a la producción de semilla: pueden llevar a cabo la formación del embrión de forma autónoma a través de la célula huevo o incluso puede evitarse la formación del gametofito femenino. Este mecanismo se ha descrito en más de cuarenta familias y cuatrocientos géneros; esto no ocurre en *Arabidopsis* pero sí en un género relacionado llamado *Boechera* (Drews y Koltunow, 2011).



**Figura 3.** Distintos procesos de embriogénesis en plantas. Los dos primeros ocurren normalmente en los tejidos reproductivos dentro de la flor. **3.1)** La embriogénesis cigótica ocurre cuando el grano de polen llega hasta el estigma del carpelo y una de las células espermáticas fertiliza a la ovocélula contenida dentro del saco embrionario. Las formas alternativas asexuales de desarrollo del embrión son: **3.2)** desarrollo de embriones por apomixis, **3.3)** androgénesis a partir de los granos de polen, y **3.4)** embriones somáticos. Únicamente la embriogénesis apomítica y cigótica dan lugar a la formación de la semilla (Figura

tomada de Peris *et al.* 2010).

Por otro lado, se ha visto que “*in vitro*” también se pueden desarrollar embriones a partir de los gametos masculinos (granos de polen; ver Figura 3.3), denominada androgénesis o bien a partir de células somáticas (Figura 3.4).

La androgénesis se lleva a cabo bajo condiciones de cultivo, realizándose una estimulación de la misma específicamente a partir de la primera mitosis o hasta la conformación bicelular del grano de polen, etapa potencialmente proliferativa en la cual aun no se han expresado todos los factores transcripcionales que definen al grano de polen maduro. Existen factores endógenos y exógenos que pueden comprometer la respuesta de inducción. Se consideran endógenos la etapa de desarrollo y el genotipo de la microspora, ya que variedades de una misma especie pueden tener diferente respuesta de inducción. Un ejemplo de factor exógeno que condiciona la inducción de la embriogénesis es el tipo de explante (tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento) , ya sea que se utilice la antera, creando un ambiente menos artificial para la microspora o bien esta pueda ser extraída y cultivada directamente en el medio (Segui-Simarro y Nuez, 2008).

Otro factor exógeno es el tipo de estrés al que se somete el medio de cultivo, estos son: frío, déficit de carbohidratos y la adición de colchicina. La temperatura interfiere con la síntesis de proteínas gametofíticas (gametophytic proteins), el frío disminuye la velocidad de los procesos fisiológicos, teniendo como resultado una carencia de nutrientes, el déficit de carbono se relaciona con cambios en la actividad de las proteínas tipo cinasas y la colchicina se une a los heterodímeros  $\alpha$  y  $\beta$  tubulinas, resultando en una despolimerización de los microtúbulos, provocando la migración del núcleo, cambio de polaridad que somete a la microspora a una división asimétrica, este cambio en la polaridad. Adicionalmente la alta concentración de heterodímeros  $\alpha$  y  $\beta$  tubulinas reprime la síntesis de estas

mismas, incluyendo la síntesis de tubulinas específicas de polen. La inducción de la embriogénesis a través de estos tipos de estrés evitan la progresión del desarrollo del polen, ya que de esta forma puede ser reprogramado su genoma convirtiendo a la microspora en una célula totipotencial a la cual es posible inducir la vía esporofítica (Shariatpanahi *et al.* 2006).

La embriogénesis somática es una vía importante para la regeneración de plantas y para el estudio del embrión fuera del ambiente materno. Existe una gran similitud morfológica y citológica entre los embriones de origen cigótico y somático ya que pasan por las mismas etapas de desarrollo. Lo anterior sugiere que se emplean los mismos mecanismos moleculares en ambos procesos de desarrollo. Este tipo de embriogénesis se induce principalmente por la aplicación exógena de auxinas, el tiempo de inducción depende del tipo de explante usado (Mordhorst *et al.* 1998); una vez alcanzada la inducción, el embrión comienza a sintetizar sus propias auxinas (Zimmerman, 1993).

Aun cuando la embriogénesis somática pasa por las mismas etapas de desarrollo que la cigótica, se han detectado algunas diferencias entre ambas. Por ejemplo, la inhibición del transporte de auxinas en embriones somáticos da como resultado el bloqueo de la embriogénesis, mientras que no se ve un efecto tan drástico en la embriogénesis cigótica. Otra diferencia que se ha observado a nivel molecular, es el cambio en la expresión temporal de *WUSCHEL (WUS)*, gen que se expresa en un grupo de células denominado centro organizador (Organizing Centre; OC) cuya función es mantener el estado indiferenciado de las células madre del meristemo apical. Se ha visto que este gen se expresa antes en la embriogénesis somática que en la cigótica, en la cigótica se expresa cuando el proembrión se encuentra conformando por dieciséis células, mientras que en la somática se observa anterior a la conformación del proembrión donde la concentración de auxina es alta, sugiriendo que el establecimiento de los gradientes de auxina correlacionan con la inducción de la expresión de WUS (Su y Zhang, 2009).

A pesar de las distintas formas de cómo puede llegar a conformarse un embrión en plantas, el plan corporal es siempre el mismo. Un eje apico – basal, que define

el meristemo apical (SAM; Shoot Apical Meristem) y radical (RAM; Root Apical Meristem); un eje radial conformado por diferentes tejidos, y uno o dos cotiledones (si son mono o dicotiledóneas, respectivamente) posicionados alrededor del SAM. Esto sugiere que existe una gran robustez y conservación de las señales que dan lugar al patrón morfogénico durante la embriogénesis en plantas.

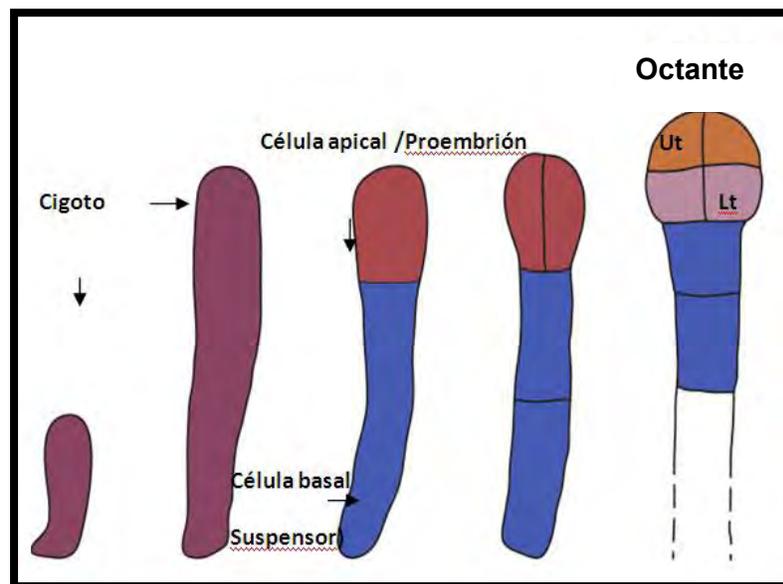
#### **1.4 Desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana***

El plan corporal básico que define a las plantas: dos meristemos unidos a través de un cilindro vascular, se establece embrionariamente. Previo a que el eje embrionario se defina, el cigoto pasa por un periodo de tiempo (horas o días) antes de que ocurra el primer plano de división, en el cual, ocurren cambios a nivel celular. En *Arabidopsis* la vacuola del cigoto se fragmenta después de la fertilización y se vuelve a reensamblar después de que ocurra el alargamiento del cigoto (Jeong *et al.* 2011). La comprensión de estos cambios a nivel celular, puede ayudar a determinar cuáles son algunos de los factores que guían la polaridad del cigoto y, por lo tanto, el establecimiento del plan corporal.

En algunas especies de plantas se ha dicho que la polarización del cigoto puede correlacionar con el arreglo polar de determinados organelos en la ovocélula, encontrándose el núcleo en dirección a la chalaza (apical) y una vacuola alargada localizada hacia el micrópilo (basal), organización que se mantiene después de la fertilización en *Nicotiana tabacum* más no en *Arabidopsis* (Lau *et al.* 2012). Por lo que se ha sugerido que la información materna podría estar jugando un papel muy importante en dicha polarización ya que el óvulo y el gametofito femenino son estructuras altamente polarizadas (Lersten, 2004). También se ha propuesto que el gradiente de auxinas podría estar participando en esta polaridad ya que la especificación de los diferentes tipos celulares correlaciona con la concentración de auxinas; a mayor concentración se determinan las sinérgidas y la célula huevo y a menor las antípodas (Pagnussat, *et al.* 2009).

La primera división en el cigoto es de tipo asimétrica, es decir, da como resultado dos células hijas diferentes en tamaño, morfología, destino de desarrollo y perfil de expresión. La célula apical es pequeña, con un denso citoplasma y conformará al embrión específicamente, mientras que la célula basal es más larga y vacuolada, siendo su destino celular la conformación de una capa extraembrionaria denominada suspensor, estructura filamentosa de la cual únicamente una célula se incorpora en la formación del embrión y que conecta al proembrión (denominación que se le da al embrión en las primeras etapas de desarrollo) con el tejido materno hacia el interior del lumen del óvulo (Peris *et al.* 2010).

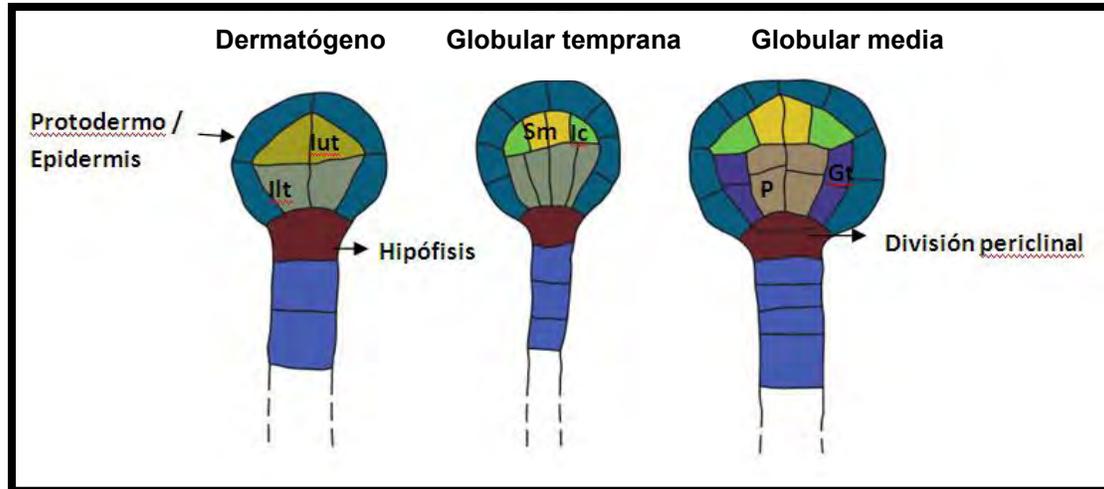
Las etapas tempranas del desarrollo embrionario de *Arabidopsis* son nombradas de acuerdo al número de células que constituyen al proembrión. Cuando está constituido por ocho células (octante) se definen dos zonas celulares que tendrán distinto destino de desarrollo: nivel superior (upper tier; ut) y nivel inferior (lower tier; lt; Figura 4). El primero conformará los cotiledones y el meristemo apical. El segundo definirá el hipocótilo y las células iniciales de córtex, endodermis, epidermis y cofia lateral (Scheres *et al.* 1994; Peris *et al.* 2010).



**Figura 4.** Primeras etapas del desarrollo embrionario desde el cigoto hasta la conformación del proembrión (octante) y del suspensor. Las abreviaturas indican: upper tier; **Ut** y lower tier; **Lt**. Figura tomada de Lau *et al.* 2012 .

Cuando el proembrión está constituido por dieciséis células (dermatógeno), se especificará el patrón radial en el momento en que la capa del protodermo (precursor de la epidermis) se establece. En ésta etapa se puede distinguir la hipófisis (Figura 5), célula superior del suspensor que resulta de divisiones periclinales en dicho filamento (Peris *et al.* 2010).

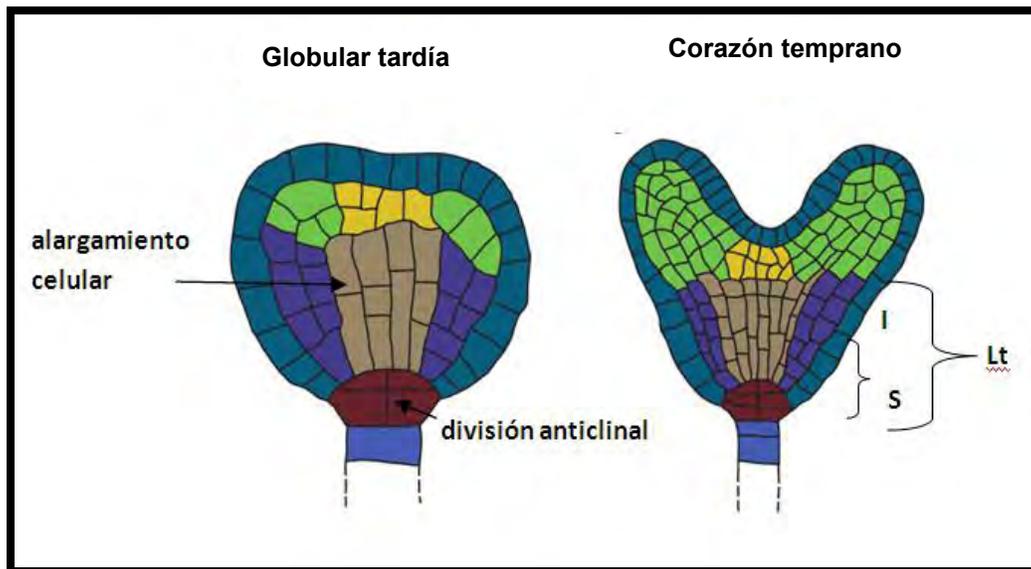
La siguiente etapa, denominada globular, se caracteriza por la especificación del meristemo apical y radical a partir de los cuales se dará origen a todas las células que conformaran el desarrollo post embrionario. Esta etapa puede dividirse en temprana, media y tardía (o de transición). En la etapa temprana (el embrión está constituido por 32 células), distinguiéndose las células que conformarán el meristemo apical y a los cotiledones. La etapa media globular (el embrión está constituido por 65 células aproximadamente) se caracteriza por la primera división de tipo periclinal de la hipófisis dando como resultado dos células hijas; la superior que dará origen al centro quiescente (CQ) y la inferior que dará lugar a las iniciales de columela (Figura 5). Además se distingue por el alargamiento de las células provasculares. El CQ es el organizador del nicho de células troncales de la raíz dando origen a todas las células post-embrionarias de este órgano y manteniendo a las iniciales en estado de indiferenciación (Peris *et al.* 2010; Ugartechea, 2007).



**Figura 5.** Desarrollo embrionario desde el octante hasta la etapa globular temprana. Las abreviaturas indican: Inner upper tier, **Iut** (nivel superior interno); lower tier, **Ilt** (nivel inferior interno); Shoot meristem, **Sm** (zona celular que dará origen al meristemo apical); Inner cotyledon, **Ic** (células que se alargarán contribuyendo a la especificación de los cotiledones); Ground tissue, **Gt** (tejido fundamental) y Provasculature, **P** (tejido vascular). Figura tomada de Lau *et al.* 2012).

En la etapa globular tardía ocurre la primera división anticlinal de las células derivadas de la hipófisis. La finalización de la etapa globular se distingue por la forma de corazón triangular que van adquiriendo gradualmente las ciento diez células (aproximadamente) que constituyen al proembrión (Ugartechea, 2007). Esta forma de corazón que se empieza a esbozar, se debe al crecimiento en dos zonas opuestas de la parte apical de éste, rompiendo con la simetría radial que caracteriza esta etapa. La siguiente denominada corazón temprano, el proembrión estará constituido por doscientas cincuenta células aproximadamente (Ugartechea, 2007); durante esta etapa la zona Lt se va a dividir por divisiones periclinales en dos zonas: superior e inferior. Las células de la zona superior se extienden dentro de lo que será el hombro abaxial del cotiledón en etapas posteriores. La zona inferior se distingue por el alargamiento de las células provasculares, por tener una capa de protodermo y por presentar divisiones

periclinales en el tejido fundamental. Durante esta etapa se lleva a cabo la segunda división anticlinal de las células derivadas de la hipófisis y se definen los principales órganos de la planta como son: los cotiledones, el hipocótilo y la raíz primaria, así como los tejidos celulares básicos; provascular, protodermis y córtex, los cuales, son anatómicamente distinguibles. Hacia el final de la etapa de corazón se siguen llevando a cabo divisiones periclinales tanto en el protodermo como en el procambium. La zona superior de la Lt, se subdivide aun más cuando las células inferiores del protodermo se convierten en células iniciales de la cofia lateral y se definen las células iniciales de córtex, periciclo y vasculares (Capron *et al.* 2009; Scheres *et al.* 1994 y Jurgens *et al.* 1994).



