



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PARTICIPACIÓN DE LOS GENES MADS EN LA RED  
TRANSCRIPCIONAL QUE REGULA LA  
HOMEOSTASIS CELULAR DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VÍCTOR ROGELIO HERNÁNDEZ MARROQUÍN**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. ADRIANA GARAY ARROYO  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ BUYLLA ROCES  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PARTICIPACIÓN DE LOS GENES MADS EN LA RED  
TRANSCRIPCIONAL QUE REGULA LA  
HOMEOSTASIS CELULAR DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VÍCTOR ROGELIO HERNÁNDEZ MARROQUÍN**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. ADRIANA GARAY ARROYO  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ BUYLLA ROCES  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**DICIEMBRE, 2014**

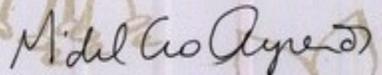
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del Posgrado** en Ciencias Biológicas, del alumno **HERNÁNDEZ MARROQUÍN VICTOR ROGELIO** con número de cuenta **303087678** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LOS GENES MADS EN LA RED TRANSCRIPCIONAL QUE REGULA LA HOMEOSTASIS CELULAR DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana*"**, bajo la dirección de la **DRA. ADRIANA GARAY ARROYO**:

Presidente: DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS  
Vocal: DRA. SVETLANA SHISHKOVA  
Secretario: DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ BUYLLA ROCES  
Suplente: DR. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA  
Suplente: DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de noviembre de 2014.



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a los financiamientos respectivos que apoyaron a la realización de este trabajo en el Laboratorio

de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología: Insumos, secuenciación, trabajo de campo y otras actividades relevantes de proyectos de los de investigación CONACyT 180098, 180380, 152649; DGAPA UNAM: IN203214-3, IN203113-3, IN203814-3, IN226510; UC Mexus: ECO-IE415 y ECO-IE416; y apoyo de estancia sabática a Adriana Garay: CONACYT 204001 y PASPA, UNAM. Agradezco también al financiamiento de la beca de maestría otorgada por el CONACyT de 2011 a 2013, bajo el número de CVU 414093.

Agradezco a las Dras. Adriana Garay Arroyo, mi tutora principal, María Elena Álvarez Buylla Roces y Alejandra Alicia Covarrubias Robles, parte de mi comité tutor, por las constantes y acertadas observaciones, atento apoyo y esmerado cuidado que brindaron a mi proyecto.

## **Agradecimientos a título personal**

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Adriana Garay Arroyo, en el Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Alvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo, Berenice Garcia Ponce de León y Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, la ayuda técnica del Dr. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios, y materiales diversos importantes para realizar la investigación de esta tesis.

Agradezco a Adriana, por todo el atento apoyo, la amable atención, y la constante y entrañable guía que me brindaste durante el proyecto.

A Elena, por haberme abierto las puertas del laboratorio, y por su constante guía.

A la Dra. Covarrubias, por sus comentarios, consejos y constante apoyo.

A las Dras. Berenice García y María de la Paz Sánchez, por el apoyo brindado durante los momentos de duda. Al Dr. Juan Estevez, por su invaluable ayuda, guía, consejos, enseñanzas y la serenidad necesaria. A Rigo, Diana, Tere y Laura, por su solícita atención y ayuda. A los compañeros de doctorado y posdoctorado del laboratorio Aurora, Andrea, Paola, Mario, Julio, Karla, David, Yamel, que estuvieron siempre dispuestos a guiarme y aconsejarme cuando me enfrentaba a mi falta de pericia, madurez y experiencia. A mis compañeros del laboratorio Emiliano, Estephania, Duhyadi, Emilio, Karla, Alejandra, Stefan, por los buenos ratos y los pesares compartidos (que así son menos).

Al Dr. Rubén Marroquín, por la valiosa y atenta ayuda para la obtención de reactivos para mi proyecto.

## **Dedicatoria**

A mis padres, por todo su incondicional apoyo durante esta etapa.

A mi hermana, por su mera presencia, que hacía de estos años unos años más ligeros, y por sus pomposas formas de actuar, que hacían de las mías *ídem*.

A mis amigos de Historias Cientiacionales, Rodrigo, Sofía, Emiliano, Diego y Alejandra, por brindarme un nuevo rumbo de vida.

A todos los compañeros de la revista Cachún, por mostrarme que los proyectos idealistas pueden prosperar si se les da suficiente entrega y cariño.

A la Factoría Escénica, otra vez, no puede ser, por recordarme constantemente que la vida académica puede ser mucho menos solemne de lo que uno se podría imaginar.

# Índice de contenido

Agradecimientos.....	5
Agradecimientos.....	5
Agradecimientos a título personal.....	6
Agradecimientos a título personal.....	6
Dedicatoria.....	8
Dedicatoria.....	8
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS.....	10
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	12
RESUMEN EN INGLÉS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	23
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO PRINCIPAL.....	29
MÉTODOS.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	77
LITERATURA CITADA.....	80
APÉNDICE 1 - OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.....	87
APÉNDICE 2 - SECUENCIA DE AGL19.....	88
APÉNDICE 3 - MÉTODOS.....	91

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

### Figuras

Figura 1. El NCT de la raíz.

Figura 2. Zonas de la raíz según Ivanov y Dubrovsky.

Figura 3. Esquema de los dominios de un gen MADS-box tipo II.

Figura 4. Esquema del interactoma de los genes MADS-box involucrados en el desarrollo de la raíz, basado en los datos de De Folter, et al., 2005.

Figura 5. Raíces de la mutante *agl19-234* (0).

Figura 6. Esquema de las regiones del gen *AGL19* incluidas en las construcciones.

Figura 7. Péptido de la proteína *XAL2* usado como antígeno.

Figura 8. Comparación entre el péptido de la proteína *XAL2* utilizado y la secuencia homóloga en la proteína *AGL19*. Se resaltan los aminoácidos no conservados.

Figura 9. Gráfica comparativa de las longitudes (en cm) de las raíces de las líneas silvestre y la línea mutante de pérdida de función de *AGL19* antes y después de dos retrocruzadas.

Figura 10. Gráficas de los parámetros celulares analizados en los meristemos de las líneas silvestre (*wt*) y *agl19-234* (R2).

Figura 11. Fotografías al microscopio óptico con iluminación Nomarski.

Figura 12. Motivos de regulación encontrados en el locus de *AGL19*, basándose en las bases de datos PLACE y de microarreglos.

Figura 13. RT-PCR semicuantitativas en fondos mutantes de pérdida de función de genes *PcG*.

Figura 14 Intensidades relativas normalizadas con tubulina.

Figura 15. RT-PCR de *AGL19* (y sus respectivos controles) en los diferentes fondos mutantes con y sin tratamiento de auxinas.

Figura 16. Intensidad relativa de *AGL19* normalizada con tubulina.

Figura 17. Preparaciones de raíces de plántulas de 7 dps de la línea *mpiAGL19::GUS* (promotor mínimo y primer intrón).

Figura 18. Gel de la doble digestión.

Figura 19. Gel de la PCR con oligos internos y del vector.

Figura 20. Hoja de *Nicotiana benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens* que llevaban el plásmido *pA09*.

Figura 21: RT-PCR de genes MADS involucrados en desarrollo de raíz y sus interactores directos en fondos mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triple.

Figura 22.1 : RT-PCR de genes MADS involucrados en desarrollo de raíz y sus interactores directos en fondos mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triple.

Figura 22.2 RT-PCR semicuantitativo de RT-PCR de genes MADS involucrados en desarrollo de raíz y sus interactores directos en fondos mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triple.

Figura 23. Imagen de la placa revelada del dot-blot.

Figura 24. Western blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -*XAL2/AGL19*.

Figura 25. Western blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -*XAL2/AGL19* y con desnaturalización con urea 6M.

## **Tablas**

Tabla 1. Construcciones de AGL19. Entre corchetes se indica el tamaño del fragmento de AGL19 utilizado en la construcción [5' del ATG + 3' del ATG].

Tabla 2. Esquema de inmunización.

Tabla 3. Resumen de los parámetros celulares comparados, número de individuos comparados y la presencia de diferencias significativas entre la planta silvestre y la mutante de pérdida de función *agl19-234* (R2).

Tabla 4. Ubicación y secuencia de los motivos de regulación en el locus de AGL19.

## **Gráficos**

Gráficos 1. Cuantificaciones de la expresión relativa de genes MADS en fondos mutantes MADS en raíces de 7dps normalizada con la expresión de tubulinas.

Gráficos 2. Cuantificaciones de la expresión relativa de genes MADS en fondos mutantes MADS en raíces de 11dps normalizada con la expresión de tubulinas.

## RESUMEN EN ESPAÑOL

El correcto equilibrio entre proliferación y diferenciación celular está determinado por redes de regulación génicas y por señales ambientales. En nuestro laboratorio, estamos interesados en entender cómo se establece la homeostasis celular en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* usando a los genes MADS-box tipo II, que codifican para factores de transcripción, como modelo molecular de estudio. De esta familia ya se han identificado tres genes con efectos claros en el desarrollo de la raíz: *XAL1* (*AGL12*), *XAL2* (*AGL14*) y *AGL17* y, por algunos análisis de líneas mutantes, se piensa que el gen *AGL19* también está involucrado en la homeostasis celular del meristemo radical como promotor del crecimiento. En parte aérea se ha caracterizado la participación de este gen en la transición a la floración y la regulación negativa que ejercen las proteínas del grupo Polycomb (PcG) en su expresión. En este trabajo se plantea la caracterización celular y molecular de la función del gen *AGL19* a través del análisis de una línea mutante de pérdida de función, así como de la regulación epigenética a la que puede estar sujeta por proteínas PcG, específicamente en la raíz de *Arabidopsis*. Originalmente, se trabajó en el laboratorio con dos alelos mutantes de pérdida de función de *AGL19* que tenían la raíz primaria más corta que la planta silvestre. Uno de los alelos tiene una inserción de T-DNA y es con el que continuamos trabajando en el desarrollo de esta tesis; mientras que el otro es una línea de inserción de transposón que, desgraciadamente, no era estable por lo que no se pudo continuar caracterizando esta línea. Análisis de retrocruza sugerían que la línea mutante de inserción de T-DNA tenía una mutación de pérdida de función adicional en un locus distinto al de *AGL19*, por lo que se decidió limpiar el fondo genético y buscar otro alelo mutante de pérdida de función para este locus. Nuestros datos muestran que este nuevo alelo de *AGL19* no participa en el crecimiento de la raíz primaria ya que el mutante de pérdida de función tiene una raíz primaria del mismo tamaño que la planta silvestre. Más aún, los análisis celulares indican que la duración del ciclo celular, el tamaño del meristemo, el número de células en el meristemo, tamaño promedio de células diferenciadas de córtex, la tasa de producción celular y el tiempo de vida en el meristemo no muestran diferencias significativas de los datos para la planta silvestre. De manera muy interesante encontramos evidencia que sugiere que, al igual que en la parte aérea, *AGL19* se regula por proteínas del grupo Polycomb en la raíz y esta regulación es dependiente de las auxinas en este órgano.

## RESUMEN EN INGLÉS

The right balance between cell proliferation and differentiation is determined by gene regulatory networks and environmental cues. We are interested in our laboratory in understanding how the cellular homeostasis in the root apical meristem is established, using type II MADS-box genes, that code for transcription factors, as a molecular model. Among this gene family, three genes with clear effects in root development have been identified -- *XAL1* (*AGL12*), *XAL2* (*AGL14*) y *AGL17*, and, from analysis of mutant lines, we believe that *AGL19* is also involved as a growth promoter in the cellular homeostasis of the root apical meristem. In the aerial parts, the participation of this gene in the transition to flowering and the negative regulation that Polycomb-group proteins (PcG) exert on its expression has been identified. In this work, we put forward the cellular and molecular characterization of the function of the gene *AGL19* through an analysis of a loss-of-function mutant line, as well as its epigenetic regulation by PcG proteins, specifically in the root of *Arabidopsis*. Originally, we worked at the laboratory with two loss-of-function mutant alleles for *AGL19*, that showed a shorter primary root than its wild type counterpart. One of those alleles has a T-DNA insertion and we continue to use it during the development of this work -- the other allele is a transposon-insertion line that unfortunately was unstable, so we didn't continue the characterization of that mutant line. Retrocrosses analysis suggested that the T-DNA insertion line had an additional loss-of-function mutation at a locus different to *AGL19*, so we chose to clean the genetic background and look for another loss-of-function mutant allele for this locus. Our data show that this new *AGL19* allele does not participate in primary root growth, since its loss-of-function mutant shows a primary root length of the same size than its wild-type counterpart. Moreover, cellular analysis suggest that cell cycle duration, meristem length, cell count in the meristem, mean size of differentiated cortex cells, cell production rate, and lifetime in the meristem show no significative differences to the wild-type plant. Interestingly, we find evidence suggesting that, just as for the aerial parts, *AGL19* is regulated in the root by PcG proteins and that this regulation is auxin-dependent.

# INTRODUCCIÓN

## Meristemos apicales en las plantas

El correcto desarrollo de los organismos depende del equilibrio entre proliferación y diferenciación celular, conocido también como homeostasis celular. En las plantas, el control de este balance es especialmente importante en los meristemos, un conjunto de células localizadas en los ápices aéreos y de raíces, algunas de las cuales se mantienen en continua proliferación. El mantenimiento de la proliferación celular en el meristemo se establece por la acción conjunta de productos génicos y señales ambientales. En *Arabidopsis*, los meristemos se establecen embrionariamente y el crecimiento y mantenimiento post-embrionario se regula de manera diferencial. En la parte aérea, el mantenimiento del meristemo depende de la expresión diferencial de ciertos genes reguladores, que forman asas de retroalimentación negativas de forma tal que generan dominios de expresión espacial y temporalmente excluyentes. Entre los genes más importantes para el mantenimiento del meristemo aéreo se encuentran *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, *WUSCHEL (WUS)*, los genes *CLAVATA1, 2 y 3 (CLV1-3)*, *HAIRY MERISTEM (HAM)*, *AGAMOUS (AG)* y los genes *ASYMMETRIC LEAVES1 y 2 (AS1 y AS2)* (Lenhard y Laux, 1999; Doerner, 2005; Perales y Reddy, 2012). El mantenimiento meristemático está muy estudiado en la parte aérea, pero últimamente también se han hecho muchos progresos con respecto a la homeostasis del meristemo apical de raíz.

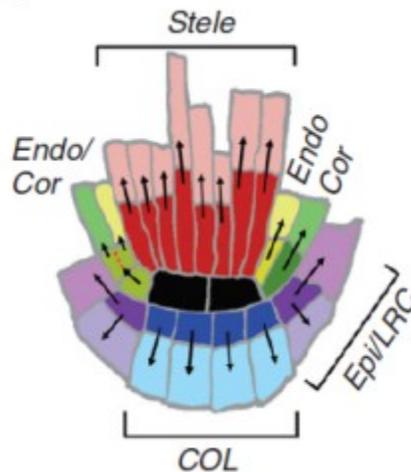
En el meristemo apical de la raíz (Root Apical Meristem o RAM), existe un grupo de células con escasa división en el punto convergente de las líneas celulares. Estas células, conocidas como centro quiescente (CQ), mantienen a sus células contiguas, llamadas células troncales, o iniciales, en un estado indiferenciado (Dolan *et al.*, 1993; van den Berg *et al.*, 1997). En conjunto, al CQ y a las células iniciales se les conoce como Nicho de Células Troncales (NCT) (Dolan *et al.*, 1993; Aida *et al.*, 2004; Jiang y Feldman, 2005; Bennet y Scheres, 2010) y, en *Arabidopsis*, hay cuatro conjuntos de células iniciales, los cuales son los progenitores de los linajes celulares de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Los tipos celulares de la raíz son, de afuera hacia adentro, la epidermis, el córtex, la endodermis y el tejido vascular, que está conformado por varios tipos celulares (entre otros, el periciclo); en el ápice de la raíz encontramos además a la columela y a la cofia lateral. Para dar lugar a todos estos tipos celulares, existen cuatro tipos de células iniciales: unas que dan lugar a la epidermis y a la cofia lateral; otras que generan el tejido vascular; el tercer tipo, que determina las células de la columela y, finalmente, un tipo

que da lugar al córtex y a la endodermis. Éste último tipo de células iniciales y las que dan lugar a la epidermis y a la cofia lateral pasan por una división anticlinal (en ángulo recto al plano de la superficie del órgano) antes de dar origen a los dos linajes (Benfey y Scheres, 2000).

El nicho de células troncales (Figura 1) se establece desde el desarrollo temprano del embrión gracias a la acción conjunta de ciertos factores de transcripción y de la hormona auxina. En la etapa globular del embrión, el flujo de auxinas, mediado principalmente por los transportadores de eflujo PINFORMED (PIN), que viene de la región apical del embrión encuentra su máximo en la célula suspensora superior. El pico de auxinas especifica a la hipófisis, la célula que dará origen al nicho de células troncales. En esta célula se encuentra un factor transcripcional de respuesta a auxina (Auxin Response Factor, ARF), llamado *MONOPTEROS (MP)*, que regula los genes que determinan la identidad de la hipófisis. La proteína MP sólo puede unirse a sus blancos cuando está libre de la interacción con la proteína *BODENLOS (BDL)*. La auxina promueve la degradación de BDL, así que en una concentración alta de auxinas, BDL se degrada y MP queda libre para unirse a los promotores de sus genes blanco y especificar la identidad de la hipófisis. Esta célula pasará por una división periclinal (paralelas al plano de la superficie del órgano) y la célula hija superior dará origen al CQ, mientras que la basal formará la columela (Scheres *et al.*, 1994; Perilli *et al.*, 2012).

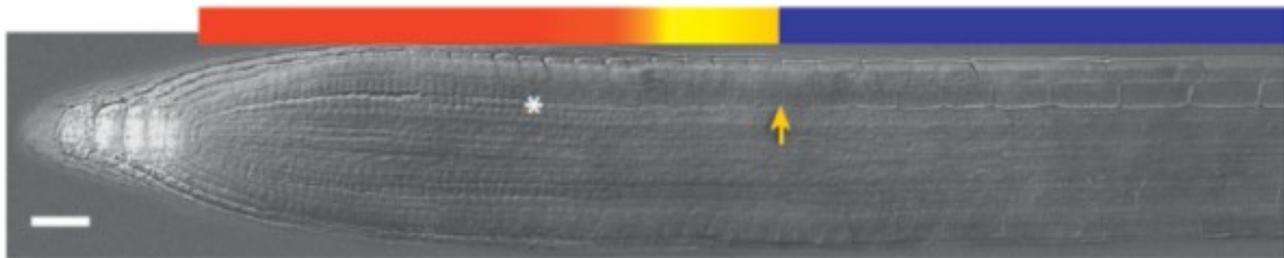
Durante la etapa embrionaria de corazón, el CQ recluta a sus células contiguas para formar el NCT. En etapas post-embrionarias, este nicho se mantiene por un gradiente de auxinas y la expresión de genes que determinan su identidad. El gen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, que codifica para un factor de transcripción con homeodominio, participa en el mantenimiento de la identidad de las células del CQ (Sarkar *et al.*, 2007). A su vez, la expresión de *WOX5* está regulada negativamente por *CLAVATA-like 40 (CLE40)* en la parte más distal del meristemo (Stahl *et al.*, 2009), mientras que es mantenida positivamente por el factor de transcripción *SCARECROW (SCR)* (Sabatini *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2007) el cual se expresa en las células del CQ gracias a la acción conjunta de sí mismo y de *SHORT-ROOT (SHR)*, otro factor de transcripción que sólo se expresa en el tejido provascular (Nakajima *et al.*, 2001). La proteína SHR se transporta al CQ, promueve la expresión de *SCR*, que a su vez mantiene la expresión de *WOX5*, con lo cual se mantiene la identidad de las células de CQ. La vía *SHR/SCR* también está involucrado en la formación de un patrón radial en la raíz (Nakajima y Benfey, 2002; Sarkar *et al.*, 2007). Adicionalmente, las proteínas *JACKDAW (JKD)* y *MAGPIE (MGP)*, factores de transcripción con motivos de dedos de zinc, delimitan el rango de acción del SHR al tejido

vascular (Welch, *et al.*, 2007). En el CQ se encuentra un pico de concentración de auxinas (Sabatini *et al.*, 1999; Aida *et al.*, 2004), que es resultado del flujo de esa hormona mediado por los diferentes transportadores, principalmente los PIN (Grieneisen *et al.*, 2007), los cuales son regulados tanto por la auxina como por los genes *PLETHORA 1 y 2* (*PLT1 y 2*) que codifican para factores de transcripción con dominio AP2 (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). A su vez, se puede considerar que los genes *PLT* se expresan según un gradiente ápico-basal de concentración de auxinas (Galinha *et al.*, 2007), aunque la interacción entre estos los factores de transcripción y la auxina es más compleja, sobre todo en las respuestas trópicas de la raíz (Mähönen *et al.*, 2014). En simulaciones computacionales, se ha demostrado que estos elementos son los componentes principales de la red genética detrás del arreglo celular del NCT (Azpeitia *et al.*, 2010).