**Figura 6.** Desarrollo embrionario desde la etapa globular hasta la triangular. Los colores indican las zonas celulares especificadas en la figura seis. Las abreviaturas son: lower tier, **Lt** ; Inferior, **I** y Superior, **S**. Figura tomada de Lau *et al.* 2012.

En las etapas finales del desarrollo embrionario denominadas torpedo y cotiledón - doblado, ya se distinguen perfectamente el meristemo apical, el tejido provascular que se encuentra dentro de los cotiledones y se completa la organización celular que caracteriza al hipocótilo y a la raíz. En la última etapa

(cotiledón – doblado), la complejidad del patrón tisular es básicamente la misma que se presenta en la plántula (Jurgens, *et al.* 1994).

## **1.5 Conformación de la semilla en Angiospermas**

El desarrollo de la semilla en las angiospermas comienza con la doble fertilización que ocurre dentro del óvulo. Como ya se dijo anteriormente esta consiste en la fusión de cada uno de los gametos masculinos con la célula central y la ovocélula en el saco embrionario, conformándose dos productos cigóticos: el embrión (diploide) y el endospermo (triploide). Posteriormente ocurren procesos de diferenciación celular que incluyen la formación del endospermo, del embrión y de la testa. Al finalizar las etapas del desarrollo embrionario sigue una fase de maduración que incluye la acumulación de compuestos de reserva, tolerancia a la desecación e inhibición del crecimiento para poder entrar en un periodo de latencia de tiempo variable que se rompe con la germinación (Goldberg *et al.* 1994; Vicente-Carbajosa *et al.* 2005).

La interacción entre el endospermo, el embrión y el tejido materno es uno de los aspectos más complejos del desarrollo de la semilla. La función primaria del endospermo es la de proveer de nutrientes al embrión en desarrollo (Vijayraghavan y Prabhakar, 1984 en Lersten, 2004). Dependiendo de la especie o familia, el endospermo puede permanecer o no hasta la etapa de madurez. Por ejemplo, en algunas especies de monocotiledóneas como el maíz y el trigo, el endospermo persiste hasta la madurez de la semilla, siendo atribuible el tamaño de la semilla al crecimiento del mismo. En eudicotiledóneas, como el chícharo y el frijol, el endospermo es transitorio y remplazado por el crecimiento del embrión, de ahí que el tamaño de la semilla correlacione con el tamaño del embrión. En *Arabidopsis*, el tamaño y peso de la semilla se atribuye a la proliferación del embrión, ya que únicamente está constituida por una capa celular de endospermo. En la mayoría de la especies el desarrollo del embrión y el endospermo ocurren de forma simultánea, aunque en algunos casos, la proliferación del endospermo comienza antes de que el cigoto se divida (Schruff

*et al.* 2006).

Posterior a la fusión del gameto masculino con la célula central se conforma la célula primaria endospermática (Primary Endosperm Cell; PEC). Dependiendo del patrón de celularización, se reconocen tres modos principales de desarrollo temprano del endospermo: nuclear, celular y helobial. La primera es el patrón más común de desarrollo en cereales (maíz, cebada, arroz y *Arabidopsis*) y consiste en divisiones mitóticas sin citocinesis generándose una gran cantidad de núcleos libres organizados en la periferia de la célula central. En la celular, la mitosis y la citocinesis ocurren después de la primera división del núcleo de la PEC, patrón reportado en especies del género *Lycopersicon* y distintos miembros de las familias Crasulaceae, Bignoniaceae y Labiatae. La última es muy poco frecuente, la primera división de la PEC origina dos células distintas en tamaño, la célula más grande se divide como el patrón de celularización nuclear, mientras que la célula más chica puede dividirse o no (Lopes y Larkins, 1993).

## **1.6 Factores de transcripción y sus implicaciones en la Biología del desarrollo**

Los diferentes tipos celulares que constituyen a un organismo son resultado de una expresión genética diferencial, es decir, la especificidad de las células que constituyen un tejido es el resultado de la función de determinados RNAs y proteínas como resultado principalmente de la expresión diferencial de genes gracias a la regulación mediada por factores de transcripción.

Un factor de transcripción es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del DNA, ya que le señala a la RNA polimerasa el lugar donde debe comenzar la síntesis de RNA. En eucariontes, la regulación de la transcripción está mediada por dos clases de factores de transcripción: los Factores Transcripcionales Generales (General Transcription Factors; GTFs), los cuales únicamente reconocen a la región promotora que se encuentra cerca del sitio de iniciación de la transcripción y junto con la RNA polimerasa conforman el complejo

de pre – iniciación (PIC) de la transcripción (Müller, 2001). La otra clase de factores son aquellos que se unen a secuencias específicas de DNA río arriba del sitio de la transcripción, estos, típicamente poseen un dominio de unión a DNA y una región de trans – activación separada (Müller, 2001). Ambos tipos de factores entran en contacto con la RNA polimerasa, ya sea de manera directa o a través de mediadores, en un complejo de iniciación. El conocimiento a detalle de esta interacción es un requisito crítico para entender los mecanismos que subyacen la regulación transcripcional (Müller, 2001).

Las familias de factores transcripcionales son clasificados por su dominio de unión a DNA, un ejemplo son los genes MADS box, los cuales codifican factores transcripcionales que se caracterizan por presentar un dominio de unión a DNA conocido como caja CArG (Riechmann y Meyerowitz, 1997).

### **1.7 Factores transcripcionales tipo MADS – box**

Los genes MADS–box codifican factores transcripcionales presentes en todos los eucariontes encontrándose mayoritariamente representados en las angiospermas. En *Arabidopsis* se conocen alrededor de 107 genes, mientras que en animales existen únicamente dos en *Drosophila melanogaster* y cinco en humanos. Estos factores de transcripción participan en múltiples procesos de proliferación y diferenciación celular tanto en plantas como en animales (Gramzow, *et al.* 2010; Martínez-Castilla y Álvarez- Buylla, 2003). El nombre de genes MADS, deriva de las iniciales de los primeros genes de este tipo que fueron clonados: **MCM1** de *Saccharomyces cerevisiae*, **AGAMOUS** de *Arabidopsis thaliana*, **DEFICIENS** de *Antirrhinum majus* y **SRF** de mamíferos (Schwarz-Sommer *et al.* 1990).

En plantas estos genes se dividen en Tipo I y Tipo II, a continuación se presenta una tabla de las diferencias entre ambos (Gramzow *et al.* 2010).

**Tabla 1.** Características de los genes MADS-box Tipo I y Tipo II.

<b>Característica</b>	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>
<b>Número de exones</b>	De 1 a 2	Un promedio de 7
<b>Tasa evolutiva</b>	Rápida	No tan rápida
<b>Clasificación a nivel de dominios proteicos</b>	<b>M<math>\alpha</math>, M<math>\beta</math> y M<math>\gamma</math></b> : basado en los motivos conservados del carboxilo terminal	<b>MIKC<sup>c</sup> y MIKC*</b> : basado en diferencias estructurales en el dominio K y en el número de exones que codifican el dominio I

\*Elaboración propia (fuente Gramzow, *et al.* 2010)

Los primeros genes MADS-box caracterizados en plantas fueron aquellos involucrados en el desarrollo de los distintos órganos florales. Usando *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* como modelos de estudio, se caracterizaron plantas que presentaban flores con mutaciones homeóticas. Se integró la información de estas mutantes en un modelo de desarrollo floral denominado ABC, el cual, está muy conservado en angiospermas y puede explicar gran parte de los fenotipos florales observados. Se clonaron, en la década de los noventas, los cinco genes responsables de estos fenotipos y se vió que cuatro de ellos pertenecen a la familia MADS-box de Tipo II y el otro codifica para una proteína de la familia de factores transcripcionales tipo AP2 (Coen y Meyerowitz, 1991).

Los genes MADS-box tipo II participan en casi cualquier aspecto del desarrollo de las plantas y codifican para proteínas con una organización estructural muy conservada (MIKC) que solo se encuentra en plantas. El dominio MADS (M) de unión a DNA, el dominio Intermediario (I) que participa tanto en la especificidad de unión a DNA como en las interacciones entre proteínas, seguido del dominio K conformado por tres alfa hélices (K1, K2 y K3) y que está involucrado en interacciones proteína-proteína y, finalmente, el dominio Carboxilo terminal (C)

que está involucrado en la trans-activación y en reforzar o estabilizar las interacciones mediadas por el dominio K. El dominio I y el dominio C son los menos conservados entre los MADS-box tipo II (Ng y Yanofsky, 2001). Como dije anteriormente, los factores de transcripción MADS-box se unen a la región en el DNA con secuencia consenso de  $CC(AT)_6GG$  de sus genes blancos conocida como caja CArG (Gramow y Theissen 2010).

La importancia de analizar la lógica de regulación transcripcional de los genes MADS-box, no sirve únicamente para la comprensión de procesos de proliferación y diferenciación que subyacen el desarrollo de las plantas, sino también en animales. Por ejemplo el desarrollo de enfermedades en humanos como el cáncer, patología que involucra desajustes en la proliferación celular. Ejemplo de ello es el gen MADS- box *SRF* (Serum Response Factor), el cual se ha asociado con un incremento de tamaño en el tumor del carcinoma papilar de la tiroides. *SRF* se sabe juega papel importante en distintos procesos celulares tales como la regulación del ciclo celular, apoptosis, crecimiento y de diferenciación celular. De ahí que las plantas representen una alternativa para realizar estudios *in vivo* de proliferación y diferenciación de esta familia de genes (Kim *et al.* 2009).

### **1.7.1 Familia de genes MADS-box en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana***

Estudios genéticos han revelado la participación de los genes MADS-box Tipo I, en el desarrollo del gametofito femenino y de la semilla. Por ejemplo, la proteína  $M\gamma$ , AGL80 y la  $M\alpha$ , DIANA (DIA, AGL61) forman un dímero protéico, que está involucrado en controlar la diferenciación en la célula central. AGL80 también se expresa durante el desarrollo del endospermo y AGL62 (proteína codificada por el parólogo de DIA) suprime de manera prematura la celularización del endospermo. Análisis de patrones de expresión con GFP ( Green Fluorescent Protein) y GUS ( $\beta$ -clucuronidase) reportan que de los 58 genes Tipo I analizados, únicamente 38

reportan señal durante el desarrollo del gametofito femenino y la semilla (Smaczniak, *et al.* 2012).

De los genes Tipo II, algunos de los MIKC\* controlan el desarrollo de gametofito masculino (polen). Y de los MIKC<sup>c</sup>, *AGAMOUS LIKE- 15 (AGL15)*, se expresa de forma preferencial durante el desarrollo embrionario (Heck *et al.*1995; Rounsley, *et al.* 1995). La proteína AGL15 se ha detectado en el núcleo de las células embrionarias en las etapas tempranas del desarrollo embrionario (octante, en *Arabidopsis*); mientras que el gen se expresa en niveles relativamente altos durante la morfogénesis y hasta la etapa de maduración (Perry *et al.* 1996 b). Esta acumulación del mensajero, se ha observado en tejidos en desarrollo de distinto origen (apomítico o somático), sugiriendo que *AGL15* puede ser un gen importante para esta fase del ciclo de vida. Post embrionariamente *AGL15*, se expresa en el SAM y en la base de los órganos laterales como son: las hojas de roseta y caulinares, así como en los órganos florales. Sin embargo, su nivel de expresión en estos tejidos es de al menos diez veces menor con respecto al reportado para el embrión (Perry *et al.* 1999 a).

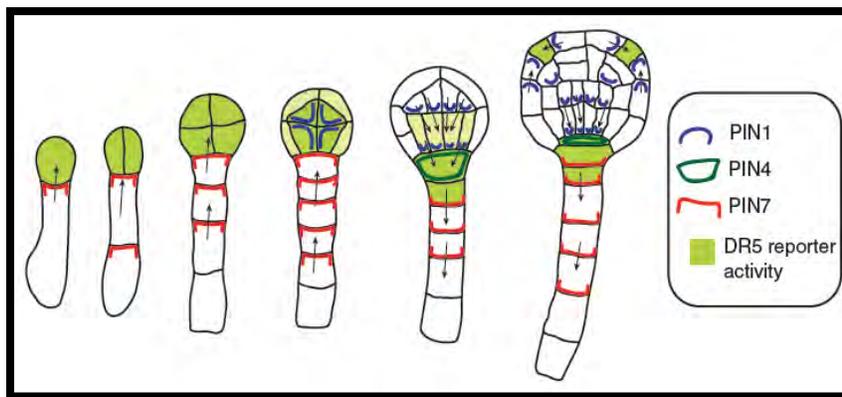
Además de *AGL15* se sabe, por ensayos de hibridaciones “*in situ*”, que *AGAMOUS LIKE-21 (AGL21)*, *AGAMOUS LIKE-12/XANTAL1 (AGL12/XAL1)* y *SEPALLATA 1 (SEP1)* se expresan también durante el desarrollo embrionario (Burgeff *et al.* 2002) . Por otro lado, se han hecho análisis masivos de expresión, de genes a partir de tejido embrionario en cultivo (Embryonic Culture Tissue; E.C.T), para evitar la presencia de mRNAs procedentes de otros tejidos. En los análisis de expresión en ECT, los AGLs (AGAMOUS LIKE) que presentaron una expresión significativa fueron: *AGL53 (Mβ)*, *AGL93 (Mβ)*, *AGL67 (MIKC\*)*, *AGL70/MAF3 (MIKC<sup>c</sup>)*, *FLC (MIKC<sup>c</sup>)* y *AGL15 (MIKC<sup>c</sup>)* (Lehti-Shiu *et al.* 2005).

## **1.8 Transporte de auxinas durante el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana***

El desarrollo embrionario, requiere de la coordinación en tiempo y espacio, de factores transcripcionales con morfogenos (hormonas) como las auxinas, fitohormonas encargadas de regular procesos de proliferación y diferenciación celular, ramificaciones de la parte aérea y radicular, así como de dar respuesta a diferentes tipos de tropismos tales como la luz y la gravedad (Peer *et al.* 2011). Las auxinas se sintetizan principalmente en el meristemo aéreo, el radicular (principalmente en el CQ) y en las hojas jóvenes. Se distribuyen en la planta a través de dos tipos de transporte, pasivo y activo. El transporte pasivo se da principalmente de la parte aérea a la raíz e involucra el movimiento de auxinas a través de largas distancias a través del floema. El transporte activo se da en distancias cortas y requiere de la intervención de acarreadores tanto de influjo: *AUXIN RESISTANT1* y *LIKE AUX1* (*AUX1* y *LAX*) como de eflujo: ATP Binding Cassete subfamily B (*ABCB*) y los *PINFORMED* (*PIN*) ( Peer *et al.*2011); estos últimos encargados del establecimiento del flujo de auxinas en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Friml *et al.* 2003 ).

Entre los principales acarreadores de eflujo importantes para el desarrollo embrionario, se encuentran: *PIN7*, uno de los primeros en expresarse en la célula basal después de la primera división del cigoto y sus descendientes (las que conformaran el suspensor); *PIN1*, encargado de promover el transporte de auxinas hacia la hipófisis, expresándose en la membrana basal de las células provasculares del proembrión (células centrales de la lower tier) y *PIN4* que se expresa en la hipófisis (ver Figura 7 Peris *et al.* 2010 ; Lau *et al.* 2012 ). Otro transportador que se expresa durante el desarrollo embrionario es *PIN3* localizandose en la células precursoras de la columela (Friml *et al.* 2003 ).

Las mutantes de estos transportadores de auxina presentan fenotipos durante el desarrollo embrionario. *pin7* presenta defectos en la especificación de la célula apical, ocasionalmente falla en el establecimiento del proembrión completamente, conformándose una estructura filamentosa. Desarreglos que se corrigen en la etapa globular del desarrollo embrionario. A pesar, de los fuertes defectos presentados en el desarrollo embrionario, estos son corregidos produciéndose plántulas fértiles, lo cual, habla de la redundancia funcional entre dichos transportadores. La mutante doble, *pin4 pin7* presenta defectos en la parte apical, que persisten en la plántula, como un número extra de cotiledones. La mutante triple, *pin1 pin3 pin4* muestra defectos que incluyen cotiledones fusionados y una raíz muy corta. Mientras que la mutante cuádruple *pin1 pin3 pin4 pin7* exhibe defectos muy pronunciados en el establecimiento del proembrión, conformándose un embrión filamentoso con múltiples capas, defectos que no se corrigen en la etapa globular. El fenotipo terminal de esta cuádruple mutante es variable, defectos que dependen del ecotipo ya que puede actuar como una mutación letal o bien germinar plántulas con defectos severos en el meristemo apical y radical (Friml *et al.* 2003).