[Figura 1. El NCT de la raíz. El par de células en negro son el Centro Quiescente (CQ). A su alrededor, se observan los cuatro tipos de células iniciales (cinco en plantas no jóvenes [Bennett y Scheres, 2010]). En rojo se observan las células iniciales que dan origen al tejido vascular (Stele/Estele). En verde claro del lado izquierdo, se muestra la célula inicial que en plantas jóvenes da origen tanto a la endodermis (Endo) como al córtex (Cor). En amarillo del lado derecho, las células iniciales que dan origen a la endodermis en plantas de otros estadios de desarrollo, y en verde, las células iniciales que dan origen al córtex en plantas de otros estadios del desarrollo. En azul se muestran las células iniciales que dan origen a la columela (COL) mientras que, en morado, las células iniciales que dan origen tanto a la epidermis (Epi) como a las células de la cofia lateral (LRC:/Cofia lateral). Tomado de Bennett y Scheres, 2010.]

La raíz de *A. thaliana* se puede diferenciar en tres zonas en un eje ápico-basal, según el estado de proliferación y diferenciación de sus células. La zona que contiene al NCT y la inmediatamente proximal a éste se llama zona meristemática y en ella se encuentran las células en continua proliferación. Conforme uno se aleja del NCT, las células disminuyen progresiva y dramáticamente su actividad mitótica hasta que llegan a una zona en la que comienzan a aumentar su longitud, pero no su grosor, y establecen así una zona de alargamiento (Figura 2). Proximal a ella, se encuentra una región de la raíz donde se comienzan a formar pelos radicales a partir de las células epidérmicas, y las células de todos los tejidos obtienen sus características finales; esta zona se llama de diferenciación (Bennet y Scheres, 2010; Ivanov y Dubrovsky, 2013).



[Figura 2. Zonas de la raíz según Ivanov y Dubrovsky. La barra roja indica el dominio de proliferación y la barra amarilla el dominio de transición. Ambos dominios constituyen el meristemo. La barra azul indica la zona de alargamiento. La flecha amarilla marca el borde entre el meristemo y la zona de alargamiento y el asterisco blanco el borde probabilístico entre los dominios de proliferación y transición. La barra de escala es de 50  $\mu\text{m}$ . Modificada de Ivanov y Dubrovsky, 2013. ]

La tasa de crecimiento general de la raíz depende del equilibrio entre la tasa de proliferación en el meristemo, la tasa a la que las células dejan de dividirse y comienzan a alargarse, y la tasa de alargamiento. La tasa de división de las células meristemáticas no se detiene súbitamente en la zona de alargamiento, sino que hay una zona de transición donde algunas células que ya están creciendo todavía llegan a dividirse. Puesto que esta zona marca el final del meristemo, ha sido de gran interés marcar sus límites, a pesar de que éstos no pueden establecerse claramente porque los diferentes tipos celulares pueden dejar de dividirse en diferentes momentos. Recientemente, se propuso que la distinción entre las zonas de proliferación y la de transición sea de carácter probabilístico: en la primera hay alta probabilidad relativa de hacer mitosis y en la segunda, baja (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Por otro lado, la tasa de alargamiento es el parámetro que más contribuye al tamaño de la raíz, puesto que una célula

completamente alargada mide, aproximadamente, 250  $\mu\text{m}$  mientras que una meristemática mide solo alrededor de 7  $\mu\text{m}$ , lo cual produce una diferencia entre ellas de veinte a treinta veces. El mantenimiento de los diferentes dominios en la raíz se corresponde con los gradientes longitudinales de, por un lado, la auxina y de los genes *PLT* en el dominio de proliferación y, por el otro, de la expresión de *SHY2* promovida por la hormona citoquinina en el dominio de transición y alargamiento. (Grieneisen *et al.*, 2007; Galinha *et al.*, 2007; Perilli *et al.*, 2011).

En el meristemo apical aéreo (SHOOT APICAL MERISTEM o SAM), además de la regulación entre proliferación y diferenciación, es vital la adquisición de identidad de tejidos y órganos.

Específicamente en el meristemo floral, la especificación de los órganos florales depende de la combinatoria de expresión de la familia de genes MADS-box. Se ha determinado a profundidad la participación de esta familia en el conocido modelo ABC de especificación de órganos florales (Coen y Meyerowitz, 1991; Wagner *et al.*, 1999; Ng y Yanofsky, 2001; Lamb *et al.*, 2002 ).

Por otra parte, en el RAM, se han identificado algunos genes MADS-box con un papel regulador de la homeostasis del RAM (Zhang y Forde, 1998; Tapia-López *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013).

Aunque aún no están bien entendidos los mecanismos por los que efectúan dicha regulación, es de esperar que tengan papeles relevantes en las redes génicas que subyacen el desarrollo de la raíz.

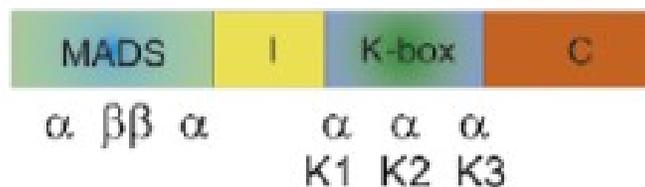
## **Los genes MADS-box**

Los genes MADS-box codifican para factores de transcripción que se unen al DNA por medio de un dominio MADS (Messenguy y Dubois, 2003). Están presentes en todos los grupos de eucariontes, aunque es en plantas donde se han diversificado en mayor extensión y donde tienen papeles clave en todos los procesos del desarrollo (Gramzow y Theissen, 2010). Hay proteínas MADS-box involucradas tanto en el crecimiento como en la diferenciación y en la regulación del ciclo de vida de las plantas, pero es en la determinación de los órganos florales y en la transición hacia la floración donde se han estudiado más exhaustivamente (Riechmann y Meyerowitz, 1997; Becker y Theissen, 2003; Gramzow y Theissen, 2010).

Los genes MADS-box pueden clasificarse en dos grupos, basándose en diferencias en el dominio MADS: los del tipo I y los del tipo II (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000; Parenicová *et al.*, 2003). Hasta el

momento se sabe que los genes MADS-box tipo I tienen funciones clave en el desarrollo de los gametofitos, mientras que los genes MADS-box tipo II están involucrados en los principales eventos del desarrollo del esporofito (Masiero *et al.*, 2011; Gramzow y Theissen, 2010). En este trabajo se hablará principalmente de los tipo II.

Las proteínas MADS-box tipo II poseen cuatro dominios funcionales y en función de ellos se les ha denominado MIKC (Figura 3); este grupo es exclusivo de plantas. El primer dominio, que se encuentra en el extremo amino de la proteína, es el dominio MADS, que se une al DNA en secuencias blanco denominadas cajas CArG. La secuencia consenso de estas cajas es 5'-CC[A/T]<sub>6</sub>GG-3', aunque existe variación y se ha demostrado que algunas proteínas MADS se unen a variantes de esta secuencia (Zobel *et al.*, 2010). El dominio I, nombrado así por ser un dominio "intermedio", participa tanto en interacciones con otras proteínas como con el DNA. El dominio K, nombrado así por su similitud a nivel de secuencia con los dominios de la queratina, está involucrado principalmente en las interacciones proteicas de dimerización y de complejos de orden superior y tiene tres motivos distinguibles llamados K1, K2 y K3. Finalmente, el dominio C, localizado en el extremo COOH participa principalmente en la transactivación (activación de la transcripción en *trans*) y en el ensamblaje de estructuras de órdenes superior como los tetrámeros (Kaufmann *et al.*, 2005; Immink *et al.*, 2010).



[Figura 3. Esquema de los dominios de un gen MADS-box tipo II. Se observan el motivo conservado MADS de unión al DNA en el extremo N-terminal, seguido de la región intermedia (I), la caja (K) y el dominio C-terminal, que es el menos conservado. Se indican las posiciones de las alfa hélices ( $\alpha$ ) y de las láminas beta ( $\beta$ ) supuestas. Las tres alfa-hélices cortas sucesivas en la región de la caja K se numeran K1-K3. Tomado de Immink *et al.*, 2010.]

En *A. thaliana* hay más de 100 genes MADS-box (Parenicova *et al.*, 2003) y todos ellos se unen al mismo tipo de secuencia en el DNA (la caja CArG) a pesar de que tienen genes blanco específicos

(Shore y Sharrocks, 1995). Se sabe que es necesario que las proteínas MADS formen dímeros para unirse al DNA (Pollock y Treisman, 1991; Riechmann, *et al*, 1996) y, al menos en dos casos, (APETALLA 3 (AP3)/PISTILLATA (PI) y SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)/AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)), se ha demostrado que su dimerización es importante para transportarse al núcleo (Davies *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1997; Kaufmann *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). Las proteínas MADS-box forman complejos de orden superior y se ha reportado que esto incrementa su afinidad de unión al DNA (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Smaczniak *et al.*, 2012). Por estudios genéticos se hipotetizó que las proteínas MADS-box involucradas en la determinación de los órganos florales funcionan como tetrámeros (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Honma y Goto, 2001; Pelaz *et al.*, 2001) y el modelo más aceptado actualmente para la formación de estos tetrámeros es la de los cuartetos florales (Theissen y Saedler, 2001). Este modelo postula que un par de proteínas MADS-box interactúan a través del dominio K1 y forman dímeros que se unen al DNA. Una vez que está unido un dímero, se pueden unir a otro dímero por medio de la caja K3 y es entonces cuando se lleva a cabo la transactivación (Theissen y Saedler, 2001; Jack, 2001). Este modelo ha sido confirmado con experimentos *in vitro* y también se demostró que el tetrámero puede unirse a una sola caja CARG aunque con menos estabilidad que si hay dos cajas (Smaczniak *et al.*, 2012).

## **La combinatoria de genes MADS box como elemento central en su papel de reguladores**

La expresión de los genes eucariontes está regulada por el control combinatorio de sus factores de transcripción; de esta forma se pueden generar patrones complejos de expresión espacio-temporal de decenas de miles de genes con muchas menos proteínas reguladoras (Reményi, *et al.*, 2004). El control combinatorio de las proteínas MADS en la especificación de órganos florales es un ejemplo bien conocido. Originalmente, el modelo ABC de desarrollo floral (Coen y Meyerowitz, 2001) proponía que la combinación pareada de tres clases de genes era suficiente para especificar la identidad de los verticilos florales. La expresión de los genes de función A en solitario especificaban sépalos; los genes de función A sumados a los de función B otorgaban la identidad de pétalos; los genes de función B junto con los de función C especificaban estambres, y finalmente los genes de función C en solitario conducían a la formación de carpelos. En esta propuesta, las proteínas MADS se unirían en dímeros al DNA para regular la expresión de sus genes blanco. Sin embargo, gracias a estudios de mutantes nulos

y de sobre-expresión ectópica, se descubrió que se necesitan genes de una cuarta clase, llamados de función E, para que las otras clases lleven a cabo su función reguladora (Pelaz *et al.* 2000; Honma y Goto, 2001; Pelaz *et al.*, 2001). Las proteínas de función E sirven como puentes para unir las proteínas de las otras clases, lo que lleva a un modelo de complejos cuaternarios (Theissen y Saedler, 2001; Immink *et al.*, 2010); incluso se ha propuesto que la proteína de función E SEPALLATA3 (SEP3) puede servir de “pegamento” a complejos MADS de orden superior que no necesariamente sean los del modelo ABC (Immink *et al.*, 2009).

La historia del modelo ABC (ahora ampliado a modelo ABCDE; Theissen, 2001) muestra que el control combinatorio de las interacciones de las proteínas MADS es esencial para llevar a cabo su función reguladora por lo que resulta importante conocer las interacciones potenciales entre esta familia de genes. Así mismo, se piensa que la estequiometría de los complejos proteicos también es relevante para su función (Jack, 2004; de Folter y Angenent, 2006). Estudios de interacción proteína-proteína *in vitro* muestran que entre estas proteínas los heterodímeros son mucho más comunes que los homodímeros y que cada una de ellas tiene un número determinado de interactores (de Folter *et al.*, 2005); de tal modo que la cantidad de combinaciones posibles de proteínas no es infinita pero sí considerable, así como la diversidad de complejos de unión al DNA. Esta capacidad de combinación de diferentes proteínas puede ayudar a entender una parte de la plasticidad y robustez observada en el desarrollo de las plantas. Además, se ha observado que las proteínas MADS-box tienen interacciones con otras proteínas: factores de transcripción de otras familias, chaperonas, cinasas, acetilasas de histona y desacetilasas de histona (Messenguy y Dubois, 2003; Smaczniak *et al.*, 2012). Todas estas interacciones aumentan la capacidad de las proteínas MADS de combinarse con otras proteínas y dar especificidad de unión en sus blancos o determinar su carácter de activadores o represores de la transcripción (Immink *et al.*, 2010).

## **Remodeladores de cromatina en los meristemos**

Para que un patrón de expresión regulado por factores de transcripción se mantenga estable, uno de los factores clave son las marcas epigenéticas en la cromatina; es decir, cambios bioquímicos en el DNA que, sin modificar la secuencia de nucleótidos, alteran la expresión de los genes. Las proteínas encargadas de colocar y remover estas marcas bioquímicas son llamadas remodeladoras de cromatina.

En *Arabidopsis*, se conocen muchos factores involucrados en diferentes procesos de remodelación de la cromatina; la acetilación de las histonas y metilación del DNA y las histonas, así como las proteínas que colocan esas marcas bioquímicas, son factores muy importantes.

Las proteínas del grupo Polycomb (PcG) están involucradas en la trimetilación de la lisina 27 de la histona 4 (H4K27me3) de la cromatina; esta marca se asocia con la supresión de la expresión génica (Martin y Zhang, 2005; Schuettengruber *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, las proteínas PcG pueden formar dos tipos de complejos: *Polycomb repressive complex 1* y 2 (PRC1 y PRC2). PRC2 cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona 4 y recluta a PRC1, el cual actúa para mantener estable la represión génica (Weake y Workman, 2008; Schuettengruber *et al.*, 2007; Hennig y Derkacheva, 2009). Dentro del complejo PRC2 se encuentran proteínas de diferentes familias, y se considera que las más importantes son CURLY LEAF (CLF), SWINGER (SWN), EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2), VERNALIZATION2 (VRN2), FERTILISATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1); las metiltransferasas CLF y SWN son las subunidades catalíticas del complejo (Pien y Grossniklaus, 2007; Hennig y Derkacheva, 2009). Se piensa que el complejo PRC1 en plantas está formado de manera similar al de animales, pero hasta ahora solo se han identificado tres proteínas involucradas: LIKE-HETEROCHROMATIN PROTEIN (LHP1), ARABIDOPSIS THALIANA RING 1A (atRING1a) y ARABIDOPSIS THALIANA RING 1B (atRING1b) (Xu y Shen, 2008).

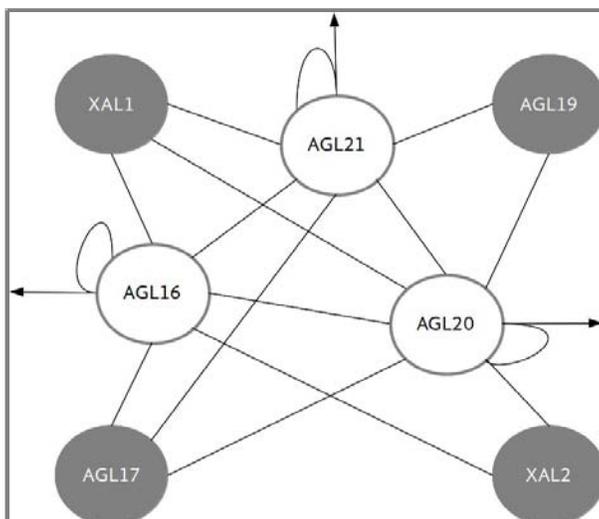
En animales, los complejos PcG se unen al DNA en secuencias específicas llamadas *Polycomb Response Elements* (PRE), y también pueden ser reclutados por RNAs no codificantes (Simon y Kingston, 2009; Schuettengruber y Cavalli, 2009; Derkacheva y Hennig, 2014). En *Arabidopsis*, el reclutamiento de los complejos Polycomb también sucede en secuencias similares a PREs, que son suficientes para reclutar los complejos o por medio de RNA largos no codificantes (lncRNA) (Derkacheva y Hennig, 2014). Se han identificado muchos genes blanco para los complejos Polycomb, entre los cuales hay importantes factores de transcripción que regulan el desarrollo como FLOWERING LOCUS C (FLC), AG, AP3, KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 2 (KNAT2), STM, LEAFY (LFY), MEDEA (MEA) y PI (Pien y Grossniklaus, 2007). Los complejos PcG están involucrados en múltiples procesos del desarrollo de las plantas (Pien y Grossniklaus, 2007) y participan, junto con otros remodeladores de la cromatina, en mantener los patrones de expresión de el SAM y el RAM (Shen y Xu, 2009). En el RAM, MSI1 y CLF, unidos a RETINOBLASTOMA-

RELATED (RBR), actúan cascada abajo de *SCR* en la coordinación de la división y diferenciación celulares (Wildwater *et al.*, 2005). Por otro lado, la proteína SCR se une a LHP1 en la raíz, y se propone que estas proteínas actúan junto con las desacetilasas de histona para regular la proliferación de las células radicales de córtex (Cui y Benfey, 2009).

## **ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **Genes MADS-box implicados en el desarrollo de la raíz**

El laboratorio de Genética Molecular Desarrollo y Evolución (GeMoDEvo) del Instituto de Ecología reportó la caracterización de dos genes MADS-box con funciones importantes en el desarrollo de la raíz: *XAL1* (*AGL12* - AT1G71692; Tapia-López *et al.*, 2008) y *XAL2* (*AGL14* - AT4G11880; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Actualmente se han identificado dos genes más: *AGL19* (AT4G22950) y *AGL17* (AT2G22630; Pacheco-Escobedo *et al.*, en preparación; Fonseca-Salazar, 2011) que también participan en el desarrollo de la raíz. Los datos del interactoma de los genes MADS-box (de Folter *et al.*, 2005), junto con datos de microarreglos, hibridaciones de RNA *in situ* y RT-PCR de tiempo real (GENEVESTIGATOR, Burgeff *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2004), indican que las proteínas codificadas por estos cuatro genes tienen interactores específicos en la raíz: *AGL16*, *AGL20* y *AGL21*; sin embargo, las interacciones entre ellas no son indiscriminadas. Las proteínas con funciones identificadas, llámense *XAL1*, *XAL2*, *AGL19* y *AGL17* no forman homodímeros ni tampoco interactúan directamente entre ellas, sino sólo con dos o tres de los otros interactores, *AGL16*, *AGL20* y *AGL21*. Estos últimos, a su vez, pueden formar homodímeros y tienen un mayor número de interactores, incluso con otros genes MADS-box (Figura 4).



[Figura 4. Esquema del interactoma de los genes MADS-box involucrados en el desarrollo de la raíz, basado en los datos de De Folter, *et al.*, 2005. Las líneas indican una interacción directa en el ensayo de doble híbrido, y las flechas indican que existen interacciones con otras proteínas no incluidas en esta figura.]

Las plantas mutantes de pérdida de función de los genes *XAL1*, *XAL2* y *AGL17* tienen fenotipos de raíz primaria significativamente diferentes al fenotipo silvestre, mientras que no se ha reportado ningún fenotipo en la raíz de los mutantes de los genes *AGL16*, *AGL20* y *AGL21*. El mutante de pérdida de función de *AGL19* con el que se inició este trabajo también mostraba un fenotipo de raíz primaria significativamente diferente al fenotipo silvestre. Lo anterior, sumado al interactoma de estos genes, lleva a proponer una separación de las proteínas en dos grupos, según su función en los complejos proteicos. El grupo cuyos mutantes muestran fenotipos distintos, que además son los que tienen pocos interactores, se pueden considerar como selectores. Al grupo de los genes que no muestran fenotipo y que muestran muchas interacciones se les puede llamar comodines. En ese esquema, las proteínas selectoras determinarían la especificidad de unión a las secuencias de DNA, mientras que las comodines apoyarían en la formación de los complejos y en la transactivación. Es de hacer notar que los cuatro genes selectoras y *AGL21* tienen una expresión mayor en raíz que en la parte aérea (GENEVESTIGATOR; Burgeff *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2004). En contraste, *AGL16* y *AGL20* no se expresan preferencialmente en la raíz en comparación con su expresión en el vástago; de hecho, en éste último tienen funciones clave en su desarrollo que han sido bien caracterizadas (de Meaux *et al.*, 2008; Lee y Lee, 2010). Esto resulta interesante porque sugeriría que, al formar tetrámeros con los

genes que sí se expresan preferencialmente en raíz, los genes comodines podrían tener un papel diferente en la raíz al que presentan en el vástago.

En el laboratorio de GeMoDEvo, se caracterizaron los mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triples de los genes selectores. Tres de los genes selectores, *XAL1*, *XAL2* y *AGL19* se han caracterizado como promotores del crecimiento, pues sus mutantes de pérdida de función tienen raíces más cortas que las de la planta de tipo silvestre. Se ha visto que el menor crecimiento de las mutantes de *XAL1* y *XAL2*, se debe tanto a un RAM de menor tamaño con una menor tasa de proliferación celular como a un menor alargamiento de las células (Tapia-López *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). La línea mutante de pérdida de función de *AGL19* que se usó al principio de este proyecto mostraba el mismo fenotipo (Figura 5). Por otro lado, *AGL17* se ha caracterizado como represor del crecimiento por mostrar un fenotipo de raíz primaria más larga que la silvestre y se ha observado que regula la expresión de proteínas del ciclo celular (Fonseca-Salazar, 2011; Pacheco-Escobedo *et al.*, datos no publicados).



[Figura 5. Raíces de la mutante *agl19-234 (0)*. Se aprecia que tiene raíces primarias significativamente más cortas que las de tipo silvestre ( $34.8 \pm 3.5$  [n=37] para las de tipo silvestre;  $25.5 \pm 3.7$  [n=38] para la mutante; datos no publicados de Mario Pacheco-Escobedo). Plantas de 7 dps (días post siembra). Barra de escala de 1 cm. Fotografía cortesía de M. Pacheco-Escobedo.]

De estos cuatro genes MADS-box, el que menos se ha caracterizado en la raíz es *AGL19*. Si bien existen datos sugerentes como resultado de las líneas dobles mutantes y una línea adicional de pérdida de función por inserción de transposón (de la colección En8130, que se había dejado de usar por su inestabilidad cuando comenzó este proyecto) que mostraba raíces más cortas que la silvestre, no se cuenta con información sobre su función en la homeostasis celular ni tampoco se conoce si su regulación en raíz esta modulada por remodeladores de la cromatina como sucede en la parte aérea.

## **Regulación epigenética de *AGL19***

Existe un solo estudio profundo sobre la regulación epigenética de *AGL19*. Schönrock y sus colaboradores (2006) examinaron la expresión de *AGL19* en líneas mutantes de pérdida de función que codifican proteínas del complejo PRC2, específicamente *MSI1*, *EMF2* y *CLF*. En las tres líneas, *AGL19* aumentó su expresión significativamente respecto a la expresión de la línea silvestre en hojas de roseta de cuatro semanas. También realizaron ensayos de ChIP con anticuerpos contra una versión marcada de FIE, otra proteína del complejo PRC2. Encontraron que ésta se pega directamente a *AGL19*, preferentemente en una región que incluye el primer exón y el primer intrón. Al analizar la marca epigenética de H3K27me3 en el locus de *AGL19*, encontraron que ésta es más frecuente en una región de ~400 pares de bases a partir del ATG, región que incluye ~200 pb del primer intrón. La conclusión de este estudio es que el complejo PRC2 coloca marcas epigenéticas de represión (H3K27me3) en el locus de *AGL19*, las cuales mantienen inhibida la expresión de este gen, al menos en las hojas de roseta.

En posteriores estudios, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) contra LHP1, proteína que forma parte del complejo PRC1, y se encontró que uno de los locus con los que se asocia es el de *AGL19*, específicamente en plántulas completas de 10 días post-germinación (Turck *et al.*, 2007). En este estudio se encontraron también las marcas epigenéticas de H3K27me3 en el locus de *AGL19*. Sin embargo, puesto que ni la ausencia de expresión de *LHP1* ni su sobre-expresión modificaron los patrones genómicos de la marca H3K27me3, los autores sugieren que LHP1 no está involucrada en colocar la marca de metilación, sino en promover la represión transcripcional de los genes marcados por el complejo PRC2 (Turck *et al.*, 2007).

## Auxina, genes MADS y remodeladores epigenéticos

Como se menciona arriba, la hormona auxina tiene un papel central en la regulación de la homeostasis del RAM. Por un lado, el CQ se establece en la zona con el pico más alto de concentración de auxinas en el RAM (Ljung *et al.*, 2005; Petersson *et al.*, 2009). Por otro lado, el gradiente de auxinas a lo largo de zonas más distales del meristemo está relacionado con patrones de proliferación y alargamiento celulares: en el CQ encontramos la concentración mas alta de auxinas, seguida de una concentración alta en la zona de proliferación celular y una concentración baja en la zonas de diferenciación como son las del alargamiento y maduración celular (Petersson *et al.*, 2009; Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Curiosamente, los niveles más altos de las auxinas corresponden a la zona del meristemo en donde casi no se encuentra división celular, el CQ (Grieneisen *et al.*, 2007; Garay-Arroyo *et al.*, 2012) por lo que la relación de las auxinas con la proliferación celular no es lineal.

La auxina es tanto blanco de regulación como regulador de múltiples genes involucrados en el desarrollo de la raíz (Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Recientemente, se ha reportado que algunos genes MADS-box están involucrados con las vías de regulación de las auxinas en la raíz. *XAL1* (*AGL12*) regula la proliferación celular en la raíz y se induce en la presencia de auxinas (Tapia-López *et al.*, 2008). Por su parte, *XAL2* (*AGL14*) modula el transporte de auxinas por medio de la regulación transcripcional de algunos transportadores PIN y también se induce por auxinas (Garay-Arroyo *et al.*, 2013). No existen reportes sobre la relación entre las auxinas y la regulación sobre *AGL19*.

Recientemente se han buscado conexiones entre los genes reguladores del desarrollo de la raíz y los complejos Polycomb. Algunos de estos grupos de genes incluyen a aquellos relacionados con la biosíntesis y señalización por auxinas. En tejidos de hoja, múltiples genes involucrados en la biosíntesis, transporte, percepción y transducción de señales de la auxina son blancos de la marca H3K27me3 colocada por los complejos PcG (Lafos *et al.*, 2011). EMF1 y EMF2, dos proteínas involucradas en el silenciamiento de cromatina por complejos Polycomb, regulan múltiples genes (más de 100) involucrados en la ruta de síntesis y señalización por auxinas (Kim *et al.*, 2010) y la marca H3K27me2 colocalizada con EMF1 se encuentra en muchos loci relacionados con estas mismas funciones (Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, la conexión entre la vía de regulación de auxinas y los marcadores epigenéticos en la raíz parece tener un patrón propio y diferente a los tejidos de la parte

aérea. No se sabe si las marcas de represión colocadas por H3K27me3 en la raíz también se encuentren en genes involucrados con síntesis y respuesta a auxinas. En contraste, hay reportes de que la regulación por auxinas y la regulación mediada por los complejos Polycomb parece ser independientes para muchos genes del desarrollo radical. La pérdida de PICKLE (PKL), una proteína remodeladora de cromatina, produce raíces más cortas, principalmente debido a cambios en la expresión de genes reguladores del desarrollo de la raíz, pero no a cambios en la concentración de auxinas; por su parte, la pérdida de CLF produce cambios antagónicos a la de PKL en la homeostasis del meristemo radical, y tampoco parece estar conectado con modificaciones en la concentración de auxina, sino con cambios en la expresión de genes reguladores (Aichinger *et al.*, 2011).

Con los datos anteriores, resulta interesante plantear la pregunta de si la regulación de *AGL19* puede ser mediada por auxinas, como ocurre con *XAL1* y *XAL2*, o si su regulación epigenética es independiente, como ocurre con otros genes reguladores del desarrollo de la raíz.

## **La función de *AGL19* en el desarrollo de la raíz**

Los datos preliminares de las líneas mutantes de *AGL19* apuntan a que es un regulador del desarrollo de la raíz, probablemente un promotor del crecimiento (afirmación que necesitaría corroborarse con el análisis de la línea mutante nula retrocruzada, pero que se ve sustentada por el fenotipo de la línea de transposón), mientras que en las líneas de mutantes dobles de genes MADS (*xal1/agl19* y *xal2/agl19*) y en la línea triple mutante de genes MADS (*xal1/xal2/agl19*) parecería tener un papel de represor del crecimiento.

Como parte del análisis de participación de este gen en el desarrollo de la raíz, también se podría investigar su efecto en la dinámica celular; es decir, si afecta procesos de proliferación, diferenciación o ambos. Los datos de los interactomas, sumados a los datos de las líneas mutantes dobles y triples sugieren que la función molecular de *AGL19* debe ocurrir a través de la formación de complejos multiméricos, así que la determinación de los componentes de esos complejos es importante para la identificación de las diferentes funciones de este factor de transcripción. Tomando en cuenta el hecho de que este gen se expresa principalmente en la raíz, es interesante saber si su regulación epigenética ocurre de la misma forma que en la parte aérea, donde está fuertemente reprimido. A la par, sería interesante conocer si esa regulación epigenética está mediada por auxinas o es independiente de la acción de esa fitohormona. En este trabajo se abordarán estas preguntas.

## HIPÓTESIS

*AGL19* participa en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La regulación de la expresión de *AGL19* en raíz está controlada por las mismas vías de regulación genética que en la parte aérea.

## OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar la participación del gen *AGL19* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la longitud de las raíz primaria de la línea silvestre (col) y la línea mutante *agl19-234* después de la segunda retrocruza, previamente obtenida en el laboratorio.
  - Describir algunos de los parámetros celulares cuantitativos (tamaño del meristemo, el número de células en el meristemo, la tasa de proliferación, la duración del ciclo celular) de esta línea de pérdida de función.
- Analizar la expresión de *AGL19* en mutantes de genes PcG.
- Comparar la expresión de *AGL19* en mutantes de genes PcG con y sin tratamiento con auxinas.
- Retomar y corroborar los datos de la combinatoria de *AGL19* con *XAL1*, *XAL2* y *AGL17* en el desarrollo de la raíz primaria de *A. thaliana*.
  - Hacer experimentos de RT-PCR para verificar la regulación cruzada entre estos factores de transcripción.
- Generar construcciones y líneas transgénicas de plantas que permitan el análisis de expresión de *AGL19*, en particular, una construcción con la región promotora fusionada a un gen reportero, una construcción con la región promotora y regiones reguladoras internas fusionadas a un gen reportero y una construcción del la región promotora y todo el ORF de *AGL19* fusionada a un gen reportero.

- Probar la eficacia de un anticuerpo anti-XAL2/AGL19 para análisis proteicos *in planta*.

## **MÉTODOS**

### **Caracterización de la línea mutante *agl19-234* (R2)**

#### **Medición de la longitud de las raíces**

##### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Se sembraron 30 semillas de cada línea analizada: silvestre (ecotipo *Columbia*), *agl19-234* (*salk\_00234*, sin retrocruzar) y *agl19-234* (R2) (segunda retrocruza; previamente obtenida en el laboratorio) en las condiciones estándar de crecimiento (ver apéndice 3).

##### *Medición de raíces*

De las plantas que no se descartaron, se marcó el frente de crecimiento de las raíces primarias cada día con un intervalo de 22-26 horas, excepto los días 6 y 8 después de la siembra. El último día de marcaje fue el día 11 después de la siembra. Se escanearon las cajas para digitalizar la imagen, previo establecimiento de la escala. Se utilizó el programa ImageJ para determinar la longitud de las raíces primarias a través de las funciones “Segmented line” y “Measure”. Se descartaron aquellas raíces que hubiesen sido infectadas por hongos. Al final, se incluyeron 19 raíces de la línea silvestre, 30 de la línea *agl19-234* (R2) y 25 de la línea *agl19-234* (0). Se realizó la prueba estadística t de Student entre las líneas silvestre y *agl19-234* (R2) con 40 grados de libertad y  $p=0.05$  para ver si había diferencias significativas en el crecimiento de las raíces.

#### **Análisis del tamaño del meristemo y del número de células del mismo**

##### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Se sembraron 30 semillas de la línea silvestre y 30 de la línea *agl19-234* (R2); la distribución fue de cinco plantas por cada línea por caja de Petri. Se usaron las condiciones estándar de crecimiento en este ensayo (ver apéndice 3).

##### *Medición de parámetros celulares*

A los 6 días después de la siembra se marcó el frente de crecimiento de la raíz primaria. Al día siguiente, a la misma hora, se marcó el frente de crecimiento a la punta de la raíz primaria, se escanearon las cajas, previo establecimiento de la escala, y se dejaron fijando en reactivo de Hersch por dos días (ver apéndice 3). Posteriormente, las raíces se montaron en portaobjetos, embebidas en el mismo reactivo. Se observaron individualmente en un microscopio Olympus Bx60 para contar el número de células de córtex en el meristemo y medir las células de córtex diferenciadas. Se descartaron

aquellas raíces que se enterraron en el agar y las que se hubieran contaminado con hongos. Al final, se incluyeron en el estudio 17 raíces silvestres y 15 mutantes *agl19-234* (R2). Debido a la manipulación durante el tratamiento, se desprendió la punta de la raíz (donde se encuentra el meristemo) de algunas raíces, así que también se descartaron algunos datos relacionados a número de células en el meristemo o a tamaño de células diferenciadas en el córtex. En cada gráfica se incluye la información del número de raíces usadas para cada línea.

## **Análisis de regiones regulatorias del locus de *AGL19***

Por medio de análisis *in silico* (Higo *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2007b) se buscaron motivos de regulación en el locus de *AGL19* (AT4G22950), incluyendo todos los intrones del gen y la región río arriba del inicio de la transcripción hasta el UTR del gen inmediato anterior (AT4G22960). Específicamente, se buscaron cajas CARG (CCW<sub>6</sub>GG y CW<sub>10</sub>G) y Elementos de Respuesta a Auxina (AuxRE, en inglés; TGTCTC). A la par, se buscaron en las bases de datos sitios predichos y confirmados de unión de la proteína LHP1, parte del complejo Polycomb 2, y marcas de trimetilación en la lisina 27 de la histona 3.

## **Expresión de *AGL19* en mutantes de genes del grupo Polycomb**

### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Se esterilizaron 25-30 semillas de las líneas silvestre, *clf*, *lhp1-1* y *lhp1-2*. Se usaron las condiciones estándar de crecimiento.

### *Extracción de RNA y síntesis de cDNA*

El séptimo día después de la siembra se extrajo el RNA de la raíz y la parte aérea por separado. Se usó el protocolo estándar (ver apéndice de métodos).

### *RT-PCR semicuantitativa*

Para calibrar los niveles de carga de cDNA, se corrieron PCRs para amplificar el transcrito de tubulina (TUB). Una vez calibrados a un nivel aceptable ( $\pm 0.2$  de intensidad relativa), se llevaron a cabo PCR con oligonucleótidos para amplificar los mRNA de *CLF*, *LHP1* y *AGL19* (con los pares de oligos siguientes, respectivamente: CLF F & CLF R, LHP1\_JSIF\_qF & LHP1\_JSIF\_qR, y AGL19 F430 & AGL19 Rev North; ver apéndice 1 para obtener la secuencia de los oligos). Posteriormente, se

corrieron también PCR para amplificar los transcritos de *XAL1*, *XAL2* y *AGL17*. Todas las amplificaciones se hicieron a 35 ciclos, excepto las de tubulinas, que se hicieron a 25 ciclos.

## **Expresión de *AGL19* en mutantes de genes del grupo *Polycomb* tratadas con auxina**

### *Material biológico y condiciones de crecimiento*

Se sembraron 30 semillas en promedio de las líneas silvestre, *clf*, *lhp1-1* y *lhp1-2* y se dividieron en dos bloques experimentales. Se usaron las condiciones estándar de crecimiento.

### *Tratamiento con auxinas*

A los 7 días después de la siembra, uno de los bloques experimentales se transplantó a cajas con medio MS 0.2X, agar a 1% y sacarosa a 1% más 1 $\mu$ M de 3-IAA (auxina). El otro bloque se transplantó a cajas con medio fresco de MS 0.2X, agar a 1% y sacarosa a 1%. Después de cuatro horas, se recolectaron en nitrógeno líquido las raíces y las partes aéreas por separado, y se les almacenó a -70°C.

### *Extracción de RNA y síntesis de cDNA*

Se usó el mismo método que en el experimento anterior.

### *RT-PCR semicuantitativa*

Se usaron el mismo protocolo y los mismos oligonucleótidos que en el experimento anterior. Todas las amplificaciones se hicieron a 37 ciclos, excepto las de tubulinas, que se hicieron a 27 ciclos.

## **Expresión de genes MADS-box en fondos mutantes MADS-box**

Se realizaron dos RT-PCR semicuantitativas a dos diferentes etapas del desarrollo. El primer experimento fue a 7 dps y el segundo a las 11 dps y se analizó la expresión relativa de siete genes MADS-box. Se analizaron cuatro mutantes sencillos: *xal1-2*, *xal2-2*, *gk17*, *agl19-234(0)*; seis mutantes dobles: *xal2-2 xal1-2*, *xal1-2 gk17*, *agl19-234(0) xal1-2*, *xal2-2 gk17*, *agl19-234(0) xal2-2*, *agl19-234(0) gk17*; y un mutante triple: *xal2-2 agl19-234(0) xal1-2*, más la línea de tipo silvestre de ecotipo Col-0.

### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Se sembraron en promedio 30 semillas de cada una de las líneas mencionadas anteriormente. Se usaron

las condiciones estándar de crecimiento. En el primer ensayo, se recogieron las plántulas al séptimo dps. En el segundo, se recogieron al décimoprimer dps. El material biológico colectado se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C.

#### *Extracción de RNA y síntesis de cDNA*

Se extrajo RNA de las muestras usando el método de extracción por Trizol (ver apéndice de métodos 2.1). Se comprobó la integridad del RNA corriendo un gel de agarosa al 1% y se cuantificaron las concentraciones de RNA usando lecturas de Nanodrop (Thermo Scientific) e intensidades relativas de las bandas en el gel (medidas con el software KodakMI). Se sintetizó cDNA a partir de los RNA con oligo dT usando la enzima SuperScript II de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El volumen del cDNA resultante se quintuplicó con agua de grado molecular; las muestras se almacenaron a -20°C.

#### *RT-PCR semicuantitativas*

Luego de calibrar los niveles de cDNA como en los experimentos anteriores, se llevaron a cabo PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar los mRNA de *XAL1*, *XAL2*, *AGL17*, *AGL19*, *AGL16*, *AGL20* y *AGL21*. Para cada gen se usaron oligos que hibridaran con exones: *AGL12-RT-F* & *AGL12-RT-R*, *AGL14 F458* & *AGL14 R458*, *OEAB155* & *OEAB168*, *AGL19F430* & *AGL19RevNorth*, *AGL16F (4002)* & *AGL16R (4003)*, *SOC F Mitzi* & *SOC R Mitzi* y *OEAB 164* & *OEAB 167* (ver apéndice 1 para secuencias). Las reacciones se hicieron con la enzima TaqPol de Invitrogen. Todas las amplificaciones se hicieron a 35 ciclos, excepto las de tubulinas, que se hicieron a 25 ciclos.

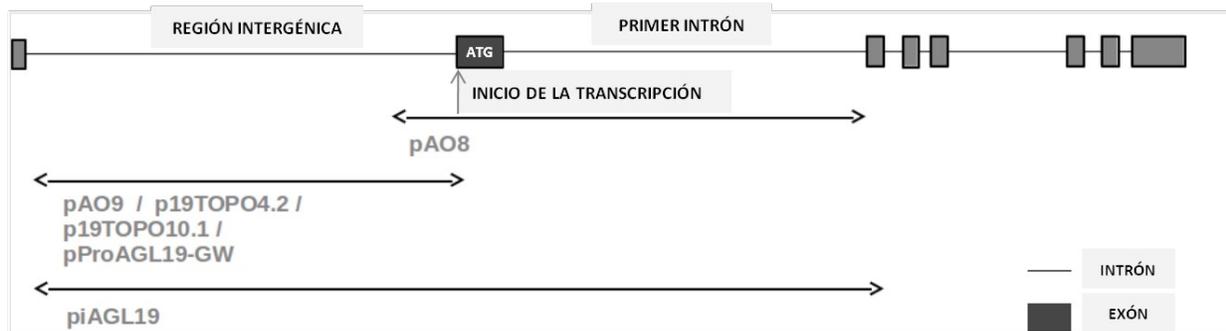
### **Generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* con diferentes construcciones de *AGL19***

Además de las dos construcciones de regiones reguladoras con las que ya contaba el laboratorio (pAO8 y pAO9), se generaron cuatro construcciones más. En la tabla siguiente se especifican las construcciones generadas.