**Figura 7.** Transporte de auxinas a través de PIN1, PIN7 y PIN4 y respuesta de DR5-GFP a auxinas en *Arabidopsis thaliana* en las primeras etapas de desarrollo. Figura tomada de Peris *et al.* 2010.

### **1.8.1 Factores de transcripción en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana***

La primera división del cigoto da como resultado dos células con diferente perfil de desarrollo, “¿cómo es que dicho destino de desarrollo es establecido y mantenido? Proceso muy poco entendido, ya que no es claro cómo es que algunos determinantes del desarrollo segregan durante la división del cigoto, tal es el caso de los genes pertenecientes a la familia *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN*. Tres miembros de esta familia están involucrados en especificar el patrón de formación durante el desarrollo embrionario: *WOX2* y *WOX8* son coexpresados en el cigoto después de la primera división, *WOX2* es específico de la célula apical mientras que *WOX8* junto con *WOX9* se encuentran en la célula basal (Peris *et al.* 2010). Una revisión reciente del desarrollo embrionario reporta que el factor transcripcional WRKY DNA-BINDING PROTEIN 2 (*WRKY2*) activa a *WOX8* y posiblemente a *WOX9* (Lau *et al.* 2012). En cuanto al fenotipo observado en las mutantes de estos genes, se sabe que en la mutante sencilla de *WOX2* (*wox2*) se presentan divisiones anormales en el ápice del proembrión en la etapa globular. Más aún, se ha comprobado la importancia de *WOX2* durante el desarrollo del patrón apical del embrión, al comparar los fenotipos de triples y cuádruples mutantes con y sin *WOX2*. Otro aspecto importante por mencionar de esta familia, es que la expresión génica de los genes *PIN* en el proembrión es promovida por *WOX8* y *WOX9* (Jeong *et al.* 2011).

El establecimiento del eje apico–basal se lleva a cabo en la etapa globular , debido a la acción de dos clases de factores transcripcionales considerados como “reguladores maestros”: la familia de genes *PLETHORA (PLT)* que codifican proteínas con dominio AP2 y aquellos que tienen un homeodominio de clase III zipper de leucinas ( Jeong *et al.* 2011).

Los genes *PLT* se expresan en la etapa globular temprana y más tarde en el precursor del tejido vascular en el centro del proembrión, así como en el incipiente CQ (Aida *et al.* 2004). Mutantes sencillos de estos genes no presentan un fenotipo tan drástico, únicamente cuando se pierden dos ó más genes de esta familia se tienen defectos serios como; plántulas sin raíz y letalidad embrionaria (Galinha *et al.* 2007). Por otro lado, los genes que pertenecen a la familia HD – ZIP III, se expresan en el límite del ápice en la etapa globular temprana así como en la porción adaxial del cotiledón. Más tarde se observa su expresión en el tejido provascular y los transcritos son excluidos del CQ y de las células que conformarán la raíz. En mutantes múltiples de pérdida de función de estos genes, se afecta el patrón de desarrollo embrionario y las plántulas carecen de meristemo apical y tienen una vasculatura central reducida (Prigge *et al.* 2005). Aunque los mecanismos de este efecto antagónico entre *PLT* y *HD-ZIP III* están por determinarse, estas observaciones sugieren que la expresión de los genes de estas dos familias de factores transcripcionales, participan en el establecimiento del destino celular del meristemo apical y radicular en la etapa globular (Jeong *et al.* 2011).

### **1.9 Cómo detectar posibles alteraciones en el desarrollo embrionario a través del fenotipo**

Una forma de poder determinar si un gen afecta el desarrollo de los gametofitos ó los embriones a través del fenotipo, es mediante el conteo de semillas en desarrollo por silicua. Un menor número de semillas en desarrollo puede indicar anormalidades en el proceso de fertilización, o bien, anormalidades durante el desarrollo embrionario. Otro fenotipo que puede indicar alteraciones en el desarrollo embrionario, es la diferencia en color de las semillas en desarrollo, esto relacionado con retraso y / ó desfaseamiento en alguna etapa posterior a la fertilización (semillas retrasadas). Las semillas en desarrollo que contienen embriones arrestados antes de la etapa de corazón son típicamente blancos

mientras que aquellos que pudieron llegar a la etapa de transición de los cotiledones son de color verde pálido (Muralla, *et al.* 2011).

En *Arabidopsis* se tiene reportado el análisis del fenotipo de seis mutantes que alteran el desarrollo del gametofito femenino (Brukhin *et al.* 2011), siendo la mutante *didilia* (At2g011110) la que presentó un alto porcentaje de semillas abortadas: 25%, en comparación con otras mutantes que tienen los siguientes valores: *yarilo* 3% (At2g34680), *amon* 5% (At4g02700) y *apis* 8% (At5g44520). *didilia* no solo tiene un alto porcentaje de semillas abortadas sino que presenta un 5 % de óvulos no fertilizados mientras que un 70% tuvieron un desarrollo normal. Observaciones citológicas de esta mutante revelaron que los óvulos no fertilizados se encontraban bloqueados en la etapa de madurez del saco embrionario (FG7), mientras que las demás semillas abortadas eran embriones bloqueados en la etapa de corazón tardía, (Brukhin *et al.* 2011).

Un ejemplo de alteraciones en el desarrollo del gametofito masculino, es la mutante de pérdida de función *sec22-2*. *SEC22* (At1g11890) es un gen que codifica para una proteína perteneciente a la familia SNARE, encargada de la unión vesícula / membrana. La mutante *sec22-2* tiene un menor número de semillas desarrolladas y está afectado el desarrollo del polen antes y durante la transición de la etapa bicelular a la tritelular (El-Kasmi *et al.* 2011).

Respecto al desarrollo embrionario, se tiene reportado que en plantas heterocigotas para el gen *CAC1A* (At5g16390) un 18.5% de semillas son abortadas durante el desarrollo embrionario, mientras que en la planta silvestre únicamente son abortadas el 2.1% del total de semillas (Li *et al.* 2011). Este gen está involucrado en síntesis de ácidos grasos y se ha visto su expresión en las siguientes etapas del desarrollo embrionario: globular, corazón, torpedo y de madurez (The Arabidopsis Information Resource;TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>).

## 2. Antecedentes y Justificación

En el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución (GeMoDEvo) del Instituto de Ecología, utilizamos a *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio para comprender los mecanismos que subyacen el mantenimiento y establecimiento del nicho de células troncales en el meristemo apical y radical. Específicamente, estamos interesados en conocer la participación que tienen los genes MADS-box tipo II en dichos procesos y cómo es que se acopla la activación de estos genes a morfógenos (hormonas).

En este laboratorio trabajamos con cuatro genes MADS-box tipo II que participan en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*: *AGL12* (*XAL1*); *XANTAL* término maya que significa “*ir lento*” (Tapia- Lopez *et al.* 2008), *AGL14*, *AGL19* y *AGL17*. Los dos primeros genes se han caracterizado como promotores del crecimiento ya que sus mutantes de pérdida de función tienen raíces más cortas que la planta silvestre, *AGL17* como represor del crecimiento por el fenotipo de raíz larga que presentan sus mutantes. *AGL9* se considera como promotor del crecimiento (datos por corroborar). Profundizando en la función de estos genes, sabemos que *AGL14* y *AGL19* alteran el flujo de auxinas en la raíz regulando la expresión post embrionaria de sus transportadores (datos no publicados Garay – Arroyo, A. 2012 y Jaimes,F. 2009).

Datos de nuestro laboratorio indican que *AGL14* regula directamente la expresión de *PIN1* y *PIN4* a través de dos cajas CArG en *PIN1*, una en la región promotora y otra en el segundo intrón y una en la región promotora de *PIN4*. El fenotipo de la mutante de pérdida de función de *pin4*, es similar a *agl14-2*: desorganización en el nicho de células madre, capas adicionales de columela, expresión expandida de los marcadores del CQ, y alteración en los gradientes de auxina (datos no publicados Garay-Arroyo *et al.*, A. 2012). Finalmente, existen datos preliminares que sugieren que *PLT1* es regulado por *AGL14* (datos no publicados Gámez, A. 2011).

Por otro lado, también se sabe que *AGL19* tiene un tamaño de semilla más grande que la planta silvestre, fenotipo que sugiere alteraciones en la homeostasis celular durante el desarrollo embrionario. Asimismo, *AGL19* regula a *PIN2* y a *PIN3* post-embrionariamente (datos no publicados Jaimes,F 2009). Además de presentar desfaseamiento en la tasa de germinación(datos no publicados Jaimes,F y Chávez,R. 2009; ver **Apéndice C, Tasa de germinación**).

Debido a que *AGL14* y *AGL19* alteran la expresión de los transportadores de auxinas (posembrionariamente) algunos de los cuales son importantes en la distribución diferencial de auxinas durante el establecimiento de la polaridad del embrión, suponemos que los mutantes de pérdida de función de *AGL14* y *AGL19* tendrán un papel importante durante el desarrollo embrionario. Además, el fenotipo de semilla grande en *AGL19* puede relacionarse con alteraciones en la homeostasis celular (proliferación celular y expansión celular) durante el desarrollo embrionario.

### **3. Hipótesis**

Las mutantes de pérdida de función de *AGL14* y *AGL19* presentan alteraciones durante el desarrollo embrionario.

## **4. Objetivos**

### **4.1 General**

Caracterizar la participación de los genes MADS-box tipo II *AGL14* y *AGL19* en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana*.

#### **4.1.1 Objetivos Particulares**

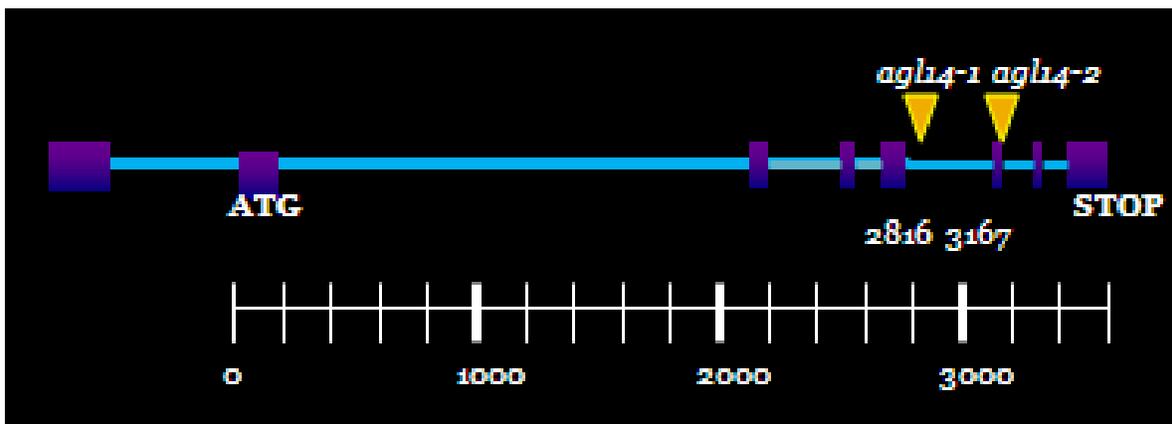
- Caracterizar dos parámetros indicadores de alteraciones en el desarrollo embrionario: número de semillas desarrolladas y tamaño de la semilla en *agl14-2*, *agl19-3* y *agl14-2 agl19-3*.

- Caracterizar el fenotipo del tamaño de la semilla, haciendo mediciones de en la radícula, las cuales permitan descartar defectos de proliferación o expansión celular. Únicamente en aquellos fondos genéticos que hayan tenido un fenotipo evidente en los parámetros anteriormente mencionados.
- Realizar análisis citológicos de la radícula del embrión maduro y de las primeras etapas de desarrollo embrionario. Únicamente en aquellos fondos genéticos que hayan tenido un fenotipo evidente en los parámetros anteriormente mencionados.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Material biológico utilizado

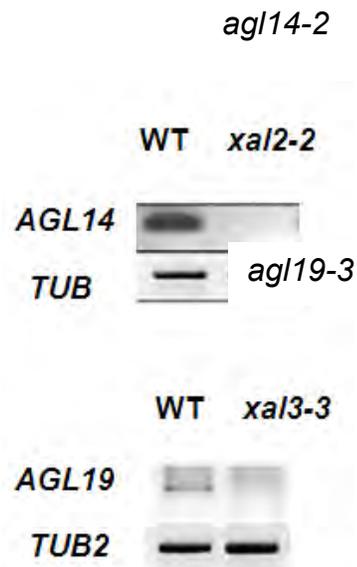
Las plantas utilizadas en este trabajo son de la especie *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col0). Se utilizó la mutante *agl14-2* que tiene una inserción del transposón En1 (Figura 7) y la mutante *agl19-3* con una inserción de T-DNA (SALK \_000324; Figura 8). La doble mutante homocigota se generó en el laboratorio (Pacheco-Escobedo, M. 2012). Análisis de RT – PCR semicuantitativa indican que *agl14-2* es de expresión nula (Garay-Arroyo, 2012) al igual que *agl19-3* (Cruz, D. 2010) (Figura 9). Se genotipificaron cada una de las mutantes realizando extracciones de ADN nuclear y amplificaciones de los genes por PCR. (ver Apéndice A, Extracción de ADN nuclear y Genotipificación).



**Figura 7.** Inserción por transposón en *AGL14* (comunicación personal Gámez, A. 2011).



**Figura 8.** Inserción por T-DNA en *AGL19* (*agl19-1* y *agl19-2* Schönrock *et al.* 2006).



**Figura 9.** RT-PCR semicuantitativa en *agl14-2* (Garay-Arroyo, 2012) y *agl19-3* (Cruz, D. 2010).

## 5.2 Plantas y condiciones de crecimiento

Previo a sembrar las semillas se esterilizaron de acuerdo al siguiente protocolo: se colocan las semillas en un tubo eppendorf de 1.5 ml en etanol al 100% por 5 minutos en agitación, posteriormente se agrega una solución de SDS al 1% y NaClO al 5%, se agitan de nuevo por 13 minutos. Finalmente las semillas son sometidas a cuatro lavados con agua, posteriormente se dejan en agua estéril a 4°C por 72 horas, de esta manera se sincroniza el metabolismo y germinación de las semillas (estratificación).

Posterior a la estratificación y esterilización se siembran las semillas en cajas Petri cuadradas con medio MS (Murashige y Skoog 1962, Sigma Aldrich) 0.2 x, 1% de sacarosa y 1% de agar con un pH de 5.6. Las cajas petri se colocan de manera vertical en el cuarto de crecimiento y cuando la raíces alcanzan más de la mitad de la caja Petri (a los siete días post siembra), se trasplantan a tierra estéril (Tierra Metro – Mix 200, previamente esterilizada por 20 minutos a 120 °C) en macetas colocadas dentro de una charola, la cual permanece tapada con una cubierta de plástico por cinco días (de esta forma se conserva húmeda la tierra y disminuye el estrés ocasionado por el trasplante). La temperatura a la cual germinaron y crecieron las plantas fue de 22°C, con luz blanca – fría a una intensidad de luz de 110  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  aproximadamente. Con un fotoperiodo de día largo (LD, 16 h luz / 8 h luz).

### **5.3 Número de semillas en desarrollo, silicuas desarrolladas correctamente y abortadas**

El número de semillas en desarrollo, abortadas y retrasadas (semilla que presenta diferencias en color, ver sección 1.9) se determinó en la silicua cinco y ocho de arriba hacia abajo en el tallo principal. Para ello se cortaron las silicuas y se colocaron sobre cinta adhesiva en una caja petri de plástico. La silicua se abre deslizando una jeringa de insulina en la zona media de la silicua bajo el microscopio estereoscópico. Las cuantificaciones anteriores, así como las de silicuas abortadas y desarrolladas correctamente, se realizaron cuando el tallo principal tenía entre catorce y diecisiete silicuas, de esta forma se asegura que están representadas todas las etapas de desarrollo.

### **5.4 Determinación del tamaño de la semilla**

El tamaño de las semillas de las líneas que se usaron en este trabajo, se determino escaneándolas siguiendo el protocolo reportado por Herridge y colaboradores (2011) (ver **Apéndice A, Escaneo de las semillas**). Únicamente

en aquel fondo que tuvo un tamaño de semilla significativamente diferente respecto a WT se realizaron mediciones a lo largo y ancho de la radícula, así como del largo y ancho de la primeras diez células del córtex. Además de contabilizarse el número de células de la cofia lateral (ver **Apéndice A, Mediciones en la radícula**).

## **5.5 Análisis citológicos de embriones maduros e inmaduros**

Los análisis citológicos de los embriones maduros e inmaduros se realizaron siguiendo el protocolo de tinción reportado por Ugartechea y colaboradores (2010), posteriormente se observaron al confocal. Los embriones maduros, son aquellos que se obtienen directamente de la semilla madura, mientras que los inmaduros provienen de la semilla en desarrollo (ver **Apéndice A, Tinción de embriones**).