[Tabla 1. Construcciones de *AGL19*. Entre corchetes se indica el tamaño del fragmento de *AGL19* utilizado en la construcción [5' del ATG + 3' del ATG]. E: Construcciones preexistentes, G: Construcciones generadas por este proyecto, O: Construcciones generadas por otro proyecto]

<b>Regiones</b>	<b>Promotor mínimo más</b>	<b>Promotor completo</b>	<b>Promotor más</b>
-----------------	----------------------------	--------------------------	---------------------

reguladoras	primer intrón	primer intrón
	pA08 (fusionado a GUS) (E) [175+2002 pb]	pA09 (fusionado a GUS) (E) [2699 + 0 pb]
<b>Construcciones</b>		piAGL19 (O)
		p19TOPO4.2 (G) [2687 + 18 pb]
		p19TOPO10.1 (G) [2687 + 18 pb]
		pProAGL19-GW (G) [2697 + 18 pb]



[Figura 6. Esquema de las regiones del gen *AGL19* incluidas en las construcciones. ]

### Corroboración de construcciones preexistentes

Las construcciones pAO8 y pAO9 (en el vector pART27), que contienen el minipromotor y el primer intrón, y el promotor completo respectivamente (ver tabla 1 arriba), fueron generadas por Amanda Ochoa en 2002 (Ochoa-Espinosa, 2002). Para corroborar que estas construcciones tuvieran la secuencia esperada, se secuenciaron los plásmidos a partir de purificaciones de DNA extraído de la cepa sembrada de los glicerolos de *Agrobacterium tumefaciens*.

#### Extracción de los plásmidos para secuenciación

Se sembraron células de *A. tumefaciens* que provenían de cultivos congelados en glicerol con las construcciones de pAO8 y pAO9 en cajas petri con medio LB por dos días a 30°C. Los antibióticos de selección fueron espectinomicina (sp) y rifampicina (rf) y siempre se usaron a 100 µg/µl para ambos

cultivos. Se picaron algunas colonias y se inocularon en medio LB líquido con el antibiótico y se dejaron crecer por dos días en agitación a 30°C. A partir de esas células se extrajo el DNA plasmídico con un método casero (ver apéndice de métodos 3.1) y se corroboró la presencia del inserto por medio de una PCR usando oligos endógenos a la construcción. Se utilizó ese DNA plasmídico para transformar células de la cepa TOP10 de *Escherichia coli*. Se sembraron estas transformaciones en cajas petri con medio LB con sp dejándose crecer toda la noche a 37°C. Se picaron las colonias que hubieran crecido y se sembraron en medio LB líquido con sp; se dejaron en agitación a 37°C toda la noche. A partir de esas células se extrajo DNA plasmídico y se corroboró con una PCR usando los mismos oligos endógenos a la construcción. Una vez verificado, el DNA plasmídico se mandó secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

#### *Corroboración de la línea transgénica de A. thaliana preexistente*

El laboratorio cuenta con la línea transgénica homocigota de *A. thaliana* transformada con la construcción pAO8. Se sembraron 26 semillas de esta línea (llamada aquí mpiAGL19:GUS) en condiciones estándar de crecimiento. Las plantas se recogieron a los 7 dps, se colectaron sólo las raíces y se dejaron en solución de tinción X-Gluc toda la noche (ver apéndice de métodos). Al día siguiente se deslavarón las raíces con una solución de acetona y metanol (ver apéndice de métodos) y se observó la expresión de GUS al microscopio estereoscópico. Las raíces se montaron en una solución de glicerol y formaldehído (ver apéndice de métodos) para observarlas al microscopio óptico.

#### **Generación de líneas transgénicas de *A. thaliana***

Las construcciones generadas por este proyecto se usaron para transformar plantas de *A. thaliana*. Las tres diferentes construcciones contienen diferentes versiones del promotor de *AGL19*.

#### *Clonación del promotor completo en el vector pCR8/GW/TOPO*

Se amplificaron 2705 pares de bases de un fragmento que contiene la región río arriba del ATG de *AGL19*, hasta el UTR del gen inmediato anterior, y un fragmento río abajo del ATG. El oligonucleótido *forward* utilizado, AGL19F1A, agrega la secuencia blanco para la enzima de restricción AscI, y se pega a 2687 río arriba del ATG; mientras que el oligonucleótido *reverse*, AGL19R4XM, agrega la secuencia blanco para la enzima XhoI e introduce un cambio en el codón de inicio, abarcando 18 pares de bases río abajo del ATG (ver secuencia completa del gen y secuencia de los oligos en apéndice de métodos). Con estos oligos, se realizó una amplificación a partir de DNA genómico de *A. thaliana* (~50ng) con el kit EXPAND de Roche para una reacción de 25 µl y una temperatura de alineamiento de 55 °C. El

programa fue realizado siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al correr los productos del PCR en un gel de agarosa al 0.7%, se observó la banda del tamaño esperado (~2.7 kb) y se aisló la banda utilizando el gel kit QIAquick de QIAGEN. Se verificó la presencia de la banda tras la purificación corriendo un gel de agarosa al 0.7% y se llevó a cabo una reacción de adición de *overhangs* de adeninas usando el amplificado como templado (ver protocolo en apéndice). Se utilizó ese DNA para la reacción de clonación en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO de Invitrogen, la cual se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante. El plásmido resultante se nombró ppAGL19-GW y se utilizó para transformar células *E. coli* Oneshot; la transformación resultante se sembró en cajas con medio LB adicionado con sp (100 µg/µl). Se dejaron crecer las células toda la noche a 37°C y, a las colonias que crecieron se les nombró como p19TOPOx (del 1 al 10).

Se extrajo el DNA plasmídico de estas colonias con un protocolo de miniprep de lisis alcalina y fenol para su análisis y secuenciación (ver protocolo en apéndice). Una vez purificados los plásmidos, se realizó un análisis de restricción para verificar la presencia y orientación del inserto. Se hizo una primera digestión con la enzima EcoRI, la cual corta en los flancos del inserto, liberándolo y se observaron las bandas esperadas. Para verificar la orientación, se hizo una doble digestión con las enzimas XbaI y SacI. La primera tiene un solo sitio de corte en el vector TOPO y ninguno en el inserto, mientras que la segunda no tiene sitios de corte en el vector y sólo uno en el inserto. Con base en este ensayo, se eligieron cinco colonias para secuenciar. Se envió el DNA plasmídico al Instituto de Biotecnología de la UNAM en donde se utilizaron los oligos m13-F y m13-R que hibridan con las regiones flanqueantes de los insertos en el vector TOPO. Corroborada la inserción en el vector, se enviaron más muestras de las dos colonias con mayor grado de identidad (p19TOPO4 y p19TOPO10) para secuenciar todo el inserto, esta vez utilizando oligos internos del promotor de *AGL19*.

#### *Clonación del promotor completo en el vector pENTR/D-TOPO*

Se amplificó casi toda la región intergénica completa (2697 pb) río arriba de *AGL19* más 18 pares de bases río abajo del ATG, lo cual resultó en un fragmento de 2715 pb. Los oligos utilizados fueron AGL19R4XM y AGL19TOPOD. La amplificación se realizó con la enzima Platinum HiFi de Invitrogen. El mismo fragmento se amplificó de dos diferentes templados; DNA genómico (1) y el BAC FH719 (2). En ambos la amplificación fue exitosa, así que se procedió a clonar ambos fragmentos en el vector de entrada creando el plásmido pProAGL19-GW. Se realizaron amplificaciones por PCR para verificar la presencia del inserto en el vector de entrada con oligonucleótidos endógenos de *AGL19* y un m13 propio del vector. Los plásmidos se mandaron secuenciar al Instituto de

Biotecnología, UNAM, y al Instituto de Biología, UNAM.

#### *Recombinación en vectores de expresión*

Se eligieron dos diferentes colonias de la construcción ppAGL19-GW, nombradas p19TOPO4.2 y p19TOPO10.1. Se llevó a cabo una reacción de recombinación LR de Gateway con el plásmido pGWB3 que contiene la secuencia codificante de GUS, siguiendo las especificaciones del fabricante. Los plásmidos resultantes se nombraron pAGL19::GUS2 y 3 respectivamente. Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa Top10 con estos plásmidos, se sembraron en cajas Petri con medio LB y kanamicina (km) y ampicilina (am), ambas a 50µg/ml. Se dejaron crecer toda la noche, se picaron las colonias transformantes y se crecieron toda la noche a 37°C en medio LB con los mismos antibióticos. Posteriormente, se realizó una miniprep casera (ver apéndice de métodos) para aislar el DNA plasmídico de estas células. Se corroboró por PCR que la fusión entre el promotor de *AGL19* y *GUS* se hubiera efectuado, usando combinaciones de oligonucleótidos endógenos y de m13 del plásmido. Se usaron los plásmidos verificados para transformar *A. tumefaciens* por electroporación y se confirmó la transformación por resistencia a km, am y rf (50 µg/ml).

#### *Ensayos de expresión transitoria en tabaco (Nicotiana benthamiana)*

Los plásmidos pAO9, p19TOPO4.2 y p19TOPO10.1 se probaron en un ensayo de expresión transitoria en hojas de tabaco. Se siguió el protocolo de Voinnety y colaboradores (2003) con algunas modificaciones: no se usó acetosiringona, la relación entre el plásmido de interés y el plásmido p19 (supresor del silenciamiento) se midió empíricamente y fue de aproximadamente 1:10 (ver apéndice de métodos). La expresión de GUS se evaluó después de dejar las hojas en solución de X-Gluc con ferro y ferricianuro toda la noche. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con una solución de acetona y metanol (ver apéndice de métodos) para desteñir las hojas y poderlas observar al microscopio estereoscópico.

#### *Transformación de plantas de A. thaliana*

Con las tres clonas del promotor completo, se llevó a cabo la transformación de plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Columbia. Se transformaron, en promedio, 30 plantas por cada clona. Para esto, se sembraron directamente en tierra las semillas esterilizadas y estratificadas por 3 días a 4°C. Cuando las plantas comenzaron a producir escapos, estos se cortaron para promover la ramificación y, justo antes de la transformación, se podaron todas las flores abiertas, de modo que sólo quedaran botones cerrados. La transformación se llevó a cabo embebiendo las plantas en cultivos líquidos de *Agrobacterium tumefaciens* y aplicando vacío (ver protocolo completo en apéndice).

A la par, se transformaron plantas de la línea mutante *clf* con clonas de los plásmidos pAO8 y pAO9, previamente verificados. Se transformaron 15 plantas por cada clona y se aplicó el mismo protocolo mencionado arriba.

#### *Selección de plantas transformantes*

Se recogieron todas las semillas generadas de plantas tratadas con agrobacterios y se sembraron en medio Murashige-Skoog (MS) 0.2X al 1% de agar y 1% de sacarosa más kanamicina para seleccionar plantas transgénicas a una concentración de 50 µg/ml. Se usaron las condiciones estándar de crecimiento.

## **Generación y evaluación de un anticuerpo $\alpha$ -XAL2/AGL19**

### **Generación del anticuerpo $\alpha$ -XAL2/AGL19**

#### *Elección del antígeno*

En el laboratorio se contaba con el siguiente péptido:

IGPPETRHFKKFPPSN

[Figura 7. Péptido de la proteína XAL2 usado como antígeno.]

Este péptido constituye los últimos 16 aminoácidos de la proteína XAL2 (AGL14) y tiene un 81% de identidad con los últimos 16 aminoácidos de AGL19, proteína con la que guarda un mayor porcentaje de identidad; según se ve en la figura 8.

XAL2 - RISSSSSTSELDIDDNEMEVVTDLFIGPPETRHFKKFPPSN

AGL19 – **SSQSTLSSSEVN**IDDN-MEV**ETG**LFIGPPETR**QSKKFP**Q**N**

[Figura 8. Comparación entre el péptido de la proteína XAL2 utilizado y la secuencia homóloga en la proteína AGL19. Se resaltan los aminoácidos no conservados.]

Se generó un conjugado entre el péptido y ovoalbúmina por medio de los enlaces épsilon-amino de las lisinas en el péptido. Esta reacción se llevó a cabo por el Dr. Rodolfo Carreón (FES Zaragoza, UNAM), siguiendo el método de Bergman y colaboradores (1935) y Rubini y colaboradores (1953).

#### *Generación del anticuerpo*

La generación del anticuerpo fue llevada a cabo por Dr. Rubén Marroquín Segura (FES Zaragoza, UNAM). A 38 ratones cepa CD1 de 24 semanas de edad se les inyectaron las soluciones con adyuvante

en la base de la cola. Luego del esquema de inmunización presentado en la Tabla 2, se extrajo el suero de los ratones, se purificó la fracción de IgG por centrifugación y doble diálisis, y finalmente se realizó una reacción de inmunoadsorción contra ovoalbúmina para purificar aún más el anticuerpo.

[Tabla 2. Esquema de inmunización. En cada inyección se usaron 2 ml de la mezcla del conjugado y el adyuvante.]

<b>Día</b>	<b>Conjugado (µg)</b>	<b>Adyuvante</b>
0	30	Freund completo (0.1 ml)
15	30	Freund incompleto (0.1ml)
35	15	Solución salina 0.85% (0.1 ml)
40	15	Solución salina 0.85% (0.1 ml)
45	Sangrado	-

### ***Evaluación del anticuerpo $\alpha$ -XAL2/AGL19***

#### *Ensayo de Dot-Blot*

Una vez obtenido el anticuerpo contra el conjugado péptido+ovoalbúmina, se llevó a cabo un *dot-blot* contra diferentes péptidos y se corroboró si existía afinidad por el antígeno usado. Los péptidos usados fueron fragmentos de XAL1, XAL2 y aquel que se usó como antígeno para producir el anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19. Se usó como control negativo albúmina. Ver el protocolo completo en el apéndice de métodos.

#### *Ensayos de Western-Blot*

Como ensayo preliminar, se revelaron membranas ya transferidas con extractos nucleares realizados por la Dra. Paola Rojas. Las líneas presentes eran la silvestre y la sobreexpresora de *XAL1* (*AGL12*) (35S::*AGL12*), cada una con más de 3 µg de proteína. La membrana se bloqueó con 3% de leche, se incubó con el anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19 a una dilución 1:250, a 1:1000 con el anticuerpo  $\alpha$ -IgG de ratón-HRP, y posteriormente se dejó reaccionar por 5 minutos con peróxido de hidrógeno, se puso con

el film para su exposición por más de 10 minutos y luego se utilizó revelador y fijador para ver las bandas de proteínas. Con las mismas condiciones de bloqueo, se volvió a incubar la membrana. Esta vez se agregó 1 µg del conjugado OVA+péptido-XAL2/AGL19 como control positivo. La dilución del anticuerpo primario fue de 1:250 y la del secundario 1:500. Se dejó reaccionar la membrana por 5 minutos y revelar por 10 minutos. Puesto que no hubo reacción, se repitió el experimento anterior con la única variante de que el tiempo de exposición fue de 3 días.

También se llevó a cabo un experimento con plantas mutantes de pérdida de función y de sobreexpresión. Las líneas utilizadas fueron la de tipo silvestre (Col), las mutantes: *xal2* (pérdida de función de *XAL2*), *agl19*, *xal2/agl19*, y las líneas de sobreexpresión: *35S:AGL19* y *35S:XAL2* (sobreexpresora de *XAL2*). Se extrajeron proteínas totales de raíces de 11 dps (excepto en *35S:AGL19* y *35S:XAL2*, en las que también se incluyó tejido aéreo en búsqueda de mayor presencia de la proteína blanco). En un gel de acrilamida al 40%, se corrieron 150 µg de extractos totales de cada línea por 1 hora y media a 125 V. Luego, se traspasaron las proteínas a la membrana, previa verificación de la presencia de éstas en el gel con azul de bromoetileno, a la membrana de nitrocelulosa con una resistencia de 130mA y un voltaje de 13-15 V por 3 horas. La tinción de la membrana con rojo de Ponceau reveló la presencia de proteínas y la conservación del patrón de bandas. Se bloqueó la membrana con leche al 5% por una hora. Luego, se incubó con el anticuerpo α-XAL2/AGL19 a una dilución de 1:250 toda la noche y con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:1000 por una hora. Se dejó reaccionar la membrana por 5 minutos y el film se expuso por 15 minutos antes de revelarlo. Posteriormente, se hibridó una vez más la misma membrana, con las mismas condiciones de incubación. Sólo se varió el tiempo de exposición, que fue de 3 días.

Para aumentar las probabilidades de interacción del anticuerpo α-XAL2/AGL19 con su proteína blanco, se añadió urea 6M a nuevos extractos de proteína de las líneas silvestre, *35S:XAL2* y *35S:AGL19*, todas de parte aérea. Se preparó y se corrió el gel de acrilamida con las mismas condiciones que en el experimento anterior, sólo que se agregó urea 6M en el buffer de corrida. La hibridación de la membrana se llevó a cabo con un bloqueo de leche 5% por una hora, una dilución del anticuerpo primario a 1:250 y del anticuerpo secundario a 1:1000. El tiempo de reacción fue de 5 minutos con peróxido de hidrógeno, luego se expuso por 4 horas 30 minutos antes de revelarlo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo presenta los resultados de dos series de experimentos sobre el papel de *AGL19* en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. Una serie consiste en experimentos sobre el papel de *AGL19* como *regulador* del desarrollo radical (sección I, VII), mientras que la segunda serie abarca experimentos relacionados con la regulación genética *sobre* *AGL19* (sección II-VI). Los resultados no se presentan en el orden cronológico en el que se realizaron. La razón de haber realizado dos series de experimentos con objetivos aparentemente disímiles se discute a continuación.

### Las líneas mutantes de pérdida de función de *AGL19*

Los objetivos iniciales de este proyecto contemplaban utilizar la línea mutante de pérdida de función *agl19-234* (0) y las cruzas dobles mutantes (realizadas por Mario Pacheco Escobedo) que se habían generado con ella para explicar la hipotética función dual de este gen en el desarrollo radical. Cuando la mutante de pérdida de función se encontraba sola parecía un promotor del crecimiento mientras que cuando estaba con otros genes MADS se comportaba como un represor del crecimiento. Los experimentos de expresión de genes MADS (sección VI) en fondos mutantes MADS utilizaron esas líneas más una línea triple mutante (*xal1 xal2 agl19*). De igual modo, las pruebas con el anticuerpo anti-XAL2/*AGL19* (sección VII) también corresponden a ese objetivo inicial.

Sin embargo, en las plantas de *agl19-234* (0) se observaba que, a pesar de que sus raíces primarias eran más cortas que las silvestres, como era lo esperado, también se observaba que crecían con cierta inclinación, fenotipo que se llama *slanting* (Rutherford y Masson, 1996). Este rasgo se perdió en las cruzas con otros fondos mutantes de genes MADS, lo cual llevó a la sospecha o bien de que el fenotipo se corrigiera por la ausencia del otro gen MADS o bien a que el *slanting* se debiera a una segunda mutación desconocida y que durante las cruzas ésta hubiese segregado. Evidencias posteriores apuntaron a esta segunda hipótesis. Por ejemplo, el hecho de que las cruzas dobles y la triple, que pierden el fenotipo de *slanting*, se seleccionaran a través de genotipificaciones y no basándose en el *slanting*. David Cruz García llevó a cabo dos retrocruzas de *agl19-234* para confirmar esta idea, en la suposición de que al menos dos retrocruzas bastarían para segregar la hipotética segunda mutación. Para caracterizar las funciones de *AGL19*, en este proyecto se utilizó el mutante *agl19-234* después de

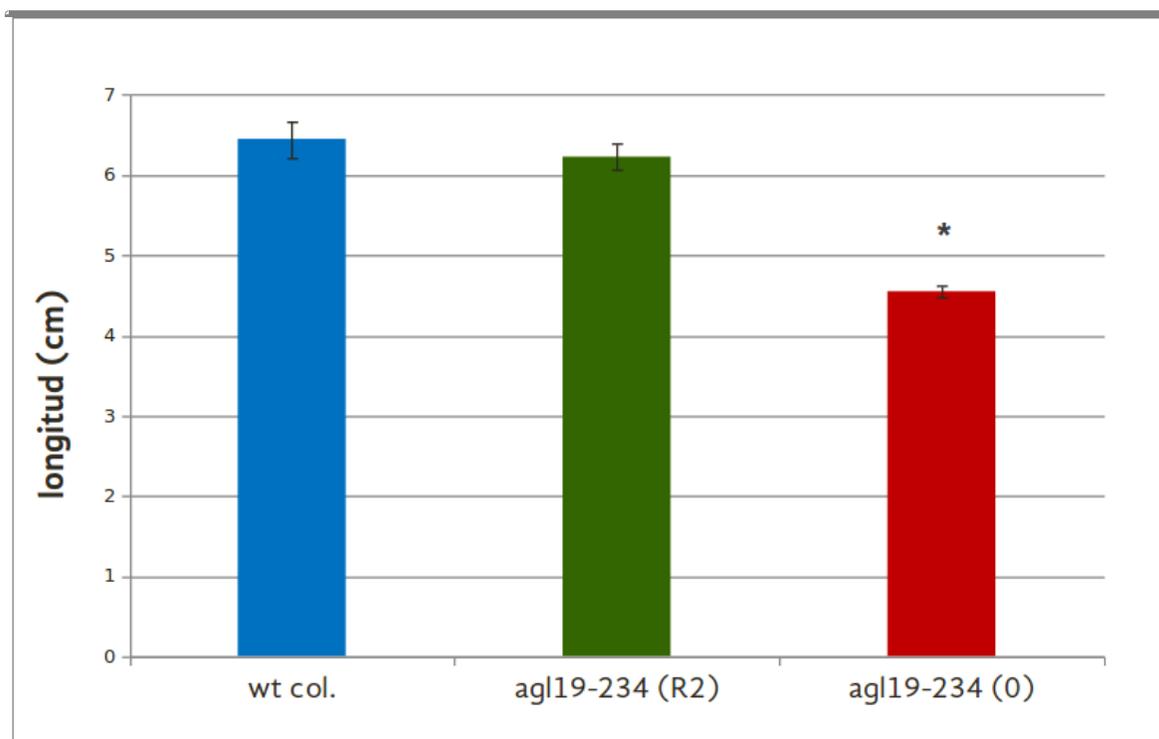
la segunda retrocruza (nombrada como *agl19-234* R2), la cual es nula ya que no expresa el RNA mensajero de AGL19 (Cruz García, com. personal.). En este momento, el laboratorio de GeMoDEvo ya cuenta con la tercera retrocruza, pero no ha sido caracterizada.

Las implicaciones de una hipotética segunda mutación en los experimentos de expresión relativa de genes MADS en fondos mutantes MADS son poco mensurables. Si efectivamente la mutación segregó en las cruzas que se llevaron a cabo para obtener dobles mutantes, es posible que este hecho explique la discordancia entre algunos datos de expresión en la mutante sencilla de *AGL19* y la expresión en las líneas dobles mutantes. Sin embargo, puesto que no se puede tener certeza de que la segunda mutación tuviera efecto en la expresión de esos genes aun en la mutante sencilla, sería ideal repetir este experimento una vez que se tengan las cruzas dobles con la segunda retrocruza de *agl19-234*.

## **I. Caracterización de la línea mutante *agl19-234* (R2)**

### **Longitud de raíces**

El objetivo de este experimento fue determinar si existen diferencias significativas en la longitud de las raíces de la línea mutante de pérdida de función *agl19-234* (R2) en comparación con las raíces de la línea silvestre (*wt*). Se incluyó a la línea mutante *agl19-234* (0) como control positivo. La prueba de *t* de Student determinó que no había diferencias significativas entre la línea silvestre y *agl19-234* (R2) en contraste con la línea mutante *agl19-234* (0) en donde sí se vio el fenotipo de raíz corta que había mostrado en experimentos anteriores. En la figura 9 se observan los resultados de este experimento.



[Figura 9. Gráfica comparativa de las longitudes (en cm) de las raíces de las líneas silvestre y la línea mutante de pérdida de función de *AGL19* antes y después de dos retrocruzas. Nótese la diferencia de longitud entre la línea retrocruzada (R2) y la no retrocruzada (0). Con un \* se marca las diferencias significativas respecto a la línea silvestre ( $p=0.05$ ).]

Después de dos retrocruzas, la línea *agl19-234* parece haber perdido el fenotipo de raíz corta. Este resultado podría apuntar a que este gen no tiene un papel relevante en el desarrollo de la raíz. Sin embargo, datos previos generados en el laboratorio con otra línea de pérdida de función de *AGL19* (generada con transposón, sin retrocruzar), mostraban el mismo fenotipo de raíz corta que con la primera mutación que se usó en este trabajo y sugieren un papel de este gen en el desarrollo de raíz. Esta línea de pérdida de función no es estable por lo que no se utilizó para estudios posteriores. Por otro lado, las cruzas de la línea *agl19-234* (0) realizadas en el laboratorio con mutantes de pérdida de función de otros genes MADS, específicamente *XAL1*, *XAL2* y *AGL17*, muestran fenotipos con longitudes de raíz primaria diferentes a las de las mutantes sencillas de los otros genes MADS (como se muestra en los antecedentes), de modo que la ausencia de *AGL19* debe tener algún efecto en las mutantes dobles. Además, como se mencionó arriba, es muy probable que la mutación desconocida haya segregado durante la generación de las cruzas, puesto que las líneas homocigóticas se

seleccionaban por genotipificación y no por observación de fenotipo. Si esto fuera cierto, las primeras generaciones de las cruzas perderían el fenotipo de slanting, y eso es lo que se observó en el laboratorio de GeMoDEvo (Mario Pacheco Escobedo, com. personal). En este caso, se puede considerar a las cruzas dobles como equivalentes en segregación a una retrocruza.

En las dobles mutantes de otros genes MADS con *AGL19* se observa un cambio en la longitud de la raíz primaria con respecto a las mutantes sencillas del otro gen MADS, lo cual sugiere un papel relevante de *AGL19* en la homeostasis del crecimiento de la raíz. Por otro lado, se habían hecho observaciones en nuestro laboratorio de que los fenotipos de mutantes con raíces primarias más largas que las de la planta silvestre eran difíciles de reproducir. Este comportamiento lo habíamos visto con mutantes de *AGL17*. *AGL17* parecería ser un represor del crecimiento de la raíz, pero este fenotipo de raíz larga no es estable en las diferentes condiciones de crecimiento en las que se ha probado. Sin embargo, cruzas con otros genes MADS muestran un papel fundamental como represor del crecimiento (igual que *AGL19*). Además, un análisis celular más fino de los meristemas apicales de *AGL17* muestra que existen diferencias en las tasas de producción celular que son compensadas por la tasa de crecimiento celular (Mario Pacheco Escobedo, datos sin publicar) por lo cual el tamaño de la raíz principal cambia poco y depende de las condiciones de crecimiento. Siguiendo esta línea de razonamiento, se planteó un experimento para analizar las diferencias en parámetros de crecimiento y producción celular entre las mutantes *agl19-234* (R2) y las plantas silvestres.

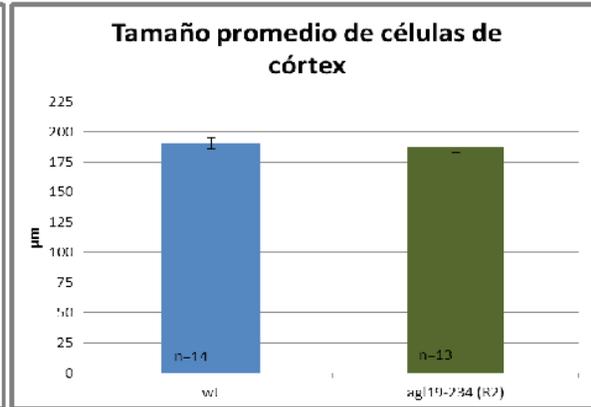
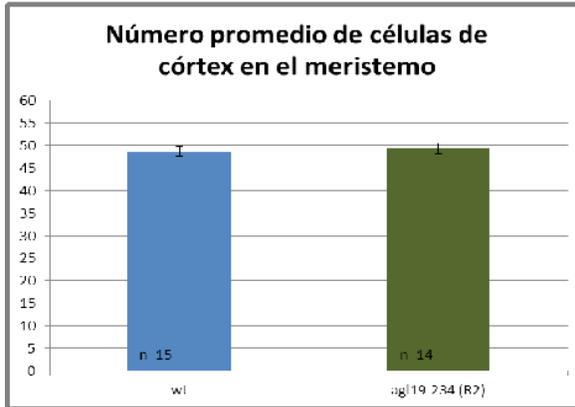
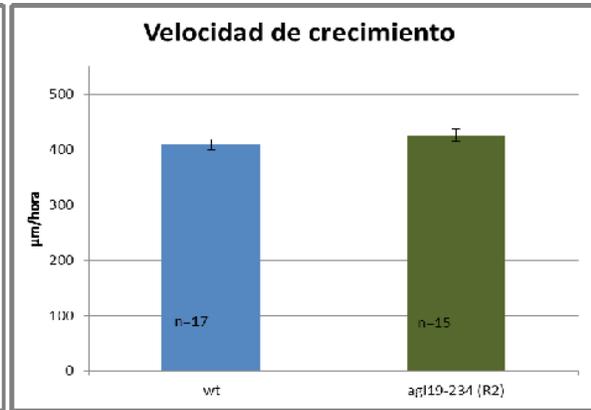
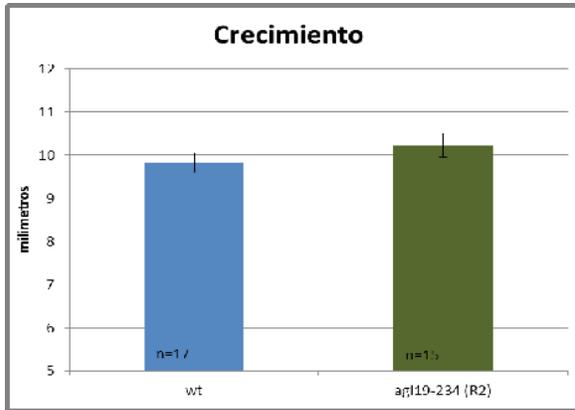
### **Análisis de la dinámica celular del meristemo apical radical**

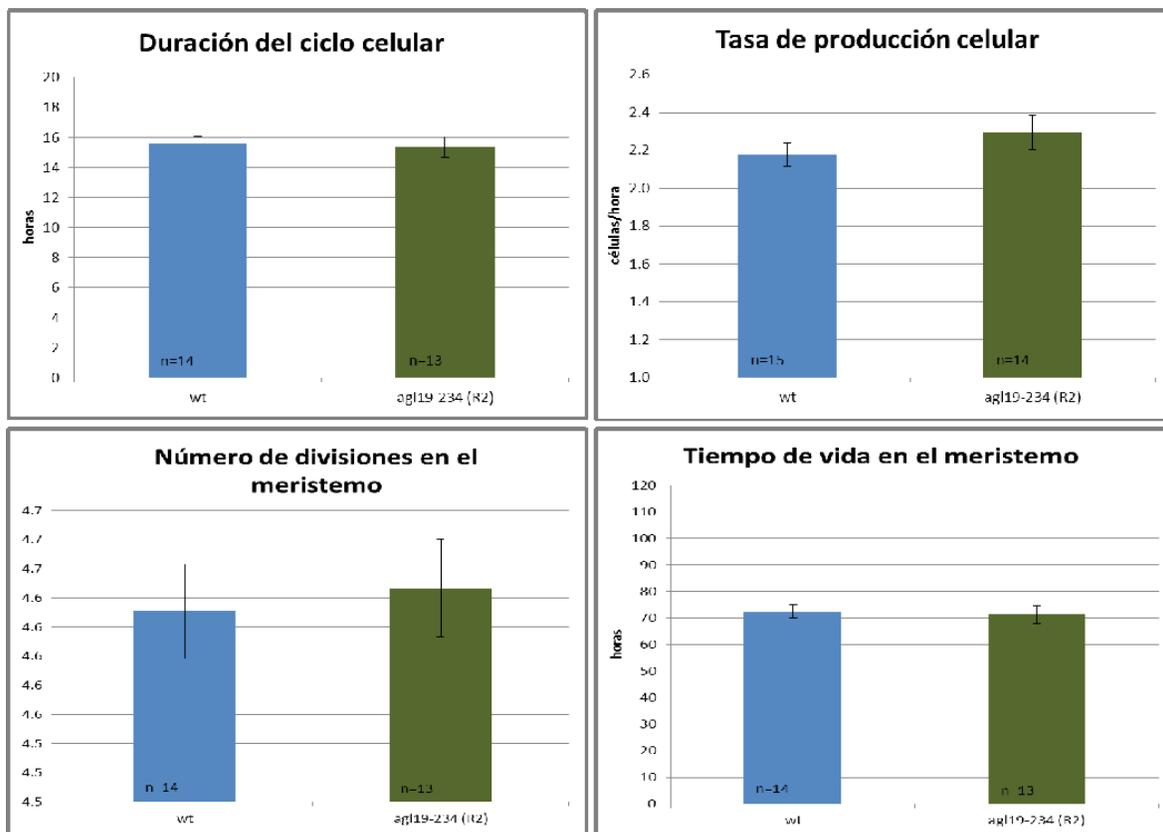
El objetivo de este experimento era determinar si existen diferencias significativas entre la línea mutante *agl19-234* (R2) y la línea silvestre en los parámetros de tasas de crecimiento y producción celular. Los resultados que arrojan las observaciones y mediciones al microscopio nos hablan de un nulo, si acaso pequeño papel de *AGL19* en la regulación de la homeostasis celular del meristemo radical. En la figura 10 se muestran los datos observados y en la tabla 3 se presenta un resumen del hallazgo de diferencias significativas en todos los parámetros analizados utilizando la prueba estadística de t de Student.

[Tabla 3. Resumen de los parámetros celulares comparados, número de individuos comparados y la presencia de diferencias significativas entre la planta silvestre (n= 17) y la mutante de pérdida de función *agl19-234* (R2) (n= 15). ]

<b>Parámetro celular</b>	<b>¿Diferencia significativa? (p=0.01)</b>	<b>Parámetro celular</b>	<b>¿Diferencia significativa? (p=0.01)</b>
Crecimiento, del día 6 al 7	No	Duración del ciclo celular	No
Velocidad de crecimiento	No	Producción celular	No
Número promedio de células en meristemo	No	Número de divisiones en meristemo	No
Tamaño promedio de células diferenciadas de córtex	No	Tiempo de vida en meristemo	No

Como se puede observar en la Tabla 3, ningún parámetro celular mostró diferencias significativas entre la línea mutante *agl19-234* (R2) y la silvestre y tampoco se observaron características fenotípicas discretas y notablemente diferentes en los meristemos de ésta línea mutante con respecto a los meristemos de las plantas silvestres. Una observación que nos parece importante mostrar es que tanto en la línea silvestre como en la retrocruzada (R2) (Figura 11), había presencia de





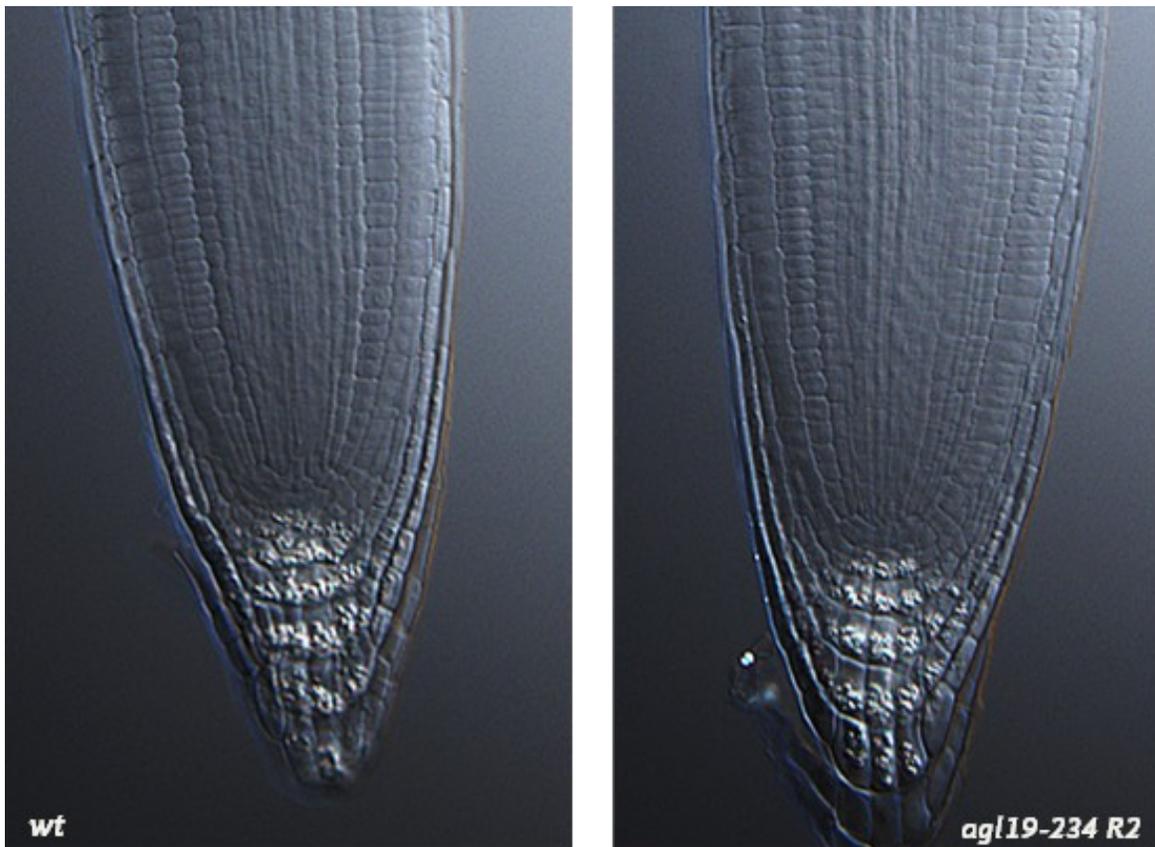
[Figura 10 (página anterior). Gráficas de los parámetros celulares analizados en los meristemos de las líneas silvestre (*wt*) y *agl19-234* (R2). En la barra de cada conjunto de datos se muestra el número de individuos analizados. Las barras de error representan el error estándar.]

desarreglos en el NCT; por ejemplo, el centro quiescente no muestra su conformación regular. Sin embargo no se tomaron datos de los porcentajes de las raíces con meristemos desarreglados en el momento de la observación ya que no era el objetivo de la misma. Las raíces analizadas tenían 7 dps y en el laboratorio se hicieron observaciones de desarreglos del nicho en raíces de esta edad (Garay-Arroyo y Zluhan, com. personal) y se sugiere que las observaciones del NCT sean máximo a los 4dps.

Esta ausencia de efecto de la mutación puede explicarse por dos causas. La primera es que *AGL19* no esté involucrado en absoluto con el desarrollo de la raíz. La segunda es que tenga funciones redundantes con otros genes MADS, de modo que sus efectos sólo se observen en líneas de cruza dobles e incluso triples mutantes. Las cruza generadas en nuestro laboratorio apoyarían la segunda hipótesis. Si bien no hay completa certeza de que el fenotipo de la cruza se deba sólo a *AGL19* y no a la

segunda mutación desconocida, existe cierto grado de seguridad por los motivos mencionados en los párrafos anteriores. Sumado a esto, el hecho de que la mayor expresión de *AGL19* sea en la raíz de la planta (datos no publicados del laboratorio; Ochoa-Espinosa, 2002; Schönrock *et al.*, 2006) y que en experimentos de hibridación *in situ* se haya observado transcrito en los tejidos de la raíz (Cerón, 2012) sugiere que *AGL19* podría tener un papel en dicho órgano.