## **5.6 Análisis Estadísticos**

Los análisis estadísticos que incluyen la prueba de t se realizaron en Excel 2007, mientras que los de ANOVA y  $X^2$  en Minitab 15 (2007) con una p de 0.05 (**Apéndice B, Estadística**).

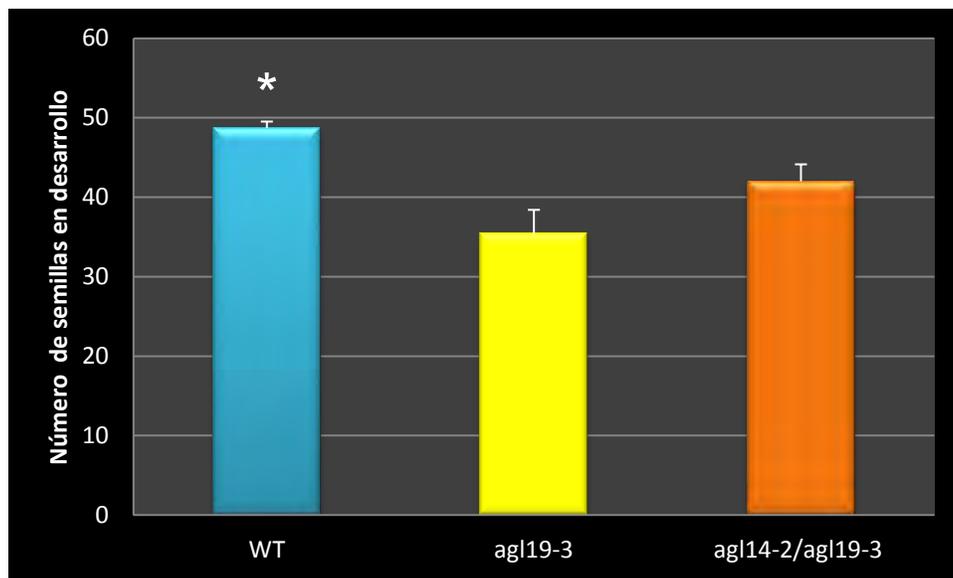
## **6. Resultados**

Para poder documentar si las mutantes de los genes MADS-box tipo II: *agl14-2*, *agl9-3* y la doble mutante *agl14-2/agl19-3* presentan desarreglos durante el desarrollo embrionario se determinó: 1) el número de semillas desarrolladas por silicua y el 2) el tamaño de la semilla. A partir de estos resultados se decidió el fondo genético apto para realizar análisis citológicos de la radícula del embrión maduro, así como de las primeras etapas del desarrollo embrionario.

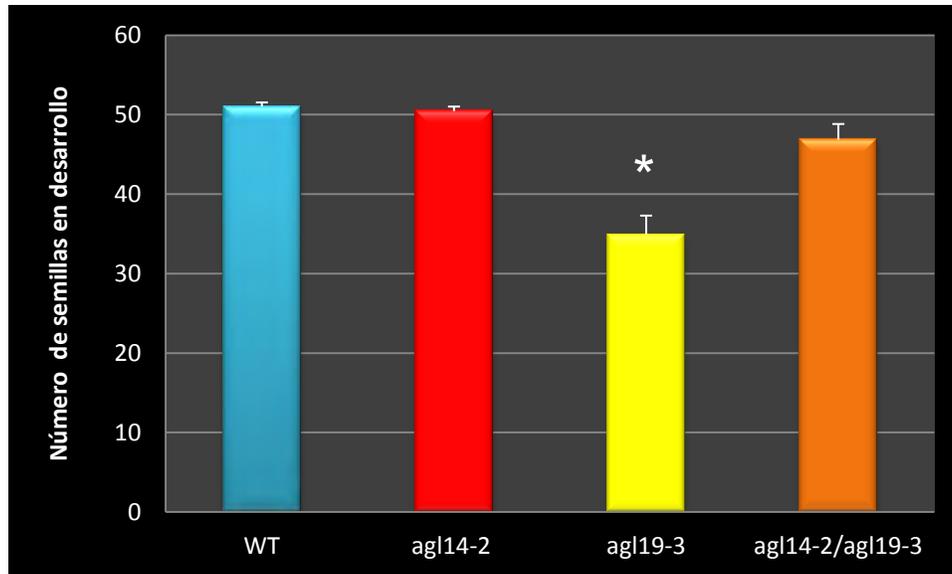
### **6.1 Existe un menor número de semillas en desarrollo en etapas tempranas del desarrollo embrionario en *agl19-3***

Se contabilizó el número de semillas en desarrollo en las silicua cinco y ocho, esto permite distinguir entre abortos debidos a variaciones ambientales o a lesiones en genes importantes para las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Se

graficó el número de semillas en desarrollo en los siguientes fondos genéticos: Col-0 (tipo silvestre), *agl14-2*, *agl19-3* y *agl14-2/agl19-3* en las dos silicuas. La mutante *agl19-3* fue la línea que mostró un fenotipo más drástico al presentar un menor número de semillas en desarrollo en ambas silicuas (Figuras 10 y 11) con diferencias significativas entre cada uno de los fondos genéticos (ANOVA  $p < 0.05$ ). Las pruebas post hoc (Tukey 95 %), en la silicua cinco (Figura 10) indicaron que existen diferencias entre cada una de las mutantes (*agl19-3*- y *agl14-2/ agl19-3*) y WT, pero no entre ambas. En la silicua cinco no se cuentan con datos para *agl14-2*, debido a cuestiones metodológicas. Estas mismas pruebas, mostraron que en la silicua ocho, *agl19-3* tiene un promedio de semillas desarrolladas estadísticamente diferente con respecto a las demás mutantes y a la planta silvestre (Figura 11, ver **Apéndice B, Estadística**).



**Figura 10. Número de semillas en desarrollo en la silicua cinco en los tres fondos genéticos:** WT ( $n=43$ ,  $\bar{X}= 48.7 \pm 0.82$ ), *agl19-3* ( $n=20$ ,  $\bar{X}= 35.35 \pm 3.06$ ) y *agl14-2 / agl19-3* ( $n=18$ ,  $\bar{X}=42 \pm 2.14$ ), ANOVA,  $p < 0.05$ . Las barras indican error estándar y el asterisco (\*) diferencias significativas.



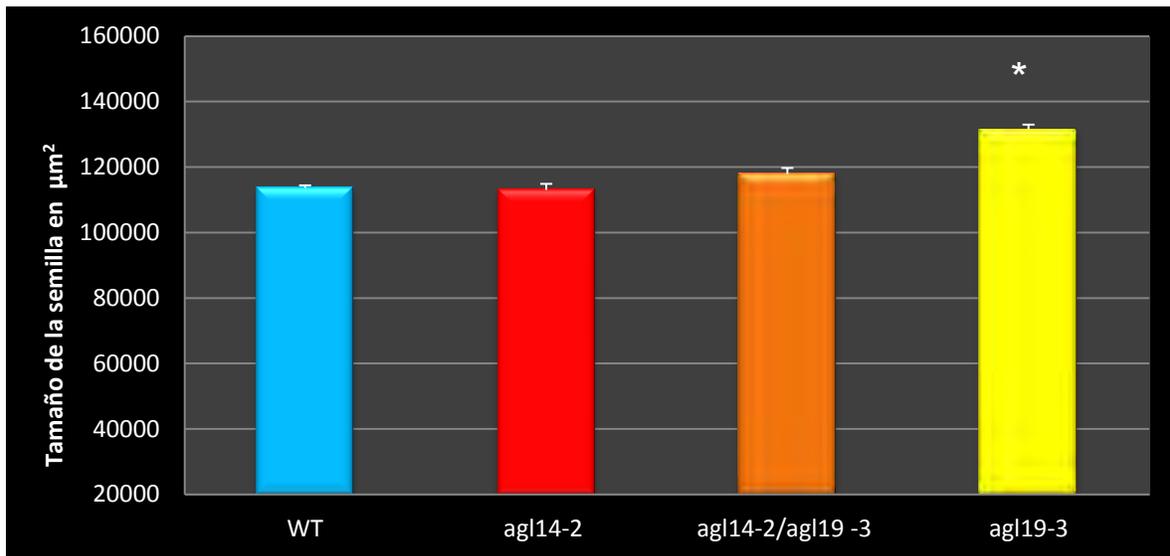
**Figura 11. Número de semillas en desarrollo en la silicua ocho en los cuatro fondos genéticos:** WT ( $n=65$ ,  $\bar{X} = 51.03 \pm 0.52$ ), *agl14-2* ( $n=13$ ,  $\bar{X} = 50.46 \pm 0.57$ ), *agl19-3* ( $n=21$ ,  $\bar{X} = 34.9 \pm 2.41$ ) y *agl14-2 / agl19-3* ( $n=22$ ,  $\bar{X} = 46.86 \pm 1.98$ ), ANOVA,  $p < 0.05$ . Las barras indican error estándar y el asterisco (\*) diferencias significativas.

El fenotipo menor número de semillas en desarrollo en *agl19-3*, puede relacionarse con alteraciones en el desarrollo del gametofito femenino y/o masculino, los que involucra defectos en el proceso de fertilización o bloqueo del desarrollo embrionario. Para poder especificar qué proceso de desarrollo podría estar siendo alterado, puede realizarse un análisis genético, esto es, cruza de plantas silvestres con cada una de las mutantes, permitiendo descartar defectos de origen parental o bien realizando un análisis citológico del desarrollo de los gametofitos. Como el objetivo de esta tesis es detectar alteraciones en el desarrollo embrionario se midió el tamaño de la semilla parámetro que permite detectar alteraciones en el desarrollo, a nivel de proliferación o expansión celular. En plantas dicotiledóneas el tamaño de la semilla refleja el tamaño final del embrión (Schruff *et al.* 2006).

## 6.2 AGL19 regula procesos de homeostasis celular durante el desarrollo embrionario

Se midió utilizando un scanner el tamaño de la semilla. Metodología altamente sensible que permite medir muchas semillas al mismo tiempo y capaz de detectar diferencias mínimas en el tamaño de la semilla (Herridge *et al.* 2011; ver metodología sección 5.4).

Los resultados confirman diferencias significativas en el tamaño de la semilla en los diferentes fondos (ANOVA  $p < 0.05$  (Figura 11)). La prueba post hoc ANOVA (Tukey 95 %) indicó que *agl19-3* tiene un promedio estadísticamente diferente con respecto a los demás fondos genéticos (ver **Apéndice B, Estadística**). Los datos anteriores comprueban el efecto epistático de *AGL14* sobre *AGL19* en cuanto al tamaño de la semilla (Figura 12) y al número de semillas en desarrollo (Figuras 10 y 11).



**Figura 12. Tamaño de la semilla en  $\mu\text{m}^2$  en los cuatro fondos genético:** WT (n=1143,  $\bar{X} = 113,583.91 \pm 815.44$ , cinco repeticiones biológicas), *agl14-2* (n=239,  $\bar{X} = 112,999 \pm 1862.44$ , dos repeticiones biológicas), *agl14-2/ agl19-3* (n=277,  $\bar{X} = 117,829.93 \pm 1881.61$ , tres repeticiones biológicas) y *agl19-3* (n=475,  $\bar{X} = 131,493.17 \pm 1457.26$ , dos repeticiones biológicas). ANOVA  $p < 0.05$ . Las barras indican error estándar, y el asterisco (\*) diferencias significativas.

En las siguientes secciones, estaremos usando únicamente la línea *agl19-3*, debido a que fue la única mutante que presentó diferencias significativas tanto en el número de óvulos desarrollados como en el tamaño de la semilla respecto a la planta silvestre.

### **6.3 El meristemo apical de la radícula se establece adecuadamente en *agl19-3***

Para poder detectar desarreglos durante el desarrollo embrionario, es necesario, realizar un análisis celular de las diferentes etapas de desarrollo embrionario, ya sea a través del aclareo (Soong *et al.* 2008) o tinción de las células embrionarias (Ugartechea *et al.*, 2010). La técnica de aclaramiento permite analizar una gran cantidad de embriones, los cuales pueden ser analizados con óptica Nomarsky a diferencia de los que son teñidos con la técnica de Schiff's, esta requiere el uso de la microscopía confocal, metodología costosa pero que permite un mejor detalle celular. Por lo anterior es que se decidió caracterizar únicamente la radícula en embriones maduros.

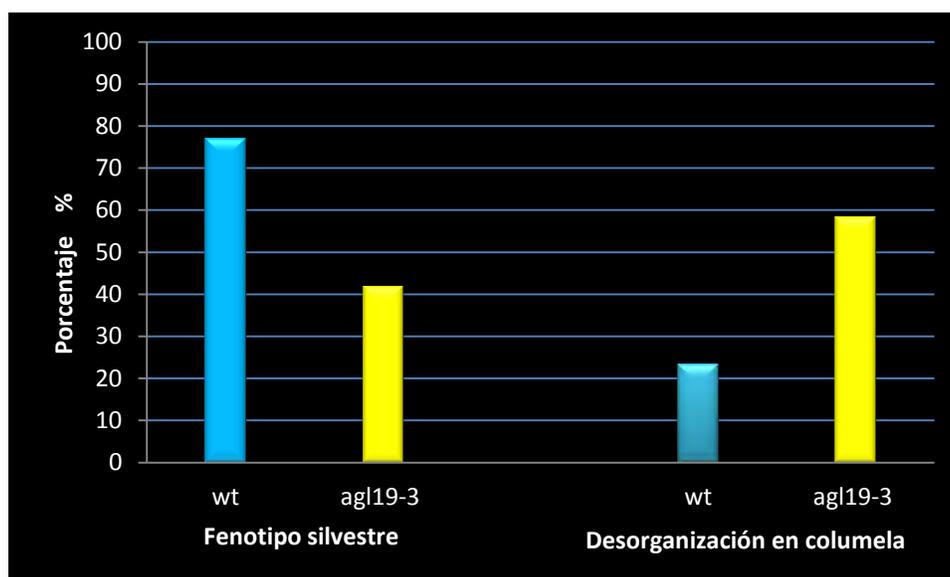
El promeristemo de raíz en el embrión maduro (ver **Apéndice A, Tinción de embriones maduros e inmaduros**) de una planta silvestre, se caracteriza por presentar un arreglo estereotípico (Scheres *et al.* 1994) de cuatro por cuatro filas de células de columela, siendo las cuatro primeras células de la fila horizontal las iniciales de columela. Adyacentes a éstas, se encuentran las iniciales de epidermis y cofia lateral. En la parte superior de las iniciales de columela se localizan las células del centro quiescente y contiguas las iniciales de córtex y endodermis (Figura 13 a). Sin embargo, pueden presentarse variaciones de esta organización estereotípica (Ugartechea *et al.* 2010) es por ello que se decidió ver la frecuencia de aparición de estos desarreglos tanto en plantas mutantes *agl19-3* como en plantas silvestres.

Como se puede ver en la Tabla 2 y la Figura 13, los fenotipos observados se dividieron por categorías de la siguiente manera: a) organización estereotípica (cuatro por cuatro filas de columela Figura 13 a- b); b) organización en tres filas

de columela (Figura 13 c–d) ; c) desorganización en columela, se pierde la organización de cuatro por cuatro filas de columela y se presentan divisiones ectópicas (Figuras 13 e–f) y c) divisiones ectópicas en columela en al menos una célula sin que se pierda el arreglo celular característico de cuatro por cuatro filas de columela (Figura 13 g).

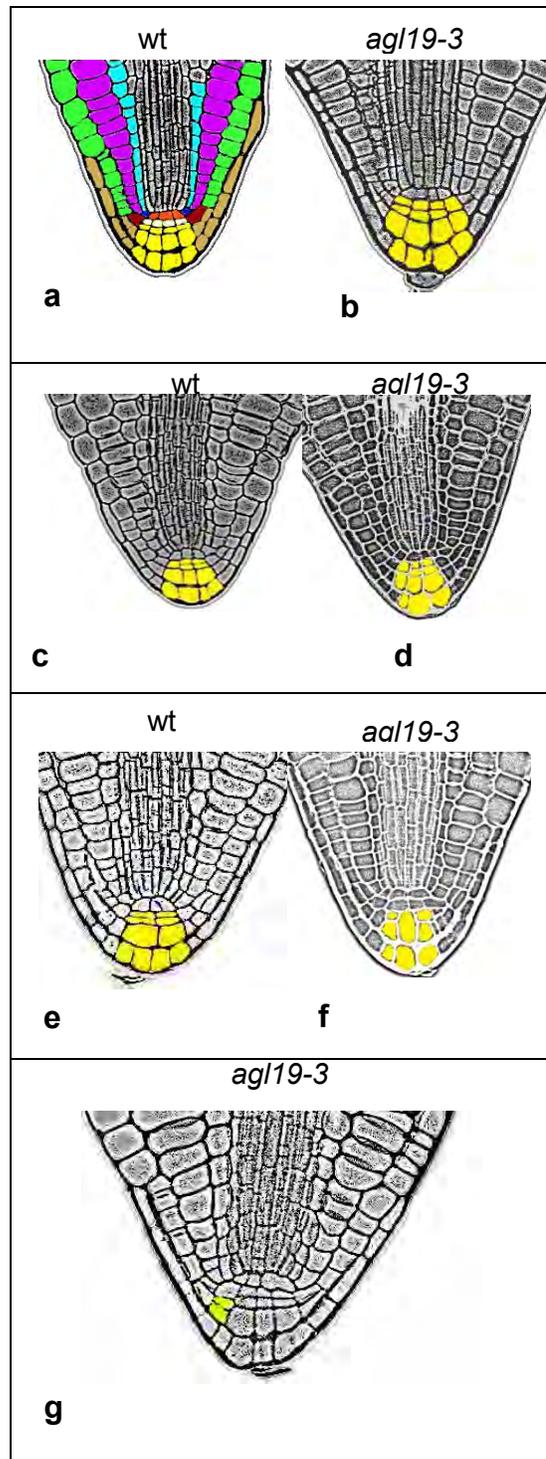
**Tabla 2.** Porcentaje de embriones con variaciones en la organización celular de la radícula en WT (n = 13) y *xa13-1* (n = 24);  $\chi^2$ , p > 0.05).

	Fenotipo silvestre	Organización en tres filas de columela	Desorganización en columela	Divisiones ectópicas	Total
WT	76.92%(10)	7.69 % (1)	15.38% (2)	0	100 % ( 13)
<i>xa13-1</i>	41.67%(10)	12.5 % (3)	33.33% (8)	12.5 %(3)	100 % ( 24)



**Figura 13.** Porcentaje de embriones con variaciones en la organización celular de la radícula en: WT (n = 13) y *agl19-3* (n = 24).  $\chi^2$ , p > 0.05. Desorganización en columela implica: organización en tres filas, se pierde la organización filas y divisiones ectópicas (ver Tabla2 y Figura 14).

De este análisis celular, se puede concluir que el meristemo de la radícula en *agl19-3* se establece a pesar de presentar variaciones, no detectándose diferencias significativas, resultado que puede deberse a la n utilizada en cada uno de los fondos. Cabe mencionar que para dicho análisis celular únicamente se tomaron en cuenta aquellas imágenes que estuvieron orientadas correctamente al microscopio confocal (plano medio longitudinal).



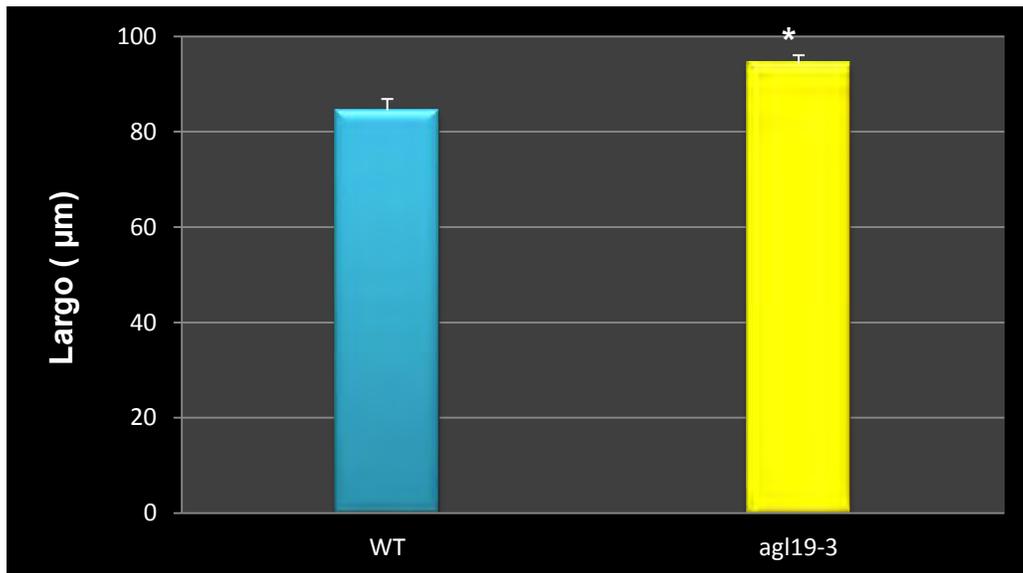
**Figura 14. Organización celular de la radícula en los fondos WT y *agl19-3*:** **a-b)** organización celular estereotípica; **c-d)** tres filas de columela; **e-f)** desorganización celular evidente en columela y **g)** división ectópica en al menos una célula de columela. Los colores indican: anaranjado, centro quiescente; azul, iniciales de córtex y endodermis; azul claro, endodermis; morado, córtex; café,

célula inicial de cofia lateral y epidermis; verde, epidermis; café claro, cofia lateral; blanco, iniciales de columela, amarillo, columela. La parte central no coloreada corresponde a la estela. .

#### 6.4 La falta de *AGL19* no afecta la proliferación y expansión celular en la radícula

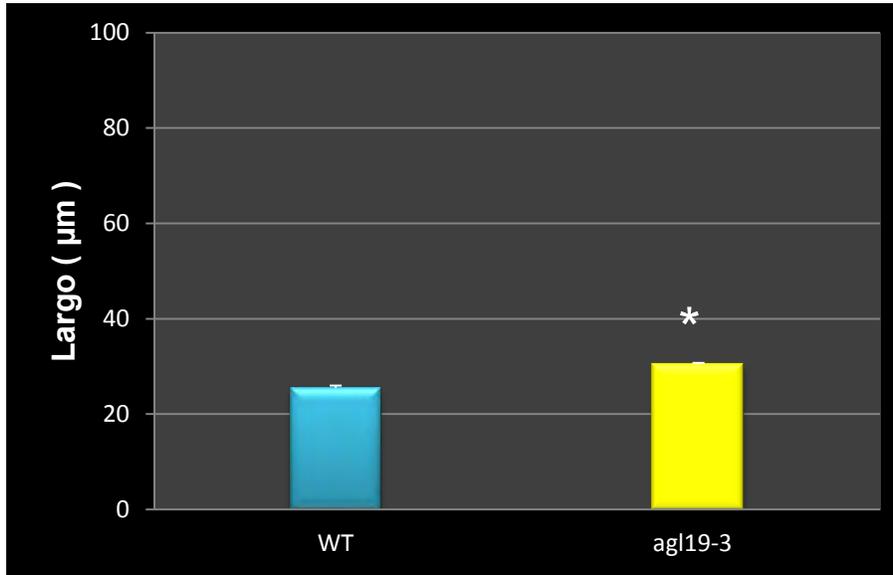
Para poder discernir qué proceso de desarrollo podría estar siendo alterado durante el desarrollo embrionario en *agl19-3* (proliferación o expansión celular), se realizaron mediciones a lo largo y ancho de la radícula (ver **Apéndice A, Mediciones de la radícula**), así como del largo y ancho de la primeras diez células del córtex. . Además de contabilizarse el número de células de la cofia lateral. Estos datos fueron obtenidos en colaboración con la Dra. Yamel Urgartechea.

Las mediciones realizadas permitieron determinar que la radícula de *agl19-3* es más larga (prueba de t con una  $p < 0.05$ ; Figura 14 y 15) con respecto a la planta silvestre pero no más ancha a la altura de la columela (prueba de t con una  $p > 0.05$ ; Figura 16).

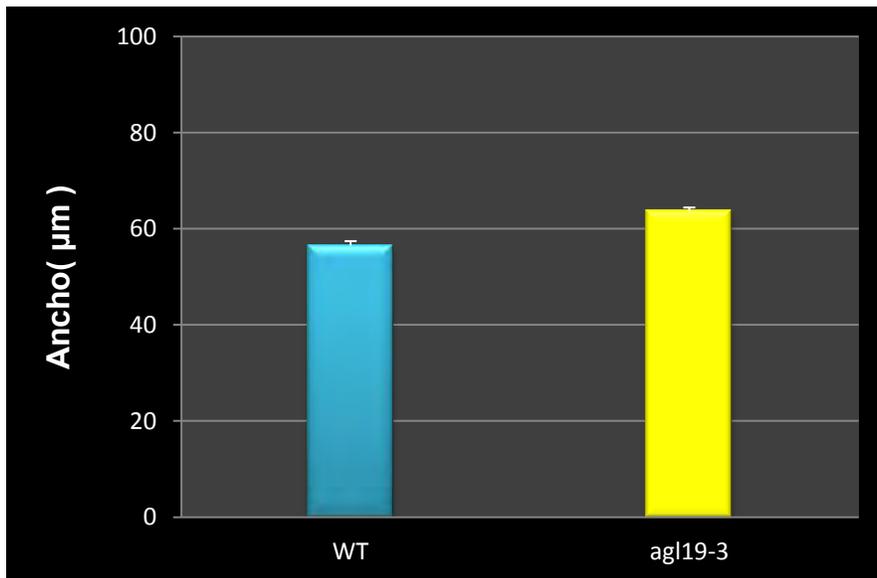


**Figura 15. Largo (µm) de la cofia lateral izquierda y derecha en el embrión maduro en: WT (n=14,  $\bar{X}$  = 84.42 ± 2.42) y *agl19-3* (n=19,  $\bar{X}$  = 94.32 ± 1.7), prueba**

de t  $p < 0.05$ . Las barras indican error estándar y el asterisco (\*) diferencias significativas.



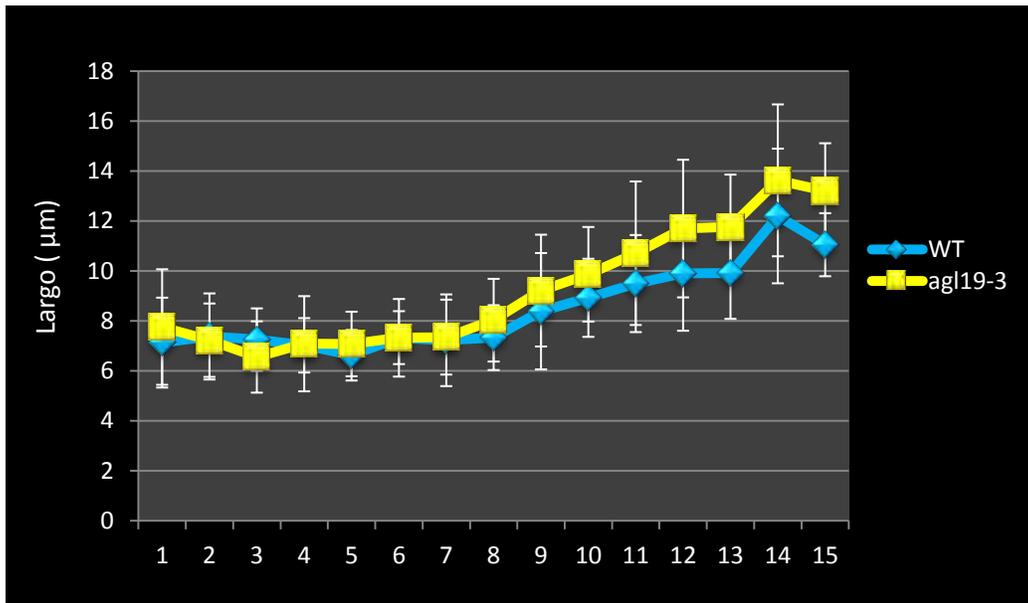
**Figura 16. Largo (µm) de las células de la columela en el embrión maduro:** WT (n=14,  $\bar{X} = 25.46 \pm 0.51$ ) y *agl19-3* (n=24,  $\bar{X} = 30.37 \pm 0.36$ ), prueba de t,  $p < 0.05$ . Las barras indican error estándar y el asterisco (\*) diferencias significativas.



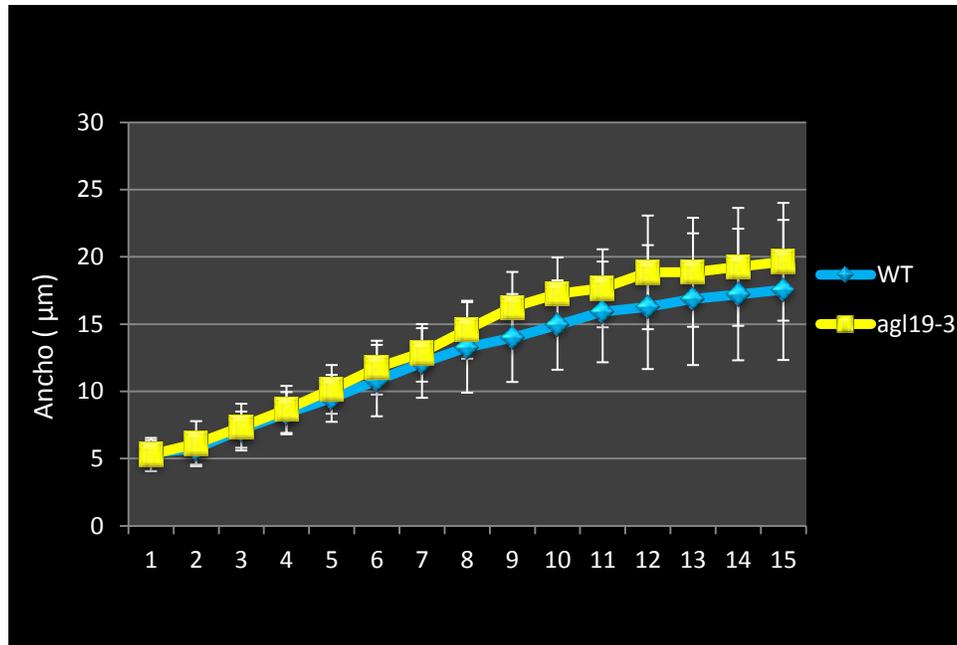
**Figura 17. Ancho (µm) de la parte baja del RAM, incluye el ancho máximo de la columela más la cofia lateral en el embrión maduro:** WT (n=14,  $\bar{X} = 56.48 \pm$

0.96) y *agl19-3* (n= 19,  $\bar{X}$  =63.66 ± 0.78), prueba de t  $p > 0.05$ . Las barras indican error estándar.

La radícula es más larga en *agl19-3* con respecto a la planta silvestre. Para poder determinar si este fenotipo correlaciona con alteraciones en la proliferación o expansión celular, se midió el largo y ancho de las primeras diez células de córtex. Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas en el largo y ancho de las células entre WT y *agl19-3* (prueba de t,  $p > 0.05$ ; Figuras 17 y 18). Esto sugiere que el largo de la radícula no se debe a alteraciones en la expansión celular en *agl19-3*, sino más bien podría estar correlacionado con la proliferación celular.