Tomando en cuenta estos datos, decidimos seguir analizando el papel del gen *AGL19* en la raíz, aunque se da por descontado que se necesitan realizar de nuevo las cruces con la línea *agl19-234* retrocruzada para obtener dobles y triples mutantes con otros genes MADS y despejar cualquier duda sobre el efecto de *AGL19* en la longitud de la raíz. A la par, se podrían caracterizar otros alelos de pérdida de función para este gen, preferentemente después de retrocruzarlos. Si bien contar con esas caracterizaciones sería muy valioso para este proyecto, las limitantes de tiempo impidieron que esas actividades se plantearan como objetivos. En su lugar, se decidió trabajar con la regulación transcripcional y proteica de *AGL19* tomando como punto de partida el hecho de que existe regulación epigenética sobre su primer intrón en la parte aérea (Schönrock *et al.*, 2006; Turck *et al.*, 2007). Las secciones II-VI, presentadas a continuación, son experimentos relacionados con la regulación genética sobre *AGL19*.



[Figura 11. Fotografías al microscopio óptico con iluminación Nomarski. Se observan los meristemos apicales de raíces de la línea silvestre y la línea mutante *agl19-234* (R2). Se observa desarreglo en el NCT en ambas raíces.]

## II. Análisis de regiones reguladoras de *AGL19*

El análisis de las regiones reguladoras mostró que tanto las secuencias codificantes como las reguladoras del locus de *AGL19* presentan motivos de regulación para proteínas MADS y para auxinas (AuxRE), así como marcas de metilación y sitios de unión para LHP1. Con las bases de datos en línea PLACE y de microarreglos (*Higo et al., 1999; Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b*) que ofrecen información sobre sitios predichos de marcaje epigenético y de unión al DNA por proteínas reguladoras se encontraron ocho motivos canónicos CArG (CCW<sub>6</sub>GG) y uno no canónico (CW<sub>10</sub>G). Seis de ellos caen en la región comprendida entre el ATG de *AGL19* y el final del UTR del gen inmediato río arriba (dos de ellos están muy cercanos el uno del otro y se observan como una sola línea en la Figura 12), mientras que los tres restantes se ubican en el primer intrón. Por su parte, se encontraron dos motivos

AuxRE, uno cercano a la caja TATA, río arriba del inicio de la transcripción, y otro en el primer intrón (ver Figura 12).

Por su parte, el análisis *in silico* también mostró sitios predichos para marcaje con H3K27me3 concentrados principalmente en el primer exón y el primer intrón de *AGL19*, y en la región comprendida entre el segundo exón y la mitad del cuarto intrón. Los sitios de unión predichos para la proteína LHP1 se concentran en el exón comprendido entre el tercer y cuarto intrón.

La ubicación detallada de los motivos y las marcas cromatínicas, así como las secuencias se observan en la Figura 12 y la tabla 4.



[Figura 12. Motivos de regulación encontrados en el locus de *AGL19*, basándose en las bases de datos PLACE y de microarreglos (Higo *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2007b). Con el signo \* se marcan las cajas CArG canónicas (CCW6GG), con el signo + las cajas no canónicas encontradas (CW10G), con el signo ° las cajas de respuesta a auxinas y con ^ la caja TATA, contigua al sitio de inicio de la transcripción; debajo del esquema del gen, se muestra en gris las marcas de metilación H3K27me3 predichas y en azul los sitios de unión de LHP1 encontrados experimentalmente.]

[Tabla 4. Ubicación y secuencia de los motivos de regulación en el locus de *AGL19*. Los pares de bases se cuentan a partir del sitio de inicio de la transcripción de *AGL19*.]

<b>Motivo</b>	<b>Reconocido</b>	<b>Pb</b>
<b>por</b>		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	133
G		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	689
G		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	1338
G		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	1399
G		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	1405
G		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	1699
G		
TGTCTC	AuxRE	2636
TATA	Inicio	2666
transcripción		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	3061
G		
CCW <sub>6</sub> G	MADS	3384
G		
CW <sub>10</sub> G	MADS	3496
TGTCTC	AuxRE	4218

El análisis de las regiones reguladoras del locus *AGL19* revela que este gen podría estar regulado por proteínas MADS o por una ruta de regulación dependiente de auxina. También sugiere que podría estar regulado negativamente por LHP1, tal como se ha demostrado que ocurre con CLF (Schonrock *et al.*, 2006). Sin embargo, para saber si la interacción entre estos motivos de regulación y sus reguladores proteicos realmente ocurre, habría que plantear experimentos que aborden la interacción directa por medio de técnicas como ChIP o de retardo de movilidad en gel.

Por otro lado, el análisis de las regiones reguladoras plantea preguntas interesantes cuando se le

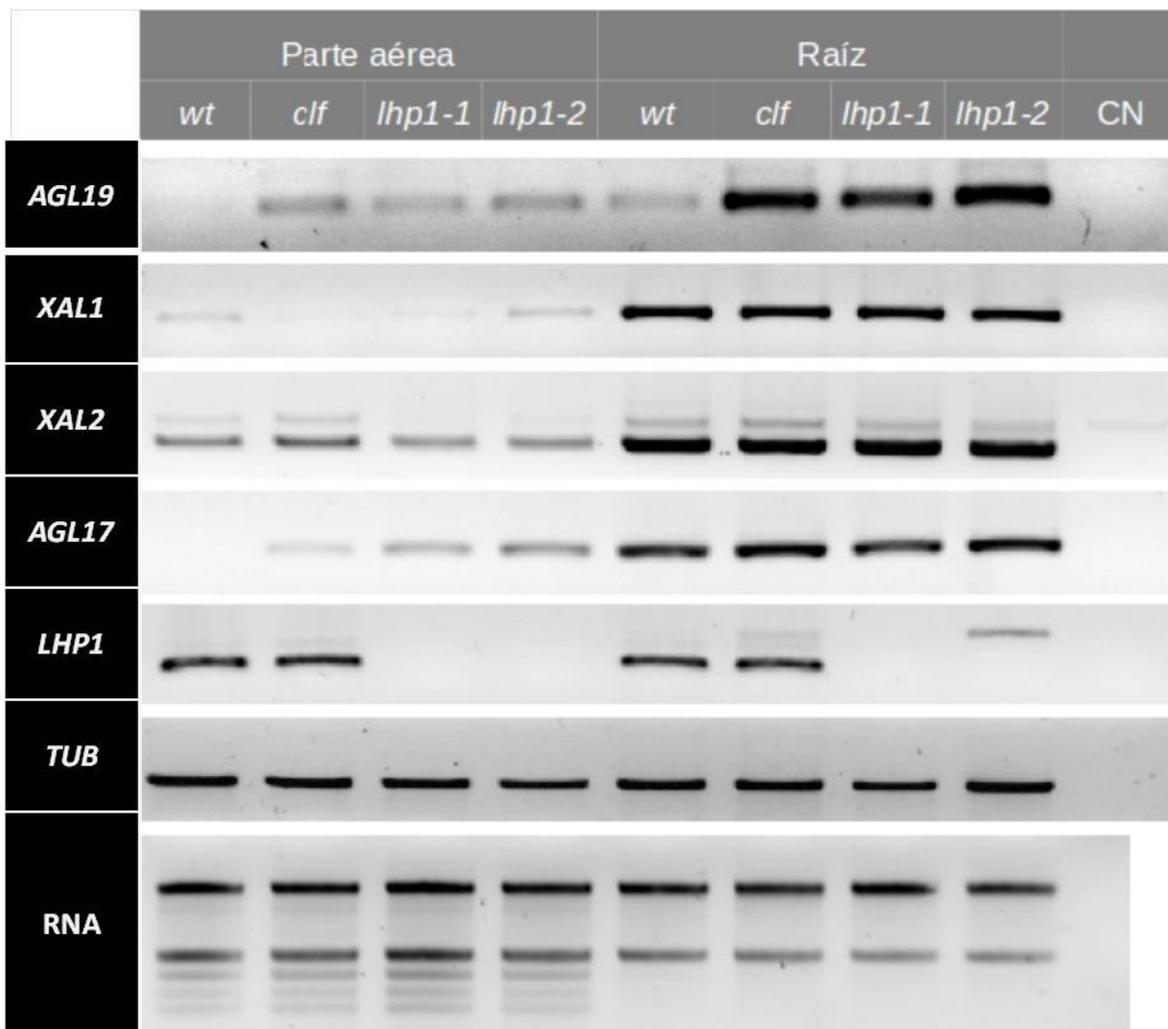
compara con los análisis de presencia de transcrito y con los resultados de las líneas transgénicas. Por un lado, los análisis de hibridación de RNA *in situ* muestran que el transcrito de *AGL19* se puede encontrar a todo lo largo de la raíz, excepto en la columela y la cofia lateral (Cerón, 2012). Esto contrasta con los primeros resultados de las líneas transgénicas que contienen sólo el promotor mínimo y el primer intrón fusionados al reportero GUS, pues estas líneas muestran que esas regiones reguladoras no pueden recuperar la expresión observada en las hibridaciones *in situ*. En esas líneas, *AGL19* se expresa en la columela y la cofia lateral y la explicación más simple a esta contradicción es que en las otras regiones encargadas de regular la expresión de este gen a todo lo largo de la raíz se encuentran secuencias represoras de la inducción en columela y cofia lateral que no se encuentran en la construcción mínima. Por otro lado, los análisis de hibridación de RNA *in situ* muestran expresión en otros lados de la raíz lo cual sugiere que, cuando se encuentran presentes todas las regiones reguladoras, hay motivos de regulación positiva que amplían el dominio de expresión del gen.

### **III. Expresión de *AGL19* en mutantes de genes del grupo Polycomb**

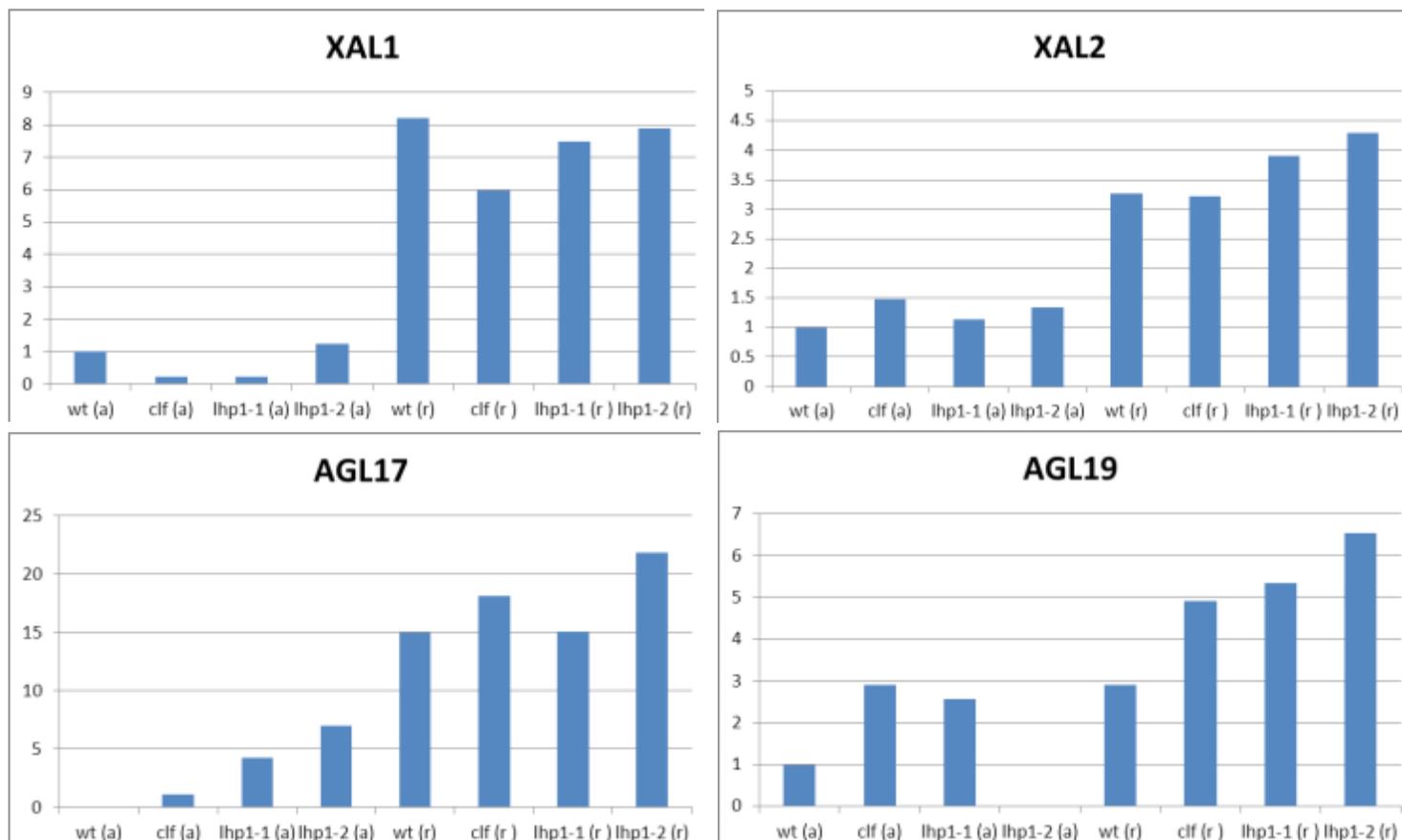
Para este experimento, se tomaron como antecedentes los reportes de que las proteínas del grupo Polycomb, encargadas de colocar marcas de represión en la cromatina, actuaban en el locus de *AGL19* (Schönrock *et al.*, 2006; Turck *et al.*, 2007). En el laboratorio se contaban con líneas mutantes de pérdida de función de *CLF* y *LHP1*, así que se diseñaron experimentos de expresión relativa de *AGL19* en estas líneas.

El objetivo de este experimento era probar si la represión transcripcional generada por las proteínas PcG en el locus de *AGL19* se observa tanto en raíz como en la parte aérea, donde ya está demostrada (Schönrock *et al.*, 2006). Dado que la expresión de *AGL19* es mayor en la raíz que en ningún otro órgano, una hipótesis es que ese aumento de expresión se deba a que no hay represión transcripcional por los complejos *Polycomb*. Si esto es cierto, se debería observar que la expresión de *AGL19* en raíces silvestres es igual a la expresión en las raíces de las mutantes de pérdida de función de *CLF* y *LHP1*.

En la figura 13 se observan los resultados de las PCR semicuantitativas de plantas a 7 dps.



[Figura 13. RT-PCR semicuantitativas en fondos mutantes de pérdida de función de genes PcG. Se calibraron a la par parte aérea y raíz. Las bandas de *CLF*, que mostrarían la nulidad del fondo mutante *clf* no son mostradas debido a que no se pudo obtener una imagen homogénea con los oligonucleótidos utilizados en este experimento.]



[Figura 14 Intensidades relativas normalizadas con tubulina.

La banda de la línea silvestre (wt) de la parte aérea de *AGL17* no pudo medirse con el software Kodak MI ya que era indetectable, así que se tomó la intensidad de la banda de *clf* como base para normalizar.]

En las Figuras 13 y 14 se observa que *AGL19* en la parte aérea aumenta su expresión en las mutantes de PcG. De manera inesperada e interesante, ese aumento también se observa en la raíz y parece ser más pronunciado.

Resultaba de interés analizar la expresión de los otros tres genes MADS involucrados en la regulación del desarrollo de la raíz (*XAL1*, *XAL2* y *AGL17*) para saber si también son regulados por estos complejos. Esa información nos hablaría de qué tan distintas son las vías de regulación para genes

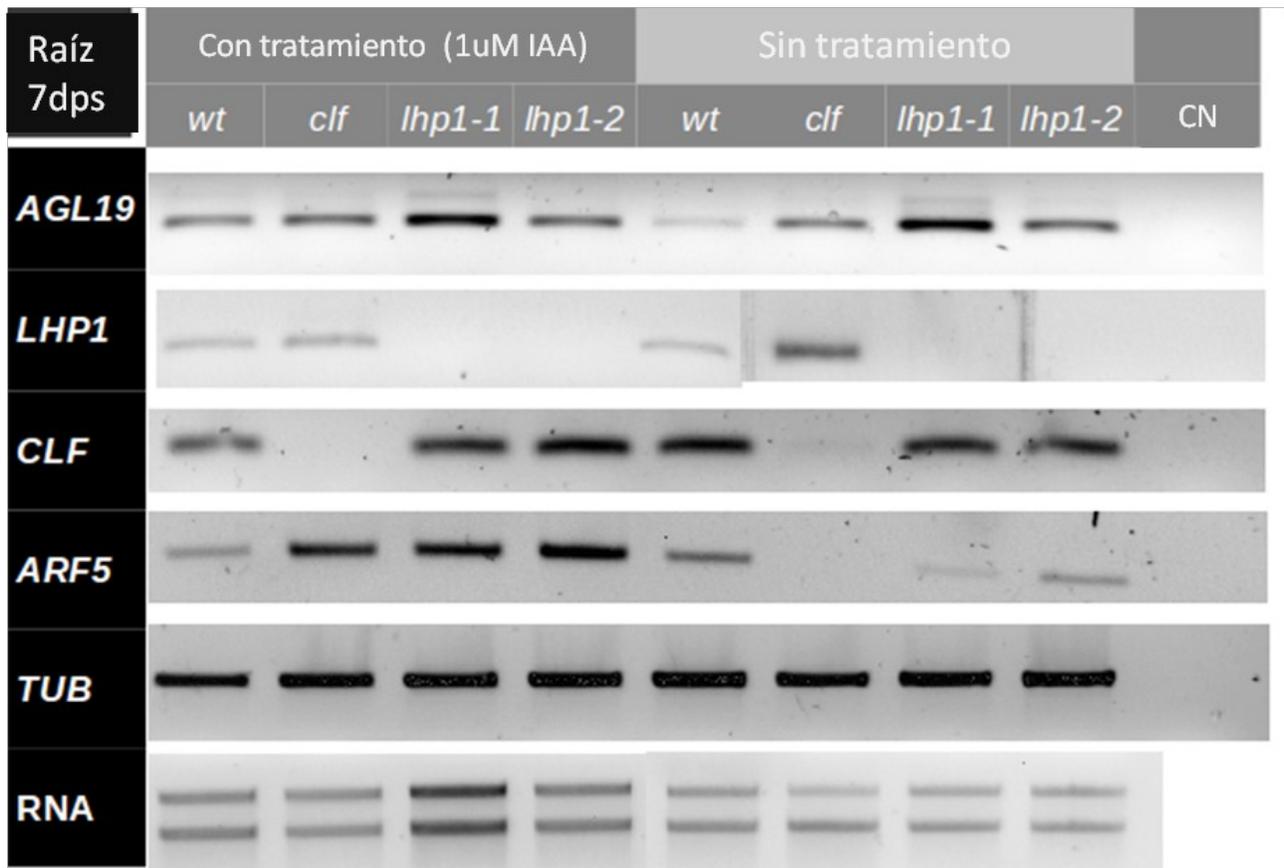
relacionados filogenéticamente (por ejemplo, entre *AGL19* y *XAL2*, que son genes hermanos [Álvarez-Buylla, *et al.*, 2000]) y con dominios de expresión similares.

Interesantemente, los otros genes MADS no aumentan de la misma forma su expresión en los fondos mutantes. En la parte aérea, la expresión de *XAL1* disminuye en los fondos *clf* y *lhp1-1* y la expresión de *XAL2* también disminuye en los fondos nulos de *LHP1*. Esto sugeriría que *CLF* y *LHP1* participan en la regulación positiva de *XAL1*, mientras que *LHP* participa en la de *XAL2* en la parte aérea. Puesto que las marcas epigenéticas asociadas a *CLF* y *LHP1* son de represión, eso significa que probablemente reprimen a un represor de ambos genes MADS. Por otro lado, la expresión de *AGL17* aumenta en los fondos *clf*, *lhp1-1* y *lhp1-2* y la baja expresión en la línea silvestre se corresponde con los reportes de una expresión casi nula en parte aérea. En la raíz, ninguno de estos tres genes MADS modifica sensiblemente su expresión en los mutantes de genes PcG. Estos datos indicarían vías de regulación distintas para distintos genes MADS del desarrollo de la raíz. Por un lado, *XAL1*, *XAL2* y *AGL17* parecen estar regulados por *CLF* y *LHP1* sólo en la parte aérea, pues no modifican su expresión en la raíz. Se podría hipotetizar que la baja expresión de *AGL17* en las partes aéreas de la planta se debe a la represión transcripcional de los complejos Polycomb y que éstos no lo reprimen en la raíz. Esto concordaría también con reportes previos que muestran que, a pesar de tener la marca H3K27me3, este gen no modifica su expresión en la raíz a los 7 dps en comparación con la parte aérea (Aichinger *et al.*, 2011). En contraste, *AGL19* modifica su expresión tanto en la parte aérea como en la raíz. Este dato sugiere que los complejos Polycomb están actuando para reprimir a *AGL19* en ambas partes de la plántula. Esto apunta a que los complejos Polycomb no son los principales responsables de la represión de *AGL19* en la parte aérea, sino que su acción debe estar ayudada por algún factor que no se encuentra en la raíz.