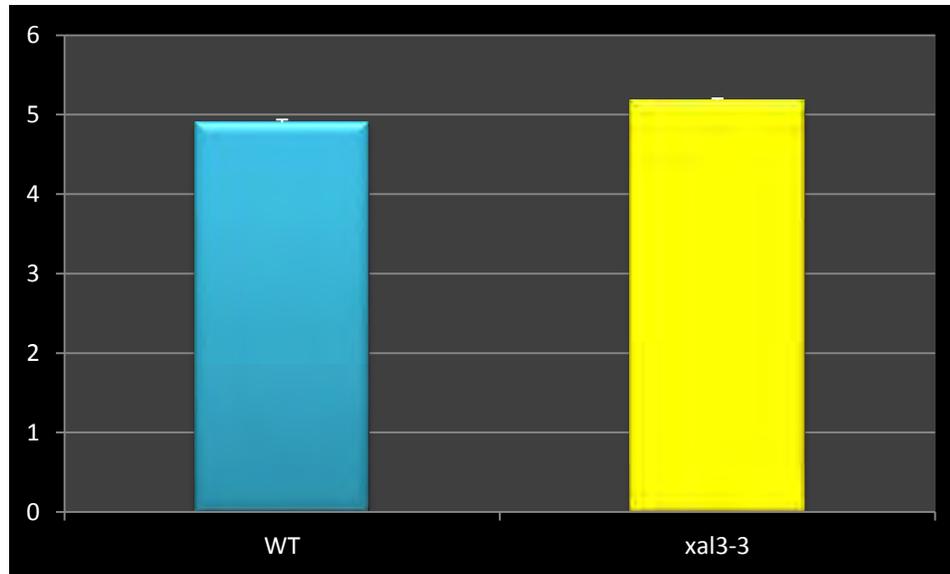


**Figura 18. Largo ( $\mu\text{m}$ ) de las primeras diez células de córtex en el embrión maduro: WT ( $\bar{X}$  =7.78 ± 0.47) y *agl19-3* ( $\bar{X}$  =8.87 ± 0.67); prueba de t,  $p > 0.05$ . El número de radículas analizadas en cada posición fue de 12 para WT y 21 para *agl19-3*. Checar gráfica y ano pienso.**



**Figura 19. Ancho ( $\mu\text{m}$ ) de las primeras diez células de córtex en el embrión maduro: WT ( $n=10$ ,  $\bar{X} = 13.38 \pm 1.61$ ) y *agl19-3* ( $n=10$ ,  $\bar{X} = 13.45 \pm 1.43$ ); prueba de t,  $p > 0.05$ . El número de radículas analizadas en cada posición fue de  $n=12$  para WT y  $n=21$  para *agl19-3*.**

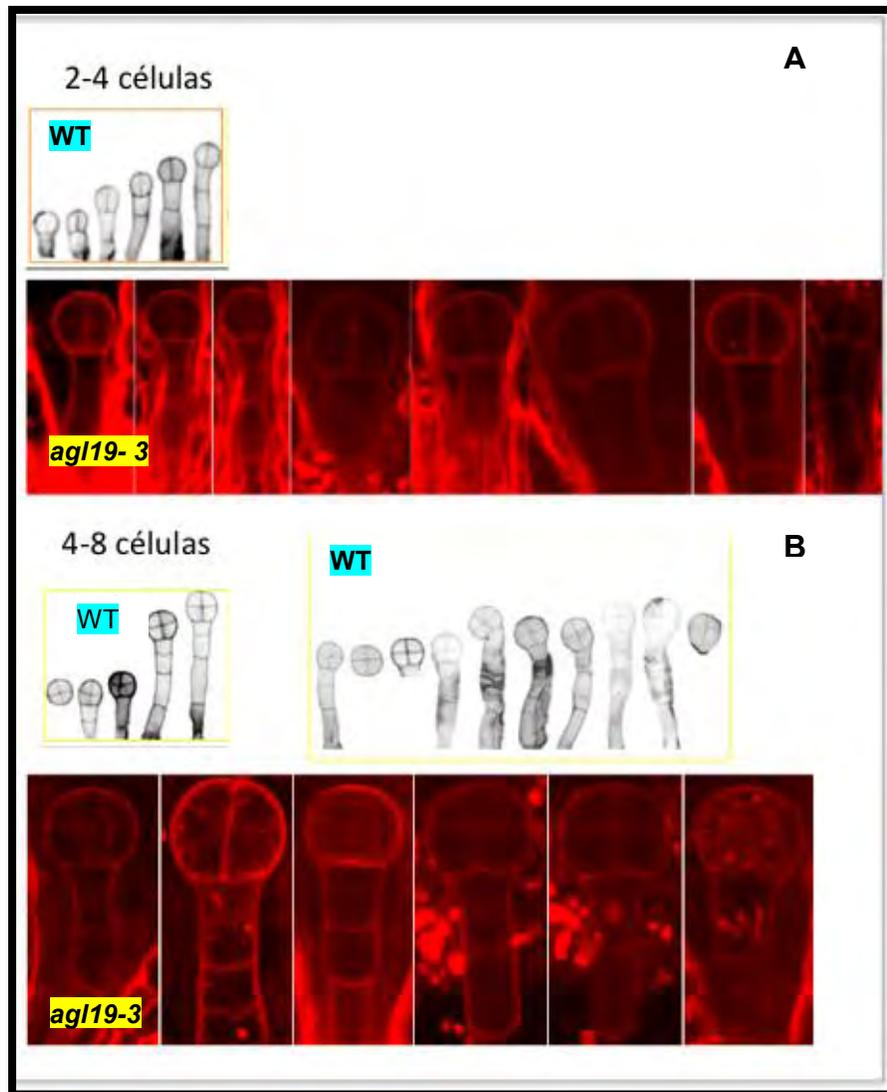
Los resultados del largo y ancho de las células sugieren que los procesos de expansión celular no están siendo alterados, de ahí que se decidiera realizar una medición del número de células a lo largo de la cofia lateral (Figura 19), esto con el objetivo de poder detectar alteraciones a nivel proliferación celular. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el número de células de la cofia lateral derecha e izquierda entre WT y *agl19-3* (prueba de t,  $p > 0.05$ ).



**Figura 20. Número de células en la cofia lateral izquierda y derecha del embrión maduro en: WT (n=14,  $\bar{X} = 4.9 \pm 0.04$ ) y *xal3-1* (n= 24,  $\bar{X} = 5.18 \pm 0.03$ ), prueba de t,  $p > 0.05$ . Las barras indican error estándar.**

### **6.5 El tercer plano de división está afectado en *ag/19-3***

Para poder detectar alteraciones en los planos de división durante el desarrollo embrionario, se caracterizaron las primeras etapas del desarrollo. En la Figura 20 se muestran alteraciones en el tercer plano de división en *ag/19-3*, mientras que en los dos primeros no se encontraron alteraciones. Aunque estos resultados son preliminares y necesitan ser apoyados por una n más grande (Tabla 3).



**Figura 21. Embriones de las primeras etapas de desarrollo en los fondos WT y *agl19-3*. A) Primeros dos ciclos mitóticos B) Tercer ciclo mitótico. Obsérvese números intermedios de células en *agl19-3*.**

**Tabla 3.** Número de embriones analizados en las primeras etapas de desarrollo

Etapa de desarrollo	Número de embriones que presentaron desarreglos	Número de embriones analizados
Dos a cuatro células	0	7
Cuatro a ocho células	8 (80 %)	10

### **6.6 Las diferencias en color en las semillas en desarrollo en *agl19-3* no explican el fenotipo menor número de semillas en desarrollo**

Para detectar si el desarrollo embrionario se arresta en *agl19-3*, se hizo un análisis de las diferencias en el color en las semillas en desarrollo en la silicua ocho (Tabla 4). En una planta silvestre, las semillas en desarrollo encontradas en silicuas de esta etapa, se observan de tonalidades verdosas por el desarrollo de los cotiledones. Las diferencias en color indican retraso o bloqueo del desarrollo embrionario. De tal forma que si se observa una semilla en desarrollo transparente en la silicua ocho o verde pálido (en comparación con los demás), se estaría hablando de una semilla retrasada o bloqueada en su desarrollo (Muralla, *et al.* 2011).

**Tabla 4.** Porcentaje de semillas retrasadas y semillas en desarrollo en la silicua ocho, en los fondos WT (n = 49), *agl19-3* (n = 17) y *agl12-2 agl19 - 3* (n = 18).

Genotipo	Semillas retrasadas	Semillas desarrolladas	Total
WT	1 (0.04 %)	2488 (99.96 %)	2489
<i>agl19-3</i>	4 (0.69 %)	575 (99.31 %)	579
<i>agl12-2 agl19-3</i>	2 (0.23 %)	855 (99.77 %)	857

\*Para este análisis no se cuenta con información para *agl14-2*, debido a cuestiones metodológicas.

## 6.7 AGL19 podría estar participando en el desarrollo del fruto (silicua)

Otro fenotipo observado y cuantificado que resultó significativamente diferente para la mutante *agl19-3* ( $X^2$  p < 0.05) fueron las proporciones de silicuas abortadas y desarrolladas correctamente ( $X^2$  p > 0.05 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentaje de silicuas abortadas y desarrolladas normalmente en los fondos WT (n = 33), *agl19-3* (n = 10) y *agl12-2 agl19 -3* (n = 25) ( $X^2$ , p < 0.05).

Genotipo	Silicuas abortadas	Silicuas desarrolladas normalmente	Total
WT	29 (5.74 %)	476 (94.26 %)	505
<i>agl19-3</i>	51 (34.69 %)	96 (65.31 %)	147
<i>agl14-2 agl19-3</i>	15 (4.03 %)	357 (95.97 %)	372

\*Para este análisis no se cuenta con información para *agl14-2*, debido a cuestiones metodológicas.

## 7. Discusión

Los factores transcripcionales MADS-box tipo II participan en diversos procesos de desarrollo. A pesar de ello, su participación en el desarrollo embrionario ha sido muy poco estudiada, comparado con lo que se sabe en otros procesos biológicos (Smaczniak, *et al.* 2012). El objetivo de esta tesis era determinar si además de *AGL15* (Harding *et al.* 2003), existen otros genes MADS- box tipo II que tengan una participación importante en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis*. Específicamente *AGL14* y *AGL19*, los cuales, se expresan fuertemente en raíz. *AGL14* regula positivamente a *PLT1* (datos no publicados Gámez, A. 2011) y a dos transportadores de auxinas *PIN1* y *PIN4* en la raíz (datos no publicados Garay-Arroyo, A. 2012), involucrados en especificar el flujo de auxinas durante el desarrollo embrionario (Peris *et al.* 2010; Lau *et al.* 2012). Por otro lado, *AGL19* regula positivamente a *PIN2* y negativamente a *PIN3* (datos no publicados Jaimes, F. 2009).

De acuerdo a geneinvestigator ([www.geneinvestigator.com/gv/](http://www.geneinvestigator.com/gv/)) y a un análisis global de factores transcripcionales durante el desarrollo de la semilla basados en datos microarreglos (Le, *et al.*, 2010). *AGL14* y *AGL19* no se expresan en el desarrollo embrionario. A pesar de ello se decidió investigar la participación de estos genes ya que análisis de RT- PCR en ECT si detectan la expresión de *AGL4* y *AGL19* (Lehti-Shiu, *et al.* 2005). Además tanto geneinvestigator como los análisis realizados por Le *et al* (2010) se basan en microarreglos, técnica que hasta la fecha ha implicado el uso de chips con una cobertura de genoma limitada (<30%), con RNA aislado de semillas enteras (Casson *et al.* 2005). Ejemplo de ello es que los análisis de Le *et al* (2010) no detectaron el mRNA de *AGL15*, siendo que la proteína de este gen ha sido identificada en el núcleo de las células embrionarias en etapas tempranas del desarrollo embrionario (octante) (Perry *et al.* 1996 b).

Para poder detectar posibles alteraciones en el desarrollo embrionario se caracterizaron dos parámetros: número de semillas en desarrollo (Li *et al.* 2011) y el tamaño de la semilla (Herridge *et al.* 2011). Curiosamente la mutante de *AGL4*

no presentó evidencias de posibles alteraciones en el desarrollo embrionario, pese a que post embrionariamente regula la expresión de *PIN4*, *PIN1*, y *PLT*, los dos primeros participan en el establecimiento del flujo de auxinas en las primeras etapas de desarrollo embrionario y el último considerado “*regulador maestro*” encargado de definir el meristemo apical en la etapa globular (Jeong *et al.* 2011). A diferencia de *AGL19* que si presento evidencia de posibles alteraciones en el desarrollo embrionario; tamaño de semilla grande (Figura 12) y alteraciones en tercer plano de división durante el desarrollo embrionario (Figura 21) siendo que post embrionariamente regula a *PIN2* y *PIN3*, transportadores que no participan de manera importante en el desarrollo. Aunque tampoco se sabe si regula post embrionariamente a *PIN1*, *PIN4* y *PLT*.

Existe un menor número de semillas desarrolladas en etapas tempranas del desarrollo embrionario en *agl19-3* (Figura 10-11 y Tabla S1). Fenotipo que puede relacionarse con las alteraciones detectadas en el tercer plano de división durante el desarrollo embrionario (ver Figura 21). Es decir, el número de semillas que no completaron su desarrollo abortaron debido al fenotipo presentado en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Cabe aclarar que no puede descartarse la posibilidad de que la mutante de *AGL19* altere la microesporogenesis o megaesporogenesis, resultando defectos en la fertilización. Ya que mutantes de genes esenciales durante el desarrollo embrionario pueden presentar alteraciones en el desarrollo de los gametofitos o viceversa (Muralla, *et al.* 2011). Ejemplo de ello es la mutante *didilia* (At2g011110) la cual presenta un 25 % de semillas abortadas, fenotipo que se debe a alteraciones en el desarrollo del gametofito femenino y durante el desarrollo embrionario. Específicamente el desarrollo del gametofito femenino se queda bloqueado en la etapa FG7 del desarrollo, mientras que el embrionario en la etapa de corazón tardía (Brukhin *et al.* 2011). Otro ejemplo donde se ha observado este fenotipo (menor número de semillas en desarrollo en la silicua), es cuando *Arabidopsis* se expone a concentraciones de NaCl, dependiendo de la etapa en la que la planta se exponga a la presencia de este compuesto se presentaran alteraciones en el desarrollo de los gametofitos o bien durante el desarrollo embrionario (Sun *et al.*2004). Por lo

que para poder determinar si el fenotipo de menor número de óvulos en *ag/19-3* se debe exclusivamente a alteraciones en el desarrollo embrionario, es necesario realizar un análisis genético, esto es, cruza de plantas silvestres con cada una de las mutantes, permitiendo descartar defectos de origen parental o bien realizando un análisis citológico del desarrollo de los gametofitos.

El tamaño de la semilla de *ag/19-3* es estadísticamente más grande en comparación con los demás fondos, sugiriendo alteraciones en la proliferación o expansión celular. Entonces “¿El porcentaje de semillas abortadas correlaciona con el fenotipo de semilla más grande?, es decir, ¿sí menos semillas culminan el desarrollo, habrá más espacio en la silicua y, por lo tanto, las que sí completen su desarrollo serán más grandes?”. Herridge y colaboradores (2011) han observado un incremento en el tamaño de la semilla cuando la silicua tiene pocas semillas. Fenotipo que ha tratado de explicarse con la siguiente hipótesis: plantas que presentan defectos en la fecundidad desarrollan un menor número de semillas con un incremento en el tamaño, esto por una mayor disponibilidad de recursos. Sin embargo, Jofuku y colaboradores 2005 pudieron descartar esta hipótesis comparando el tamaño de la semilla de *ap2* con *ms1* x *Ler* (la mutante *ms1* no produce semillas a menos que sea polinizada con wt). Específicamente los valores obtenidos son: *ap2-1* (2.1mg), *ap2-10* (3.7 mg) y *ms1* x *Ler* (2.9 mg). Por lo que problemas en la fecundidad no pueden explicar el tamaño grande en la semilla de *ap2*, sino más bien por la participación que pudieran tener las giberlinas en alterar el tamaño y la proliferación celular durante el desarrollo embrionario, ya que *AP2* actúa suprimiendo a las giberlinas durante el desarrollo de la flor (Jokufu *et al.* 2005). Si bien en esta tesis no se presentan análisis de cruza genéticas y citológicas que permitan determinar si la fecundidad está siendo reducida, lo mencionado anteriormente por Jofuku y colaboradores (2005) permite descartar la idea de que defectos en la fecundidad son los que pudieran relacionarse con el incremento en el tamaño de la semilla en *ag/19-3*. A pesar de ello presenta una posible participación de las giberlinas durante el desarrollo embrionario.

De manera general el tamaño y peso de la semilla en *Arabidopsis* se atribuye al tamaño y número de células en el embrión, esto, por estar constituida únicamente por una capa celular delgada de endospermo y testa (Schruff *et al.* 2006). Es decir, la proliferación y la expansión celular en el embrión están involucrados en determinar el tamaño final de la semilla, por lo que se hicieron mediciones del largo y ancho de la radícula, así como del ancho y largo de las primeras diez células de córtex. Estas mediciones se llevaron a cabo únicamente en la radícula, ya que es, en este órgano en donde se había visto la regulación de los genes MADS-box sobre los transportadores de eflujo de auxinas (*PIN*s). Cabe aclarar que para delimitar cuál es la región que corresponde a la radícula en el embrión maduro es necesario realizar una tinción, para fines prácticos de la presente tesis, esta se delimitó tomando en cuenta el nivel hasta donde llegan las células de la cofia lateral. Los resultados indican que el embrión es más largo (ver Figura 15 y 16). Sin embargo, este fenotipo no puede explicarse por alteraciones en la proliferación celular en las células de la cofia lateral (ver Figura 20), de ahí que se sugiera realizar mediciones en el tamaño de las células en este tejido, así como de las células de la columela. Adicionalmente las mediciones del largo y ancho de las primeras diez células de córtex no explican el fenotipo de la semilla en *agl19-3* que podría relacionarse con alteraciones en la expansión celular. Estos resultados no contradicen lo planteado anteriormente por Schruff y colaboradores (2006). Más bien indican que la homeostasis celular no está siendo alterada al menos en la radícula, sino más bien en otra región como puede ser la parte que corresponde al hipocotilo o a los cotiledones. Por lo que se sugiere medir el área de los cotiledones así como el tamaño de cada una de las células que lo constituyen o bien medir la longitud de las células epidermales de los integumentos. Si bien el tamaño de la semilla está determinado mayoritariamente por el embrión no debe despreciarse los procesos de proliferación celular tanto en el endospermo como en los integumentos (Ohto *et al.* 2009).