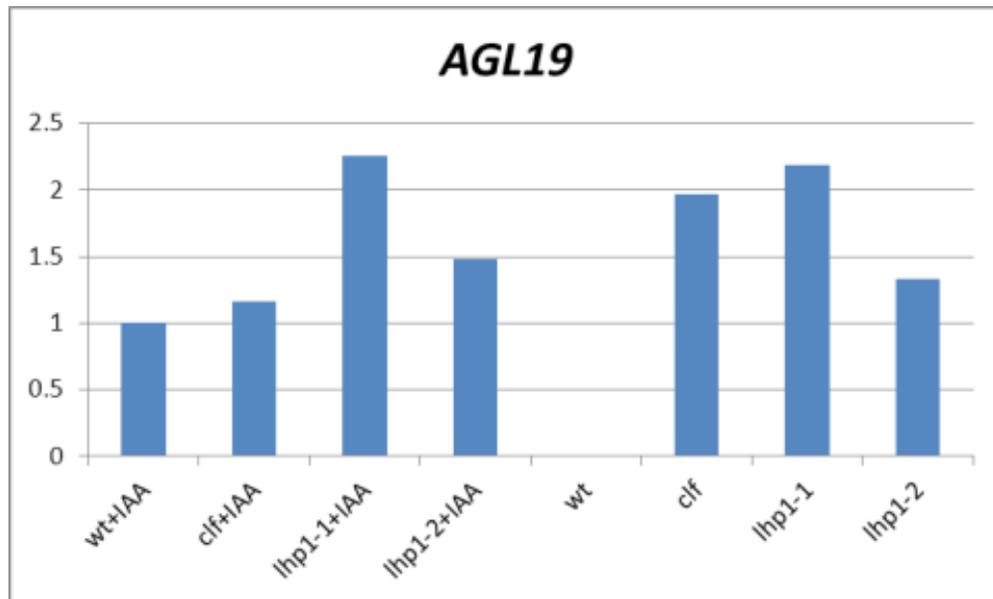
Como se menciona en la introducción, algunos genes de los complejos Polycomb actúan sobre genes relacionados con la síntesis y regulación de la hormona auxina, la cual a su vez es un importante regulador de genes del desarrollo. Particularmente, se ha encontrado que dos genes MADS-box *XAL1* y *XAL2* involucrados en el desarrollo de la raíz, se inducen por auxinas (Tapia-López *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Para dilucidar si vía de regulación que lleva a los complejos Polycomb a reprimir a *AGL19* en la raíz está involucrada con la vía de regulación por auxinas, se realizó un experimento de tratamiento con esta hormona utilizando las mutantes de pérdida de función de *CLF* y *LHP1*.

#### **IV. Expresión de AGL19 en mutantes de genes del grupo Polycomb tratadas con auxina**

La expresión de *AGL19* en la raíz de los mutantes de genes PcG no se modifica sensiblemente cuando se hace un tratamiento con auxina (4 horas de 1 $\mu$ M de 3-IAA) en las raíces primarias a 7 dps (Figura 15). En contraste, su expresión en la línea silvestre aumenta con el tratamiento. El aumento en la expresión de *AGL19* en las líneas sin tratamiento coincide con el experimento anterior, si bien en este experimento la línea *lhp1-1* sobresale de las otras dos. Por otro lado, el hecho de que *AGL19* se induzca con auxinas en la línea silvestre, pero el mismo tratamiento no cambie su expresión en las líneas mutantes sugiere que la regulación de los complejos PcG sobre el locus de *AGL19* podría ser una vía compartida con la de regulación por auxinas. Específicamente, los datos sugieren que la auxina necesita de la presencia de Polycomb para inducir un aumento en la expresión de *AGL19*. Cabe señalar que el control elegido para evidenciar la acción de las auxinas, ARF5, presenta una expresión irregular y en cierto sentido opuesta a lo esperado que sería una regulación positiva de las auxinas en la expresión de este gen. Interesantemente, se observa un aumento en los mutantes de Polycomb que concuerda con información previa de la regulación de algunos ARFs por complejos Polycomb (Kim *et al.*, 2010). Se necesitaría otro gen (podría ser otro ARF) o un diferente tipo de control para llevar a cabo el experimento de inducción por la acción de las auxinas; probablemente se podría usar una línea genética independiente con una región inducible por auxinas acoplada a un gen reportero. También es importante señalar que no se realizó ninguna réplica de los experimentos. Si bien algunos datos se repetían en los experimentos similares (la expresión de *AGL19* en los fondos mutantes de Polycomb, por ejemplo), son necesarias las réplicas para extraer conclusiones confiables.



[Figura 15. RT-PCR de *AGL19* (y sus respectivos controles) en los diferentes fondos mutantes con y sin tratamiento de auxinas. El gen *ARF* se usó como control de respuesta al tratamiento a auxinas, pero debe reconsiderarse (ver discusión arriba). Se observa un aumento de la expresión de *AGL19* en el fondo silvestre después del tratamiento; sin embargo, esto no ocurre en los fondos mutantes.]



[Figura 16. Intensidad relativa de *AGL19* normalizada con tubulina. La banda en la columna de la planta silvestre (*wt*) sin tratamiento no fue detectada por el software KodakMI y por eso se ve el espacio en blanco.]

## V. Generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* con construcciones que contengan diferentes regiones reguladoras

Los datos previos y los corroborados en este trabajo sobre la expresión del gen reportero GUS fusionado al promotor mínimo y el primer intrón de *AGL19* muestran que la expresión de éste último se restringe a la columela y la cofia lateral del meristemo apical radical y los meristemos de las raíces laterales (Figura 17).

Estos datos muestran que el promotor mínimo (175 pb en 5' del ATG) y el primer intrón son suficientes para dirigir la expresión de *AGL19* a la columela y a la cofia lateral de la raíz primaria y a raíces laterales maduras. Sin embargo, los experimentos de hibridación *in situ* (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000; Cerón, 2012) muestran que el transcrito de este gen también se distribuye en células diferenciadas de otros tejidos de la raíz primaria, y en raíces laterales maduras; ésta distribución no se recupera con esta construcción por lo que le faltan sitios de regulación de la expresión completa de este gen.



[Figura 17. Preparaciones de raíces de plántulas de 7 dps de la línea mpiAGL19::GUS (promotor mínimo y primer intrón). A. Raíz primaria. B. Raíz lateral. En ambas se aprecia expresión del gen reportero GUS en células de la columela y la cofia lateral.]

Partiendo del dato de que la expresión encontrada en varios de los tipos celulares de la raíz mediante los análisis de hibridación de RNA *in situ* no concuerdan con los observados con la línea reportera GUS fusionada al mini promotor y el primer intrón, se generaron construcciones que incluyeran la región promotora completa (ver sección “Clonación del promotor completo de *AGL19*”) de *AGL19*.

#### *Corroboración de las construcciones preexistentes de AGL19*

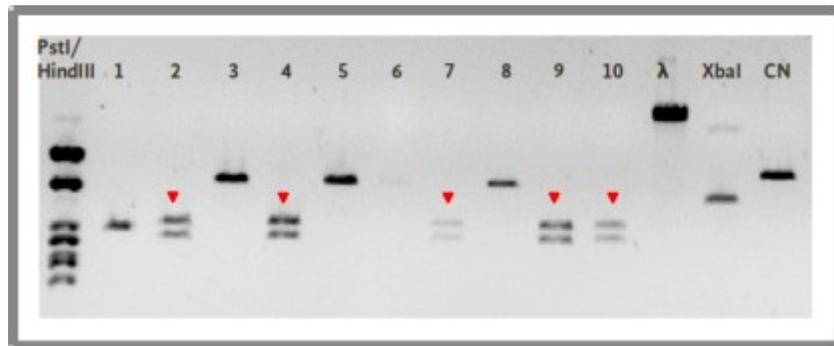
La secuenciación de la construcción pA09 mostró que ésta contiene una mutación en una región cercana al codón de inicio de *AGL19*. (Ver secuencia en apéndice)

#### *Clonación del promotor completo de AGL19*

La secuencia incluida en estas construcciones es la totalidad de la región comprendida entre el ATG de *AGL19* (locus AT4G22950 de la anotación más reciente del genoma de *A. thaliana*) y el UTR del gen inmediato río arriba (locus AT4G22960), más algunos pares de bases después del ATG de *AGL19* (2705 pb en total) (ver Figura 6). Los oligonucleótidos elegidos, AGL19F1A y AGL19R4XM (ver apéndice

1), abarcan esta secuencia intergénica. El oligo AGL19R4XM incluye una parte del primer exón, pero tiene mutado el codón de inicio. Esto era útil para la construcción, pues evita que el codón de inicio del gen interfiera en la expresión del gen reportero GUS.

Para la selección de las clonas transformadas, se debía conocer si el fragmento del promotor completo se había insertado en la dirección correcta dentro el vector de entrada PCR8/GW/TOPO. Para ello, se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas XbaI y SacI. La primera tiene un solo sitio de corte en el vector de entrada y ninguno en el inserto, mientras que la segunda no tiene sitios de corte en el vector y sólo uno en el inserto. Esta reacción nos permitió saber la orientación del inserto. Los plásmidos con el inserto en la orientación deseada tuvieron un patrón de restricción de dos bandas de 2870 y 2670 pb, mientras que aquellos con el inserto en la orientación inversa tuvieron dos bandas de 4917 y 629 pb. En total se obtuvieron cinco plásmidos con la orientación correcta (Figura 18).



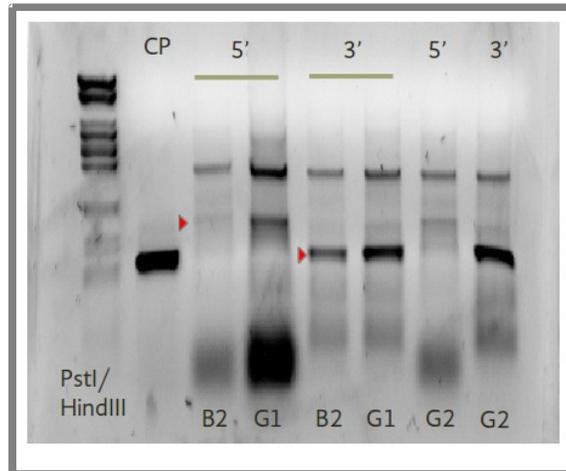
[Figura 18. Gel de la doble digestión. Primer carril: marcador de fago lambda con PstI/ HindIII. Carriles 1-10: plásmidos con la inserción del promotor completo de *AGL19*. Carril 11: fago lambda sin digerir. Carril 12: Digestión del fago lambda con XbaI. CN: control negativo (vector sin digerir). En los carriles 2, 4, 7, 9 y 10 se observa el patrón de bandas que representa la clonación en la orientación deseada (señaladas con las flechas rojas). En el carril 1 se observa una banda inespecífica, cuya naturaleza no se intentó determinar por no ser parte del objetivo del experimento.]

Estos cinco plásmidos se secuenciaron usando el oligo m13 reverso, que hibrida con una región en el vector río abajo y cercana al sitio de inserción. Las secuencias mostrarían si la fusión del inserto con el vector se mantuvo en fase con el gen reportero. Todas las muestras enviadas devolvieron secuencias de buena calidad de aproximadamente 1 kb y éstas tuvieron un alto grado de identidad (>95%) con el gen *AGL19* (locus AT4G22950) de la base de datos de TAIR. Esta primera secuenciación también mostró

que todas las clonas tenían errores en la secuencia, probablemente introducidos por la polimerasa utilizada (EXPAND de Roche; ver secuencias en apéndice). Corroborada la inserción en el vector, se enviaron los plásmidos de las dos colonias con mayor grado de identidad (nombradas p19TOPO4 y p19TOPO10) para secuenciar todo el inserto, esta vez utilizando tres oligonucleótidos internos del promotor de *AGL19*. Esta secuenciación arrojó como resultado que las clonas contenían más mutaciones, por lo menos del orden de 2 cada 1000 pares de bases. La clona que menos mutaciones tenía, p19TOPO10.1, presentaba una sustitución de T por C en una región muy cercana al ATG. Por su lado, p19TOPO4.2 presentaba más mutaciones, pero ninguna en una región cercana al codón de inicio.

#### *Clonación del promotor completo en el vector pENTR/D-TOPO*

Para tratar de obtener datos sobre la expresión nativa de *AGL19*, tomamos la decisión de volver a clonar el promotor de este gen. Elegimos esta vez una polimerasa con un grado más alto de fidelidad que la EXPAND de Roche. La enzima elegida fue Platinum HiFi de Invitrogen. Para esta clonación se eligió también el vector de entrada pENTR/D-TOPO, que asegura la inserción del fragmento clonado en la dirección correcta, de modo que se evita el paso de las dobles digestiones. Se diseñó un oligonucleótido *forward* (AGL19 D TOPO) que contiene una secuencia requerida por el vector de entrada para la reacción de recombinación. El oligonucleótido *reverse* fue el mismo que para la clonación anterior (AGL19R4XM) y como templado se usaron DNA genómico de *A. thaliana* y DNA plasmídico de una BAC. Una vez obtenidas las colonias transformantes, se les extrajo el DNA plasmídico y se corroboró la fusión en el vector por una PCR usando tres pares de oligos. El primer par (m13F y AGL19 R TOPO) amplifica el fragmento fusionado en el extremo 5'. El segundo par (OEAB170 y m13R) amplifica la fusión por el extremo 3'. Finalmente, el tercer par (AGL19F1A y AGL19 R TOPO) se usó como control positivo de la reacción, pues amplifica una región interna del inserto (figura 19).



[Figura 19. Gel de la PCR con oligos internos y del vector. Carril 1: Marcador de DNA de lambda digerido con PstI/HindIII. Carril 2: Control positivo, Banda amplificada con el par de oligos AGL19F1A y AGL19 R TOPO. Carriles marcados con 5': Banda amplificada con el par de oligos m13F y AGL19 R TOPO. Carriles marcados con 3': Banda amplificada con el par de oligos OEAB170 y m13R. Debajo de cada carril se marca el templado analizado. B: proveniente de BACF7H19; G: proveniente de DNA genómico. Las puntas de flecha rojas indican las bandas esperadas.]

En el gel de agarosa a 1% se pueden observar las bandas esperadas, pero también bandas de más pares de bases en todas las muestras. Es poco probable que esas bandas pertenezcan al vector circular o linearizado, pues están mucho más abajo del tamaño del vector recombinado (5.5 kb). Para despejar la duda, se mandaron secuenciar plásmidos de cuatro cepas, dos provenientes del DNA de la BAC y dos provenientes del DNA genómico. El DNA plasmídico de estas clonas se extrajo por una miniprep casera con fenolización. En la primera tanda de secuenciación se usaron los oligos m13 que se pegan a regiones del vector de entrada cercana a los puntos de recombinación. Las muestras se enviaron al Instituto de Biotecnología de la UNAM. La reacción de secuenciación no devolvió ninguna secuencia clara. Para descartar cualquier contaminación por químicos orgánicos, en lugar de la miniprep casera se utilizó un kit de purificación de DNA plasmídico por columnas de QIAGEN. La concentración de los plásmidos enviados se verificó tanto por Nanodrop como por intensidad relativa en un gel de agarosa. Los oligos utilizados fueron uno del vector (m13R) y uno del inserto (AGL19F1A; ver apéndice 1). Las muestras se enviaron al Instituto de Biotecnología y de nuevo, no se obtuvieron secuencias claras. Para descartar alguna falla en el método de extracción de DNA plasmídico, se comparó la eficiencia del kit

de nuestro laboratorio con la del kit del laboratorio de Fisiología Vegetal en el Instituto de Ecología. Nuestro kit no mostró señales de baja eficiencia, así que se volvió a utilizar para extraer los plásmidos. Las muestras se enviaron esta vez al Instituto de Biología de la UNAM, pero tampoco se obtuvo ninguna secuencia. En un último intento, se volvieron a enviar muestras al Instituto de Biotecnología, pero se incluyó como control positivo uno de los plásmidos que ya se habían secuenciado con éxito. Como resultado se obtuvo que el control positivo devolvió una secuencia clara, pero las muestras de estas clonaciones no.

Con el objeto de no detener el avance del proyecto, se tomó una decisión. Se abandonaría la secuenciación y el uso de esta construcción (pProAGL19-GW) y se usarían las tres construcciones disponibles del promotor completo de *AGL19* (pAO9, p19TOPO4.2 y p19TOPO10.1) a pesar de presentar mutaciones. Incluso podríamos llegar a asignar un papel funcional al nucleótido modificado si se observaran cambios en la expresión del gen reportero entre estas líneas. Para hacer una evaluación inmediata de estas líneas, se planeó un ensayo de expresión transitoria en hojas de tabaco.

#### *Expresión transitoria de GUS en hojas de tabaco (Nicotiana benthamiana)*

Las hojas infiltradas con la clona de pAO9 expresaron GUS, aunque con intensidad variable (Figura 20). Las hojas infiltradas con p19TOPO4.2 mostraron una intensidad muy tenue, mientras que las infiltradas con p19TOPO10.1 no mostraron expresión en absoluto (no se muestran).

Los datos de este ensayo muestran que las construcciones son capaces de dirigir la expresión de GUS en un sistema heterólogo a *A. thaliana*. La ausencia de expresión de p19TOPO10.1 no tiene que ser un predictivo de la ausencia de expresión en *A. thaliana*, pues no sólo la especie es diferente, sino también el órgano analizado y el estadio de desarrollo. Por esta razón se decidió usar también la clona p19TOPO10.1 para transformar plantas de *A. thaliana*.

#### *Plantas transgénicas con las diferentes construcciones de AGL19*

Después de realizada la transformación con *A. tumefaciens*, se permitió que las plantas dieran semillas y éstas se recolectaron. Hasta el momento se han analizado cientos de semillas de las tres líneas, pero no se han encontrado plantas resistentes a kanamicina, que indicarían que la transgénesis se llevó a cabo. Esto podría deberse a que no se han analizado las suficientes semillas o a que el método utilizado

no tuvo la eficacia deseada y no tenemos plantas transgénicas. La evaluación de la totalidad de las semillas definirá esta cuestión.



[Figura 20. Hoja de *Nicotiana benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens* que llevaban el plásmido pA09.]

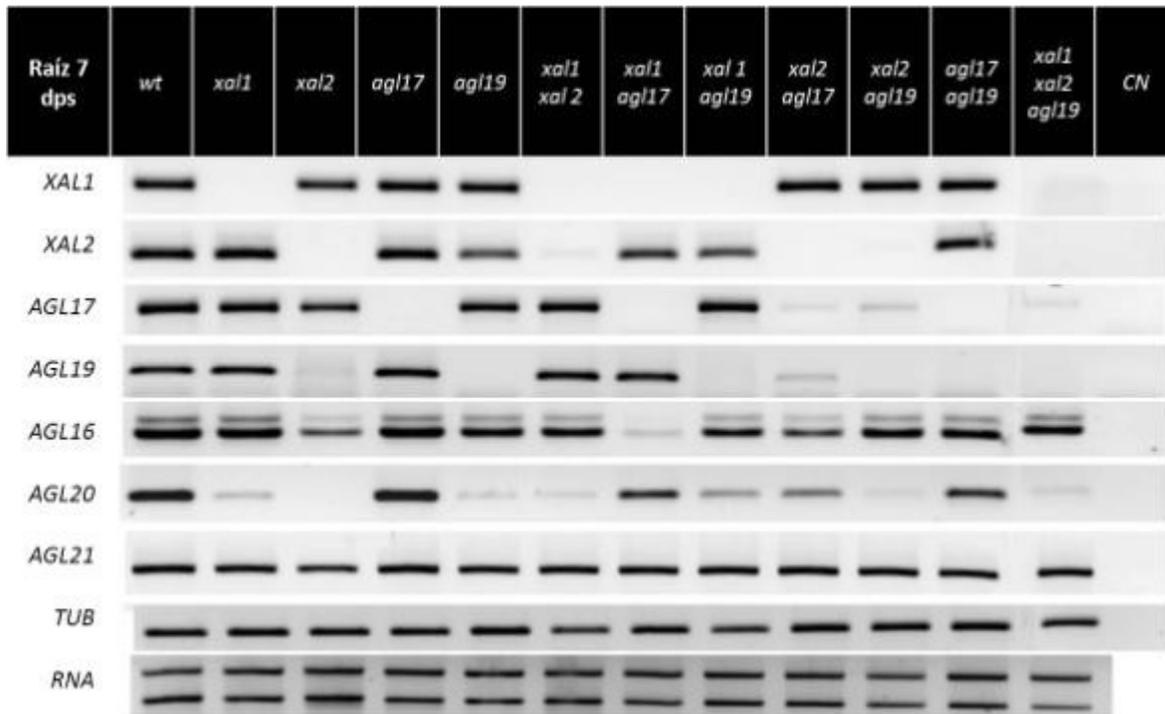
## **VI. Expresión de genes MADS-box en fondos mutantes de pérdida de función de genes MADS-box**

El objetivo de este experimento fue dilucidar las redes de regulación transcripcional de los genes MADS-box involucrados en el desarrollo de la raíz. Como se mencionó arriba, este experimento se planteó antes de descubrir que el fondo mutante de *AGL19* con el que se trabajó inicialmente portaba una segunda mutación, lo cual dificultaba las conclusiones sobre la función del gen. No obstante, se presentan los resultados porque también contienen datos de la regulación sobre *AGL19*.