Las mediciones en la radícula no permitieron detectar defectos en la proliferación celular en *agl19-3*. Sin embargo, no puede quedar descartado que *AGL19* actúe como represor celular durante el desarrollo embrionario (esto por el tamaño de la

semilla en *ag/19-3*, ver Figura 12). Tratar de explicar el mecanismo molecular o bioquímico por el cual podrían estar ocurriendo dichas alteraciones en estos momentos podría quedar únicamente en una especulación, basándose en lo reportado para *ap2* mutante de semilla grande, fenotipo que ha sido explicado por la participación de la giberlinas (Jokufu *et al.* 2005) y por la alteración en los niveles de hexosa y sucrosa, ambos implicados en controlar actividades celulares (Ohtho *et al.* 2005). Específicamente los niveles de hexosa se correlacionan fuertemente con actividad mitótica en etapas tempranas de la morfogénesis durante el desarrollo de la semilla, mientras que altas concentraciones de sucrosa se asocian con procesos de expansión celular en la fase de maduración (Ohtho *et al.* 2005).

Respecto a la organización celular en la radícula de *ag/19-3*, se encontraron variaciones en la organización estereotípica del ápice. Se realizó una clasificación para tratar de sistematizar el análisis celular observado (ver Tabla 2). Sumando las alteraciones, encontradas en cada uno de estos dos fondos genéticos, se encontró, que la planta silvestre presenta 23.07% de radículas que no mantienen la organización estereotípica de 4 X 4 (filas x columna en la columela) mientras que en *ag/19-3* existe un 58.33% de radículas alteradas (ver Tabla 2). Fenotipo que podría correlacionarse con los procesos de homeostasis celular que pudieran estar siendo alterados en *ag/19-3*. A pesar, de esta diferencia en porcentajes, estadísticamente no se detectaron diferencias significativas, hecho que puede deberse a las limitaciones de la  $\chi^2$ , cuando se tiene una n pequeña (sobre todo para las plantas silvestres) y contar con valores menores a cinco en cada uno de los fenotipos observados. Este resultado podría estar indicando alteraciones en etapas previas del desarrollo embrionario, de ahí que se decidiera caracterizar etapas tempranas del desarrollo en *ag/19-3*.

Haciendo un análisis de las primeras etapas del desarrollo embrionario en *ag/19-3*, se encontró que el tercer plano de división se altera en un 80 % de los embriones analizados (Tabla 3). Como se puede ver en la figura 21, hay divisiones irregulares

que no resultan en embriones con el arreglo estereotípico de esa etapa de desarrollo (octante). De manera muy interesante, se sabe que *PIN7* participa en la especificación del tercer ciclo mitótico (Friml *et al.* 2003) por lo que estas alteraciones podrían relacionarse con el papel que tiene *AGL19* en regular la expresión de estos transportadores de auxinas. Ya que postembrionariamente *AGL19* regula a *PIN2*, *PIN3*, y podría estar regulando a *PIN7* (datos que se tienen que confirmar). Otra posible explicación a nivel molecular (no deja de ser especulativa) de cómo es que se altera el tercer plano de división en *agl19-3* tiene que ver con la participación que tienen los genes *WOX8* y *WOX9* en esta etapa del desarrollo, además se sabe que estos genes regulan a los *PIN*es (Jeong *et al.* 2011).

Respecto al porcentaje de silicuas abortadas en *agl19-3* (se consideraron como silicuas abortadas a aquellas que mostraron reducción en la longitud del fruto). Fenotipo que podría relacionarse con que el desarrollo de la semilla no sea completado, ya que se sabe que el tamaño final de la silicua se relaciona con los procesos de polinización, fertilización y desarrollo de la semilla (Vivian-Smith *et al.*, 2001).

Se detectaron alteraciones en el tercer plano de división durante el desarrollo embrionario en *agl19-3*. Sin embargo, estos datos no son concluyentes ya que se cuenta con un número reducido de embriones, de ahí que sea importante contar con una *n* más grande. En caso de que se tuviese una *n* más grande, en la que fuera repetitivo dicho fenotipo, sería interesante caracterizar dicha mutante hasta la etapa globular tardía, esto con el objetivo de detectar si es que dicho defecto se corrige, pues se sabe que muchas de las alteraciones que pueden presentarse en las primeras etapas del desarrollo embrionario, pueden ser corregidas al llegar a la etapa globular (Friml *et al.* 2003). Esto puede deberse a que en las primeras etapas de desarrollo solo existen procesos de división celular mientras que en la etapa globular existen claros procesos de diferenciación celular, ya que es en esta etapa en la que se define el meristemo apical y radicular. A pesar de ello, se

detectaron alteraciones en el arreglo de las células de la columela en el embrión maduro en *agl19-3* (Figura 13). Esto sugiere, que *agl19-3* podría estar participando en alterar algún proceso celular que no se corrige durante el desarrollo embrionario (o por lo menos no completamente) durante la etapa globular.

## 8. Conclusión

Como se dijo previamente, el gen MADS box tipo II que más se expresa en el embrión es *AGL15*. Sin embargo, se ha visto que la mutante de este gen o la doble mutante con *AGL18*, (gen que tiene una estructura proteica y patrón de expresión similar a *AGL15*) no tiene un fenotipo durante el desarrollo embrionario (Lehti-Shiu, *et al.* 2005).

A pesar de que en nuestro trabajo tenemos algunos experimentos en donde el número de plantas utilizadas fue insuficiente, estos datos resultan ser muy interesantes nuestros resultados preliminares que sugieren que *AGL19* afecta el desarrollo embrionario de *Arabidopsis*. Este trabajo sería el primero en reportar alteraciones en el desarrollo embrionario, a causa de la mutación de un gen MADS box tipo II durante el desarrollo embrionario, refutándose la idea de que para detectar alteraciones en el desarrollo embrionario es necesario realizar múltiples mutantes de esta familia de genes, esto por la redundancia funcional (Lehti-Shiu, *et al.* 2005 ). De manera muy interesante en la doble mutante de los genes *AGL4* y *AGL19* (ambos homólogos) de tal forma que se elimina la redundancia funcional no se detecto ningún fenotipo en los parámetros indicadores de alteraciones durante el desarrollo embrionario, sugiriendo que a pesar de presentar un 60% de similitud a nivel de su secuencia codificante y el 76% de similitud en su secuencia a nivel de aminoácidos de la región MIK cada uno de estos factores tienen blancos específicos.

## 9. Perspectivas

Es pertinente mencionar que los fenotipos detectados en *agl19-3* tienen que confirmarse, ya que durante transcurso del escrito de esta tesis se detecto en el laboratorio que el fenotipo en *agl19-3* se debía a la presencia de otra mutación. Actualmente ya se cuenta con la retrocruza generada por Cruz, D. (2012) y ha podido corroborarse de manera preliminar que se mantiene el fenotipo de semilla grande, sin embargo este análisis se realizo con un número reducido de semillas, por lo que esta dato tiene que ser confirmando (comunicación personal Ugartechea, Y. 2012). Mientras que el fenotipo de alteraciones en el tercer plano de división no ha podido confirmarse si se mantiene, debido a que en las últimas tinciones realizadas no se obtuvieron las primeras etapas del desarrollo embrionario, esto por problemas en la fertilización debido a las condiciones ambientales. De confirmarse estos dos fenotipos se sugiere realizar los siguientes experimentos:

- Con la finalidad de descartar alteraciones en el desarrollo de los gametofitos se sugiere realizar análisis genéticos, esto es polinizando *agl19* con *wt* y viceversa.
- Para explicar el fenotipo de semilla grande en *agl19-3*, se propone:
  - Caracterizar el desarrollo embrionario en *agl19-3* y *wt*. Posteriormente medir el área de cada una de las etapas, esto con el objetivo de poder determinar en qué momento del desarrollo se incrementa el tamaño del embrión.
  - Específicamente para detectar alteraciones en la proliferación celular, analizar la participación de la *CycB1;1:GUS* (gen que se activa durante la etapa G2 del ciclo celular) en aquella etapa en la que se haya detectado un incremento en el tamaño del embrión.
  - Adicionalmente se propone medir el tamaño de las células epidermales de los integumentos. Para descartar si el tejido materno está contribuyendo en determinar el tamaño de la semilla en *agl19-3*.

- Para determinar qué proceso podría estar involucrado en alterar la homeóstasis celular se plantea determinar los niveles de hexosa y sucrosa, carbohidratos involucrados en modular procesos celulares como la expansión y proliferación celular.
- Se considera pertinente incrementar el número de embriones maduros e inmaduros.

## 10. Referencias

Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., y Scheres, B.(2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, **119** (1), 109-120.

Baroux,C.,Spillane,C. Grossniklaus, U., y Zürich, C.(2002). Minireview Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. *Biology* 3 ( 9 ) .

Burgeff, C., Liljegren,S.,Tapia-López,R.,Yanofky,M., y Alvarez- Buylla,E. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of Arabidopsis thaliana roots. *Planta*, **214** (3), 365 - 372.

Bertossa, R. (2011). Morphology and behaviour: functional links in development and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B,Biological Sciences*, **366** (1574), 2056-2068.

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

Brukhin, V. B., Jaciubek, M., Bolanos Carpio, A., Kuzmina, V., y Grossniklaus, U. (2011). Female gametophytic mutants of Arabidopsis thaliana identified in a gene trap insertional mutagenesis screen. The *International Journal of Developmental Biology*, **55** (1), 73-84.

Caballero, L. (2008). Emergencia de las Forma Vivas. Coptl ArXives, Editores. México, Distrito Federal. p 193

Cairney, J., y Pullman, G. (2007). The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *The New Phytologist*, **176** (3), 511–36.

Capron,A.,Chatfield, S.,Provart, N., y Berleth,T.( 2010). Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *Arabidopsis Book*, **7**, e0126.

Casson,S.,Spencer,M.,Walker, K.,Lindsey,K. (2005).Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **42** (11), 111 - 123.

Coen, E., y Meyerowitz, E. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353**: 31-7.

Cruz, D. (2010).Participación del gen AGL19 en el establecimiento del meristemo floral y el tiempo de floración. Tesis de Maestría, UNAM, México D.F. pp 60

Dobzhansky, T. (1964). Biology, Molecular and Organismic. *American Zoologist*, **4** (4) 443-452.

Dogra,P. (1967). Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in Pinaceae. *Studia Forestalia Suecica*, **45** 5–97.

Drews,G., y Koltunow, A. (2011). The female gametophyte. *Arabidopsis Book*, **9**, e0155.

El-Kasmi, F., Pacher, T., Strompen, G., Stierhof, Y., Muller, L, Koncz, C., Jurgens, G. (2011). Arabidopsis SNARE protein SEC22 is essential for gametophyte

development and maintenance of Golgi-stack integrity. *Plant Journal*, **66** (2), 268-279.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*, **426** (6963), 147-153.

Frohlich, M. (2003). An evolutionary scenario for the origin of flowers. *Nature reviews. Genetics*, **4** (7), 559–66.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., y Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, **449** (7165), 1053-1057.

Goldberg, R. B., de Paiva, G., y Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, **266** (5185), 605-614.

Gramzow, L., Ritz, M. S., y Theissen, G. (2010). A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biology*, **11** (214), 1 - 11.

Gramzow, L., Ritz, M. S., y Theissen, G. (2010). On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends in Genetics*, **26** (4), 149-153.

Harding, E., Tang, W., Nichols, K., Fernandez, D., Perry, S. (2003). Expression and Maintenance of Embryogenic Potential Is Enhanced through Constitutive Expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiology*, **133** ( October), 653 - 663.

Herridge, R., Day, R., Baldwin, S. y Macknight, R. ( 2011). Rapid analysis of seed size in Arabidopsis for mutant and QTL discovery. *Plant Methods*, **7** (1), 1 - 3.

Lopes, M. y Larkins, B. (1993). Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell*, **5** (10), 1383–99.

Heck, G. , Perry, S., Nichols, K., y Fernandez, D. (1995). AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *The Plant Cell*, **7** (8), 1271-1282.

Jeong, S., Bayer, M., y Lukowitz, W. (2011). Taking the very first steps: from polarity to axial domains in the early Arabidopsis embryo. *Journal of Experimental Botany*, **62** (5), 1687-1697.

Jones, A.,Chory, J.,Dangl J.,Estelle,M., Jacobsen,S.,Meyerowitz, E., Norborg, M y Weigel,D. (2008). The Impact of Arabidopsis on Human Health: Diversifying Our Portfolio. *Cell*, **133**, 939 -943.

Jokufu,K.,Omydar,P.,Gee,Z., y Okamuro,J. (2005). Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (8), 3117- 3122.

Jurgens, G., Torres, R., y Berleth, T. (1994). Embryonic pattern formation in flowering plants. *Annual Review of Genetics*, **28**, 351-371.

Kim,H.,Kim,K.,Park,H.,Jang,K.,Chung,M.,Shong,M., y Moon.,W. (2009). The expression and role of serum response factor in papillary carcinoma of the thyroid.*International Journal of Oncology*, **35**, 49 - 55.

Lau, S., Slane, D., Herud, O., Kong, J., y Jurgens, G. (2012). Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 483-506.

Le, B., Cheng, C., Bui, A., Wagmaister, J., Henry, K., Pelletier, J., Knwong, L., Belmonte, M., Kirkbride, R., Horvath, S., Drews, G.,Fischer,R.,Okamuro, J., Harada, J. y Golberg, R. (2010). Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (18), 8063 - 8070.

Lehti-Shiu, M, Adamczyk, B., y Fernandez, D. (2005). Expression of MADS-box genes during the embryonic phase in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, **58** (1), 89-107.

Lersten, N. (2004). Flowering Plant Embryology. Ames, IA: Blackwell Publishing, 172 - 175.

Li, X., Ilarslan, H., Brachova, L., Qian, H., Li, L., Che, P., Wurtele, E., y Nikolau, B. (2011). Reverse-genetic analysis of the two biotin-containing subunit genes of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase in Arabidopsis indicates a unidirectional functional redundancy. *Plant Physiology*, **155** (1), 293 - 314.

Martínez-Castilla, L. y Álvarez-Buylla E. 2003. Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 13407-12.

Meyerowitz, E. (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiology*, **125** (1), 15-19.

Mordhorst, A., Voerman, K., Hartog, M., Meijer, E., van Went, J., Koornneef, M., y de Vries, S. (1998). Somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics*, **149** (2), 549-563.

Müller, C. (2001). Transcription factors: global and detailed views. *Current Opinion in Structural Biology*, **11** (1), 26–32.

Muralla, R., Lloyd, J., y Meinke, D. (2011). Molecular foundations of reproductive lethality in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, **6** (12), e28398.

Nakajima K., Uchiumi T., y Okamoto T. (2010). Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3101 -3105.

Nardmann, J., Reisewitz, P., y Werr, W. (2009). Discrete shoot and root stem cell-promoting WUS/WOX5 functions are an evolutionary innovation of angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, **26** (8), 1745-1755.

Ng,M., y Yanofsky M. (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Review Genetics*, **2** 186-95.

Ohtho, M., Fischer, R., Goldberg, R., Nakamura, K., y Harada, J. (2005). Control of seed mass by APETALA2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** ( 8), 3123 - 3128.

Ohto.,M.,Floyd,S.,Fischer,R.,Goldberg,R., y Harada Jhon. (2009). Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in Arabidopsis. *Sexual plant reproduction*, **22** (4), 277- 289.

Pagnussat, G., Alandete-Saez, M., Bowman, J., y Sundaresan, V. (2009). Auxin-dependent patterning and gamete specification in the Arabidopsis female gametophyte. *Science*, **324** (5935), 1684-1689.

Paponov, I., Teale, W., Lang, D., Paponov, M., Reski, R., Rensing, S. A., y Palme, K. (2009). The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 1 - 16.

Peris, C., Rademacher, E., y Weijers, D. (2010). *Green beginnings: pattern formation in the early plant embryo. Current Topics in Developmental Biology*, **91**, 1 – 27.

Peer,W.,Blakesle,J.,Yang,H y Murphy,A.( 2011).Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant*, **4** (3), 487-504.

Perry, S., Lehti, M., y Fernandez, D., (1999) a. The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiology*, **120** (1), 121-130.

Perry, S., Nichols, K., y Fernandez, D. (1996) b. The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *The Plant Cell*, **8** (11), 1977-1989.

Prige, M., Otsuga, D., Aonso, J., Ecker, J., Drews, G. y Clark S. (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *The Plant Cell*, **17**, 61-76.

Riechmann, J., y Meyerowitz, E. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biological Chemistry*, **378** (10), 1079-1101.

Rounsley, S., Ditta, G., y Yanofsky, M. (1995). Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *The Plant Cell*, **7** (8), 1259-1269.

Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **8** (5), 345-54.

Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willense V., Terlouw, M., Lawaon, E., Dean, C. y Weisbeek, P (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initial. *Development*, **120**, 2475 - 2487.

Schruff, M., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., y Scott, R. (2006). The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development*, **133** (2), 251-261.

Schönrock, N., Boueveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Khöler, C., Grisse, W., y Henning, L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC - independent vernalization pathway. *Genes & Development*, **20**, 1667 - 1678.

Shariatpanahi, M., Bal, U., Hoberle-Bors, E., y Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, **127** (4), 519-534.

Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., y Sommer, H. (1990). Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, **250** (4983), 931-936.

Seguí-Simarro, J., y Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiology Plant*, **134** (1), 1-12.

Smaczniak, C., Immink, R., Angenent, G., y Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, **139** (17), 3081-3098.

Song, S., Hofhus, H., Lee, M., y Clark, S. (2008). Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PL1 phosphatases to establish the root stem organizer and vascular axis. *Development Cell*, **15** (1), 98-109.

Su, Y., y Zhang, X. (2009). Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. *Plant Signaling & Behavior*, **4** (7), 574-6.

Sun, K., Hunt, K., y Hauser, B. Ovule abortion in *Arabidopsis* Triggered by Stress. *Plant Physiology*, **135**, 2358-2367.

Ten Tusscher, K., y Hogeweg, P. (2011). Evolution of networks for body plan patterning; interplay of modularity, robustness and evolvability. *PLoS Computational Biology*, **7** (10), e1002208.

Ugartechea, Y. (2007) a. AUX/LAX-dependent auxin transport influence on the establishment of embryonic cell organization in *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado, University of York, Inglaterra.pp

Ugartechea, Y., Swarup, R., Swarup, K., Péret, B., Whitworth, M., Bennett, M. y Bougourd, S. (2010) b. The AUX1 LAX family of auxin influx carriers is required for the establishment of embryonic root cell organization in *Arabidopsis thaliana*, *Annals of Botany*, **105** (2), 277- 289.

Vicente-Carbajosa, J., y Carbonero, P. (2005). Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *The International Journal of Developmental Biology*, **49** (5-6), 645-651.

Vivian-Smith, A, Luo, M., Chaudhury, A, y Koltunow, A. (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development*, **128** (12), 2321–31.

West, M., y Harada, J. (1993). Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell*, **5** (10), 1361–1369.

Zimmerman, J. . (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, **5** (10), 1411-1423.

## **11. APÉNDICE**

### **Apéndice A. Metodología**

#### **- Extracción de DNA genómico (rápido para hacer PCR de fragmentos pequeños)**

- 1) Coger una hoja pequeña (como de 1 cm de diámetro) y colocarla en tubo eppendorf y machacarla con un pistilo.
- 2) Añadir 400 µl de buffer de extracción y machacar de nuevo hasta romper los fragmentos grandes (dar un vórtex por 10 segundos y mantener a temperatura ambiente).
- 3) Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm a temperatura ambiente.

- 4) Pasar 300  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 300  $\mu$ l de isopropanol (mezclar por inversión y dejar más de dos minutos a temperatura ambiente).
- 5) Centrifugar 10 minutos a 14, 000 rpm a temperatura ambiente.
- 6) Desechar el sobrenadante y dejar secar el pellet
- 7) Resuspender en 50 – 100  $\mu$ l de agua de grado molecular.

#### - Genotipificación de las mutantes

La genotipificación de cada una de las mutantes *agl14-2* y *agl19- 3*, fue realizada por Gámez, A (2010) y Cruz, D (2010).

#### - Escaneo de semillas

Las semillas se colocaron sobre un acetato (nuevo y sin dobleces, para no generar sombras que pueden ser escaneadas) evitándose el trabajo que implica colocar directamente las semillas sobre el vidrio del escáner. Con el objeto de verificar la reproducibilidad de los datos se realizó el escaneo (Hp Scanjet 4600) de una muestra cuatro veces: se dividió la muestra en tres submuestras, las cuales fueron escaneadas de forma independiente y por último se escaneo la totalidad de la muestra.

El análisis de las imágenes escaneadas se realizó con el software Image J, este permite contabilizar el número de partículas y el área de las mismas. Para ello es necesario calibrar el software, esto se logra colocando una línea de longitud conocida en una imagen de referencia, posteriormente se verifica su equivalencia en pixeles (120 pixeles =10,000  $\mu$ m). Se analizó una porción de la imagen asegurándose de excluir restos de tejido materno (silicuas secas, con un límite inferior de análisis de 30,000  $\mu$ m<sup>2</sup> el cual se obtuvo de escanear el acetato sin semillas, valor que hace referencia a manchas propias del escáner que de otra manera se incluyen en al análisis y sesgan el resultado. De esta forma se asegura no incluir en el análisis todo aquello que no fuese semilla (Herridge *et al.*, 2011).

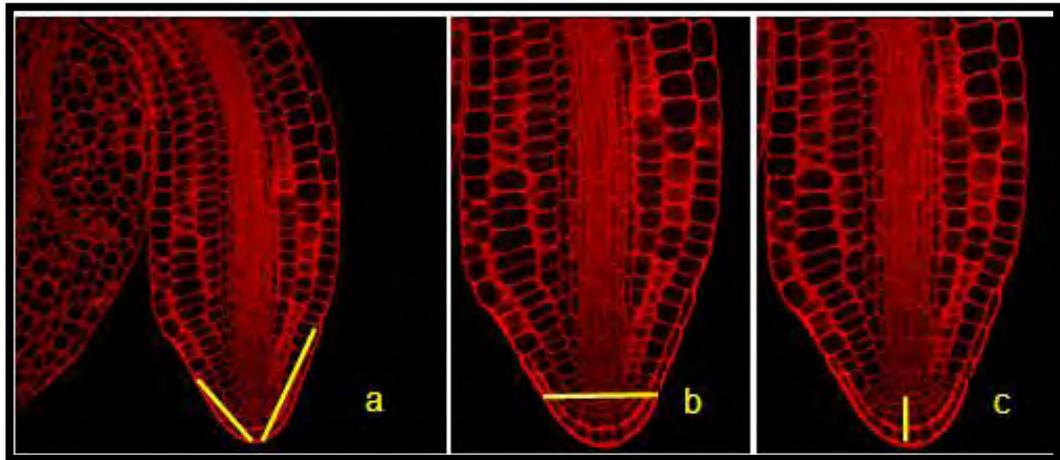
### - Mediciones en la radícula

Para poder detectar a que se debe el incremento en el tamaño de la semilla en *agl19-3*, se realizaron mediciones en la radícula de la siguiente manera:

1) Se determino la longitud de la cofia lateral trazando una diagonal de la célula superior derecha e izquierda de la cofia lateral hacia la porción media de la punta del meristemo (Figura 21 a).

2) Se midió el diámetro de la radícula en la zona más ancha del RAM (Figura 21b) que incluye el ancho máximo de la columela más la cofia lateral en el embrión maduro.

3) Se midió el largo de la columela (Figura 21 c), trazando una línea vertical de la mitad del centro quiescente a la punta del meristemo a lo largo de la columela.



**Figura 22.** Esquema de las mediciones realizadas en el embrión maduro: **a)** Diagonal izquierda y derecha de la cofia lateral; **b)** Ancho de la parte baja del RAM que incluye el ancho máximo de la columela más la cofia lateral en el embrión maduro y **c)** Largo de columela desde la base de la raíz hasta donde comienzan las células del CQ.

## - Tinción de embriones maduros e inmaduros

Los embriones maduros, son aquellos que se obtienen directamente de la semilla madura, mientras que los inmaduros provienen de la semilla en desarrollo. A continuación se presenta la metodología de extracción y tinción.

- 1) Dejar embebiendo las semilla en agua una noche en tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 2) Extraer el embrión removiendo los integumentos de la semilla con una jeringa de insulina bajo observación al microscopio estereoscópico. Cabe señalar que los embriones inmaduros no se extraen del los integumentos por los que se encuentra rodeado, solo basta con “pincharlos”, permitiéndose la penetración de las soluciones fijadoras y de tinción.
- 3) Transferir los embriones a tubos eppendorf de 1.5 ml (para el caso de los embriones maduros) y a cell strainer (para el caso de los embriones inmaduros) con 1 ml de solución fijadora (50% v/v metanol, 10% v/v ácido acético). Los embriones pueden permanecer en esta solución fijadora a 4°C desde una noche o hasta una semana.
- 4) Remover la solución fijadora y enjuagar los embriones tres veces con agua.
- 5) Eliminar el agua restante e incubar los embriones a temperatura ambiente por 30 – 45 minutos en 1 ml de ácido peryódico (1%).
- 6) Remover el ácido periyódico y enjuagar los embriones tres veces con agua.
- 7) Incubar los embriones por 2 horas en 1 ml del reactivo de Schiff's (1.9 g de metabisulfito de sodio, 97 ml de agua y 3 ml de HCl 5 N) y 100 µl de yoduro de propiodio, 1 mg ml<sup>-1</sup> (Sigma).
- 8) Remover el reactivo de Schiff's y enjuagar los embriones tres veces con agua.
- 9) Colocar los embriones en un vidrio de reloj y agregarles una gota de hidrato de cloral (8 g de hidrato de cloral en 3 ml de agua).
- 10) Eliminar el exceso de hidrato de cloral usando una micropipeta.

11) Montar los embriones en un portaobjetos con la solución de Hoyer's (30 g de goma arábica, 200 g de hidrato de cloral, 20 g de glicerol y 50 ml de agua) y sellar la muestra con un cubreobjetos y barniz alrededor del mismo.

Al término del procedimiento de tinción, los embriones deben observarse de color rojo, lo cual indica éxito en la metodología de tinción y la buena calidad de los reactivos de fijación y de tinción.

Los embriones teñidos se observaron al microscopio confocal (Olympus FV 1000). Se realizaron modificaciones en brillo y contraste de las imágenes obtenidas al microscopio en Image J. Posteriormente se usó GIMP 2 para colorear los distintos tipos celulares que constituyen la radícula (Figura 13).

## **Apéndice B. Estadística**

### **- Especificaciones de la prueba de t (prueba de dos colas)**

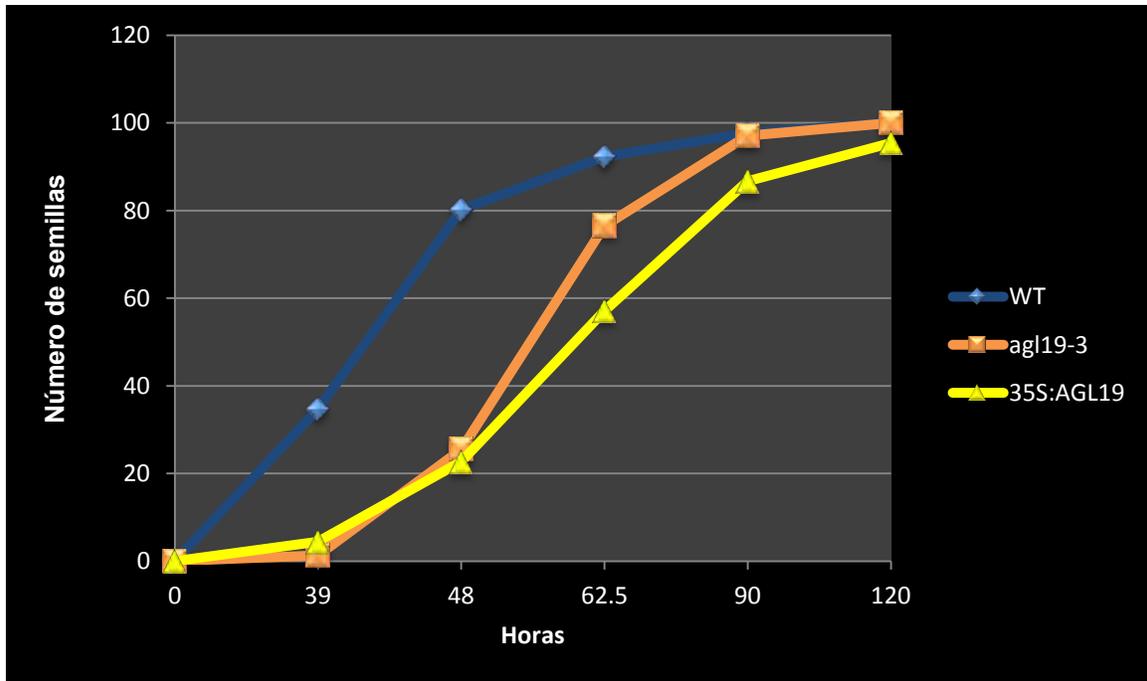
Se realizó en Excel 2007, suponiendo varianzas desiguales con una p de 0.05.

### **- ANOVA y $X^2$**

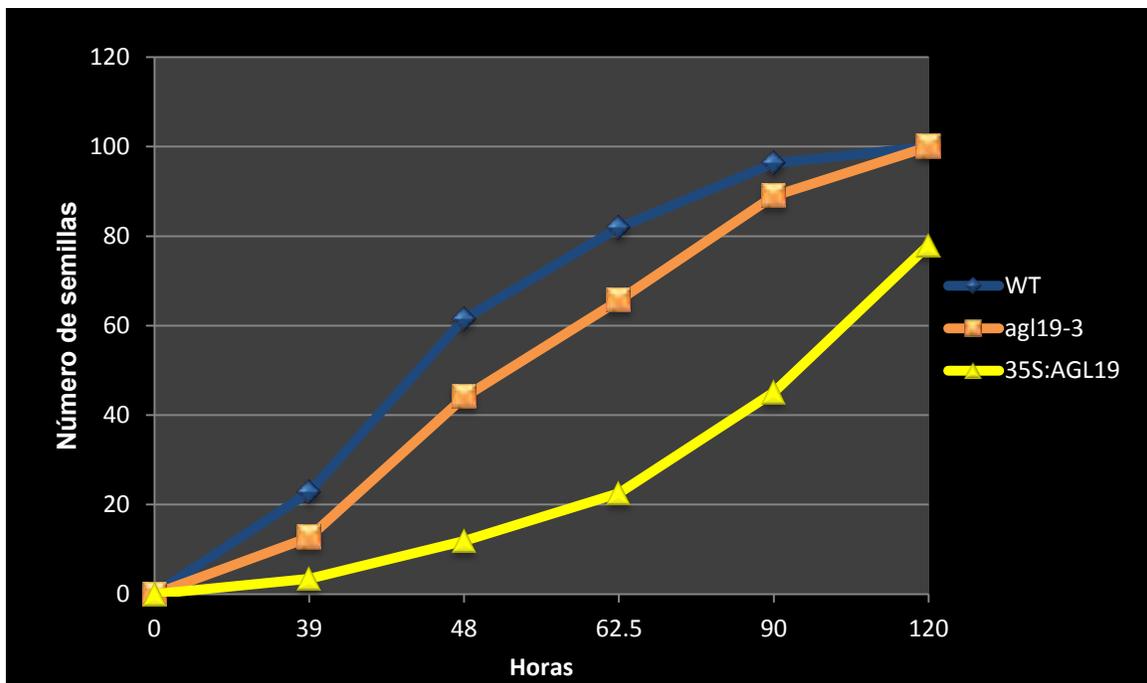
Pruebas realizadas en Minitab 15 con una p de 0.05.

## **Apéndice C. Tasa de germinación**

Los datos de germinación para *ag/19-3*, son resultado de la estancia posdoctoral de Chávez, R y Jaimes, F (2009). Las semillas se estratificaron por 3 días, posteriormente se pusieron a germinar dentro de un caja petri con papel filtro.



**Figura 23.** Tasa de germinación en los fondos: WT, *agl19-3* y *35S::AGL19* .  
Primera réplica biológica.



**Figura 24.** Tasa de germinación en los fondos: WT, *agl19-3* y *35S::AGL19* .  
Segunda réplica biológica.

## 12. Material Suplementario

En la siguiente tabla se presenta (en porcentajes) el número de semillas en desarrollo y abortadas en WT, *agl19-3* y *agl14-2 agl19-3*. Como se puede ver en la Tabla S1, se encontraron diferencias significativas ( $X^2$   $p < 0.05$ ). Estos datos se obtuvieron sumando la totalidad de semillas en desarrollo y abortadas en la silicua cinco y ocho, este análisis no incluye *agl14-2* ya que no se cuenta con el análisis en la silicua cinco. Este análisis refuerza lo presentado en la Figuras 10 y 11.

**Tabla S1.** Porcentaje de óvulos desarrollados y abortados ( $X^2$   $p < 0.05$ ), en los fondos WT ( $n = 97$ ), *agl19-3* ( $n = 36$ ) y *agl14-2 agl19-3* ( $n = 41$ ). Para cada genotipo se realizaron las cuantificaciones cuando el tallo principal tenía entre 14 y 17 silicuas.

Genotipo	Semillas en desarrollo	Semillas abortadas	Total
WT	5046 (96.83 %)	160 (3.07 %)	5206
<i>agl19-3</i>	1368 (88.83 %)	172 (11.17 %)	1540
<i>agl12-2 agl19-3</i>	1834 (94.83 %)	100 (5.17 %)	1934

\*Para este análisis no se cuenta con información para *agl14-2*, debido a cuestiones metodológicas.