Se incluyeron los 3 genes (*XAL1* [*AGL12*], *XAL2* [*AGL14*] y *AGL17*) cuyos mutantes nulos tienen efectos fenotípicos en la longitud de la raíz, *AGL19* y los 3 genes (*AGL16*, *AGL20* y *AGL21*) que son sus interactores directos en ese órgano. Los dobles mutantes de pérdida de función (*xal1/xal2*,

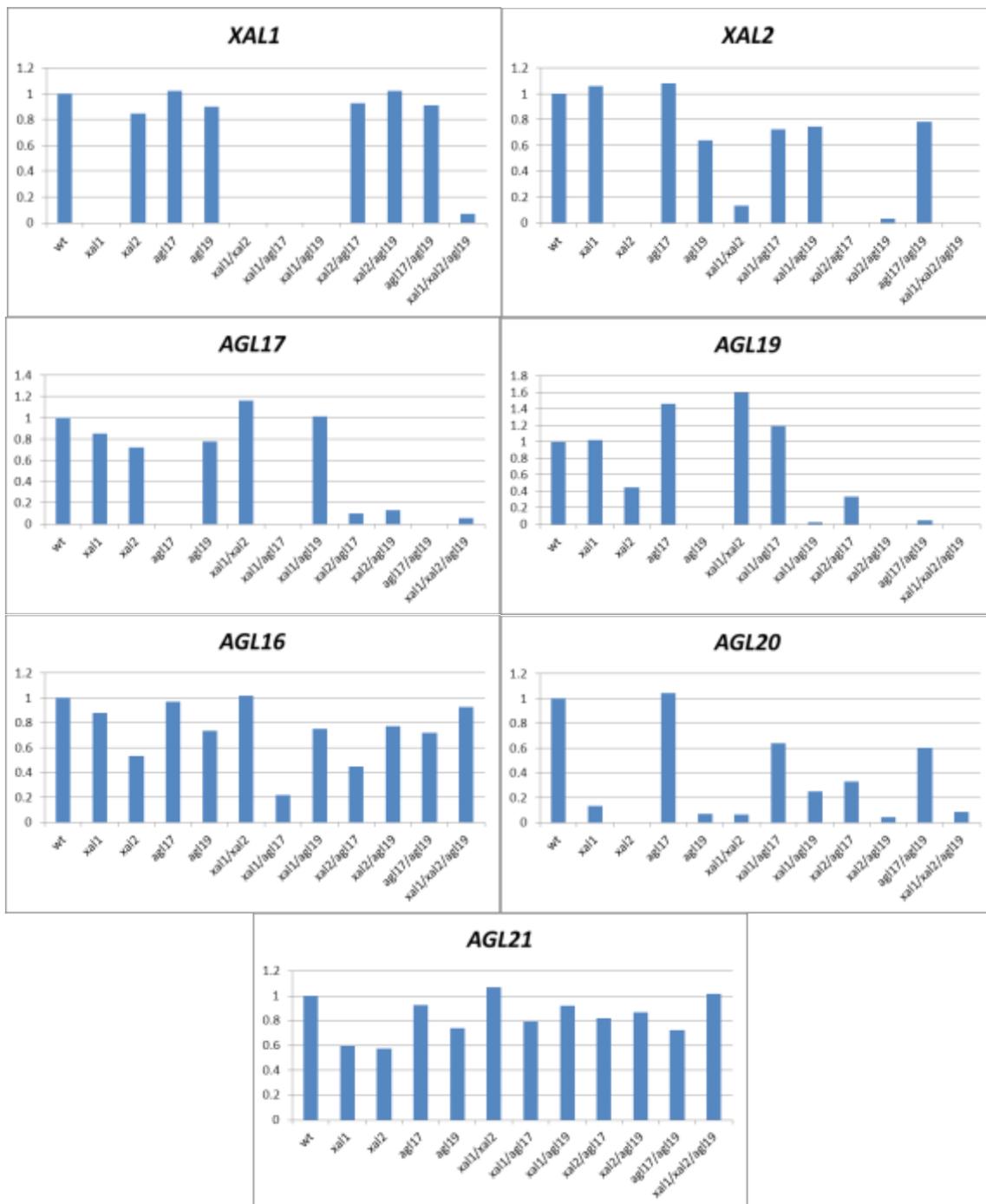
*xal1/agl17*, *xal1/agl19*, *xal2/agl17*, *xal2/agl19*, *agl17/agl19*) y el triple mutante (*xal1/xal2/agl19*) nos podría ayudar a entender la combinatoria de los complejos que incluyen a estos genes MADS-box.

La Figura 21 muestra las fotografías tomadas a los geles de agarosa donde se corrieron los productos de las PCR de plantas a 7 dps. Se hicieron análisis semicuantitativos de las muestras de raíz.



[Figura 21: RT-PCR de genes MADS involucrados en desarrollo de raíz y sus interactores directos en fondos mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triple. Se usaron raíces de 7 dps.]

En cuanto a los niveles de expresión a 7 dps, en general no se observan modificaciones sensibles de la expresión de los genes MADS en los fondos elegidos. Hay dos excepciones: la primera es que la expresión de *AGL19* se abate considerablemente en el fondo mutante de *XAL2*, lo cual coincide con datos obtenidos en otros experimentos (Garay-Arroyo, com. personal); la segunda es el patrón general de la expresión de *AGL20* que se ve muy modificado en varias de las líneas mutantes. *AGL20* también es conocido como *SOC1* (*SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*) y es un importante integrador de las vías de floración en la parte aérea (Lee y Lee, 2010), pero su participación en el desarrollo de la raíz no se ha caracterizado ampliamente.



[Graficos 1. Cuantificaciones de la expresión relativa de genes MADS en fondos mutantes MADS en raíces de 7dps normalizada con la expresión de tubulinas. Se toma como unidad la medición del fondo silvestre (wt).]

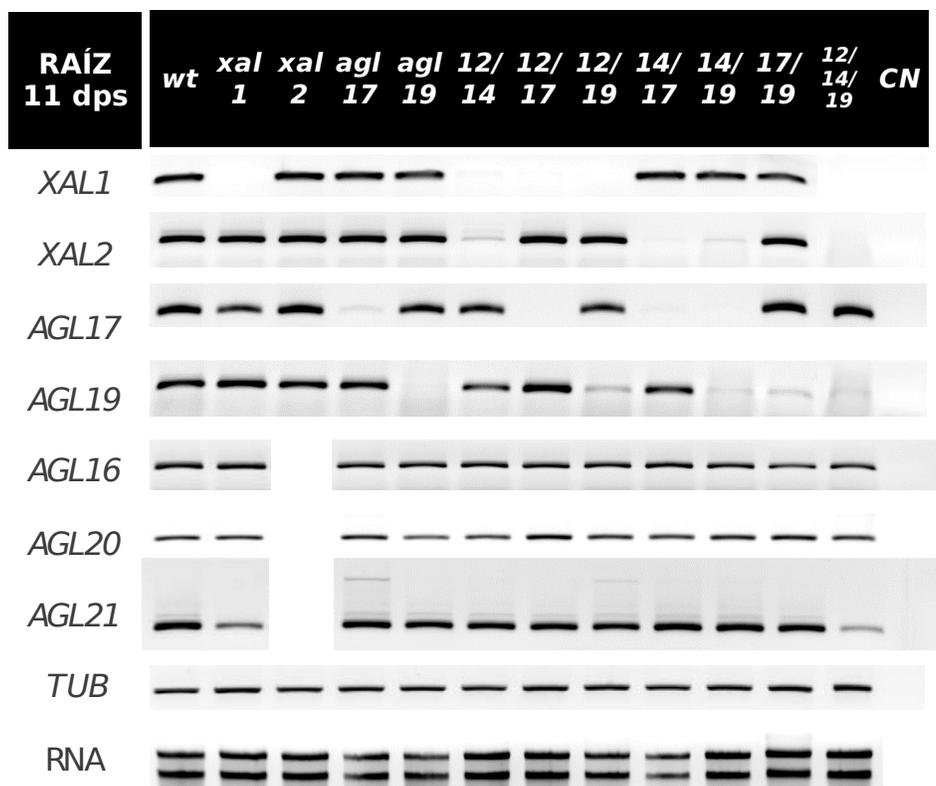
Se hizo un el experimento adicional a los 11 dps porque se ha observado, en experimentos de dinámica de expresión en el tiempo, que por lo menos dos de los genes selectores (*XAL2* y *AGL17*) alcanzan sus mayores niveles de expresión después de los diez dps (Pacheco-Escobedo y García-Cruz, com. personal). En las figuras 22.1 y 22.2 se muestran las bandas amplificadas en los PCR de plantas a 11 dps. Se hicieron análisis semicuantitativos de las muestras de raíz y de parte aérea.

En estos resultados salta a la vista la presencia de expresión de *XAL2* en el fondo mutante *xal2-2* a 11 días post-siembra. Esta expresión no debería aparecer o debería ser muy tenue, puesto que *xal2-2* es una línea mutante casi nula; se podría explicar la expresión del gen que observamos por la actividad del vector utilizado para hacer la construcción que dio lugar al alelo *xal2-2*, en la cual no sólo esta el transposón sino también la transposasa, por lo cual no se puede controlar ni en tiempo ni en espacio la escisión del transposón (Garay-Arroyo, com. personal). Así mismo, los niveles de expresión de *xal2-2* observados en la parte aérea en este experimento (Figura 22.2) son tan abundantes como los que se encuentran en la planta silvestre (carril 3). La presencia del transcrito de *XAL2* en los fondos *xal1xal2* y *xal2agl19* en raíz se podría explicar por la misma razón (carriles 6 y 9, figura 22.1). La presencia de transcrito en el mutante *xal2-2* puede explicar la contradicción en la expresión de *AGL19* en dicho fondo mutante entre los 7 y los 11 dps. Este dato estaría pendiente de verificación tras corroborar los niveles de expresión de *XAL2* en las líneas utilizadas en el último experimento. Se descarta contaminación con otra línea mutante sencilla, puesto que se amplifican los cuatro genes MADS analizados en ese fondo mutante; por otro lado, parece difícil pensar que se trata de la línea silvestre, puesto que su patrón de expresión no coincide exactamente con ella en la parte aérea (Figura 22.2).

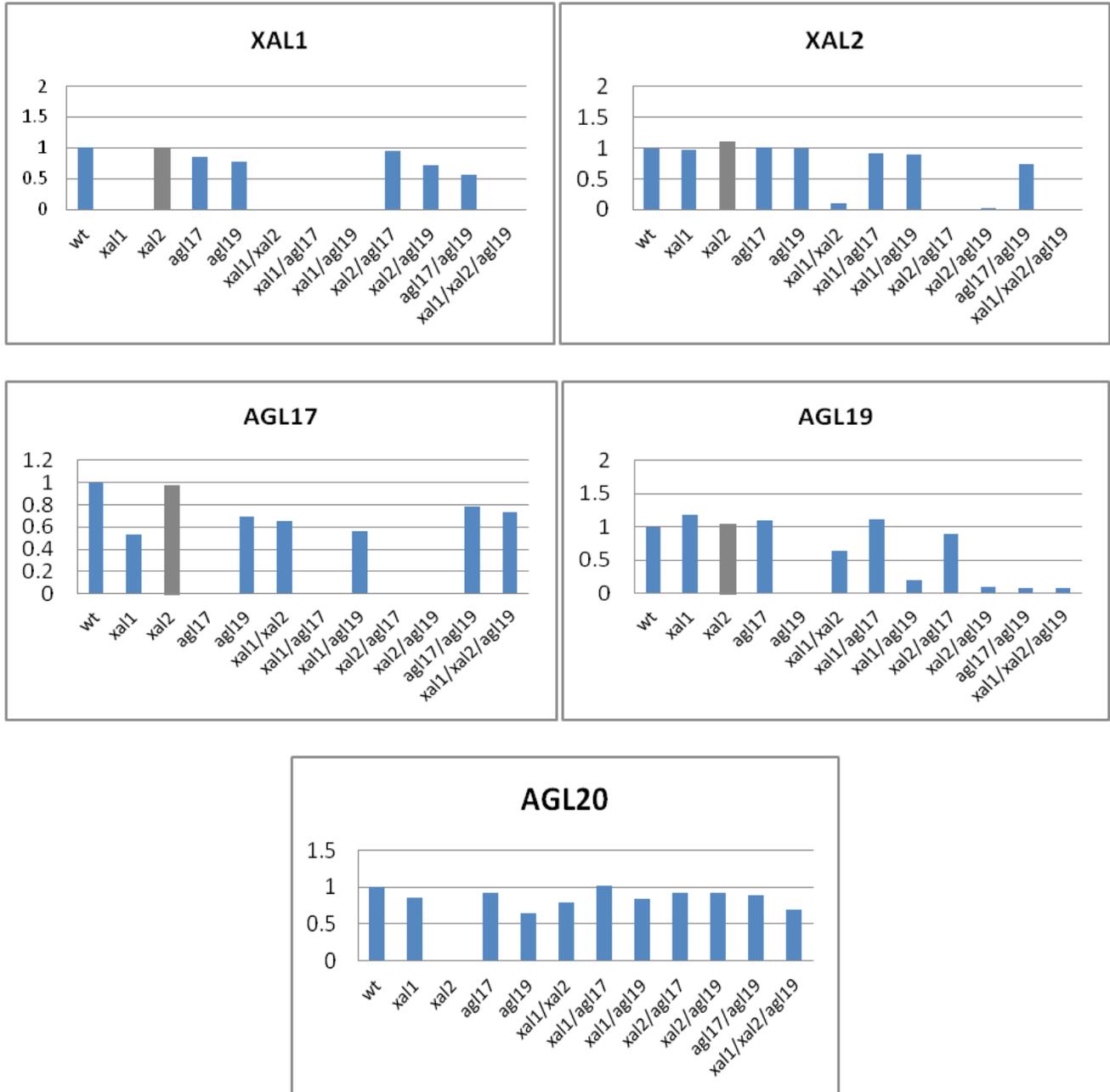
En el experimento con plantas a 11 dps, no se observan cambios considerables en la expresión de los genes analizados, excepto en *AGL21* (Figura 22.1 y 22.2). *AGL21* se expresa preferencialmente en raíz y es notable que sean únicamente la mutante nula de *XAL1* y la triple mutante las que muevan su expresión, y no las otras líneas (Figura 22.1 y Gráficos 2). De confirmarse, este dato hablaría de que los genes *XAL1*, *XAL2* y *AGL19* tendrían redundancia funcional para regular a *AGL21*. En la parte aérea, en cambio, se observa mucha regulación recíproca entre estos genes MADS (Figura 22.2). Un dato interesante es que *AGL17* aumenta su expresión en ausencia de *AGL19*, pero esto no se repite en los dobles mutantes dobles posiblemente porque *AGL19* reprime a *AGL17* sólo en presencia de los otros

genes MADS.

Estos datos sugieren que los genes MADS-box implicados en la regulación del crecimiento de la raíz de *A. thaliana* se regulan entre sí. Si hay una relación más o menos directa entre el aumento en los niveles de transcrito y los niveles de proteína, la regulación recíproca podría tener consecuencias en la estequiometría de la formación de los tetrámeros de proteínas MADS-box. Por un lado, la ausencia de una proteína específica puede dejar libres a sus interactores y darles más probabilidad de que formen complejos con sus otras proteínas interactoras. Por ejemplo, en la ausencia de XAL1, las proteínas AGL16, AGL20 y AGL21 tendrían más probabilidad de formar complejos con XAL2, AGL17 y AGL19. Por otro lado, si estos genes MADS-box se regulan entre ellos, las probabilidades de formación de complejos también dependerá de si la regulación es positiva o negativa. Por ejemplo, en el fondo *xal2-2* la expresión de *AGL19* se abate, lo cual dejaría libres a los interactores de ambas proteínas.

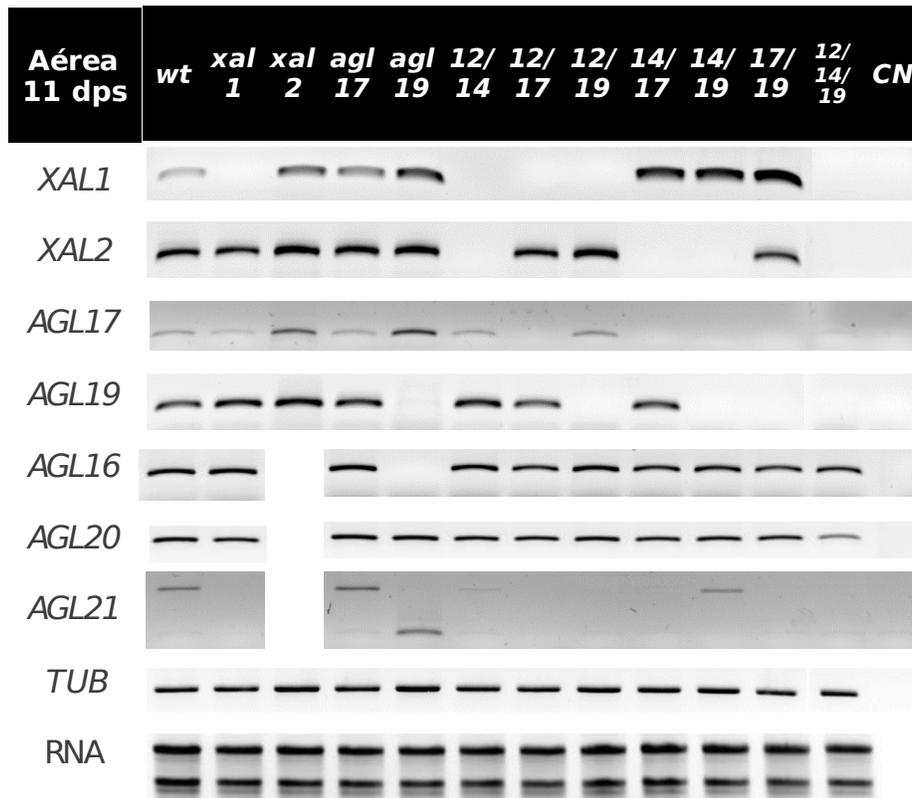


[Figura 22.1 : RT-PCR de genes MADS involucrados en desarrollo de raíz y sus interactores directos en fondos mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triple. Se usaron raíces de 11 dps.]



[Gráficos 2. Cuantificaciones de la expresión relativa de genes MADS en fondos mutantes MADS en raíces de 11dps normalizada con la expresión de tubulinas. Se toma como unidad la medición del fondo silvestre (wt). Las barras de *xal2* se muestran en gris porque está en duda la nulidad de la línea mutante

utilizada.]



[Figura 22.2 RT-PCR semicuantitativo de RT-PCR de genes MADS involucrados en desarrollo de raíz y sus interactores directos en fondos mutantes de pérdida de función sencillos, dobles y triple. Se usaron las partes de 11 dps.]

Otros datos interesantes de resaltar son los siguientes. Conforme a lo reportado, *XAL1*, *AGL17* y *AGL19* se expresan más en la raíz que en la parte aérea en este estadio de desarrollo. Por otro lado, parece que *XAL1* está mucho más regulado por estos genes MADS en la parte aérea que en la raíz, pues en ésta última su expresión es constante en casi todos los fondos. En comparación con los demás genes analizados, *XAL1* tiene una expresión menor en parte aérea que en raíz (figuras 22.1 y 22.2, carril 1). Sin embargo, se sabe que *XAL1* es un regulador positivo de la transición floral, y realiza esta función en parte por medio de la regulación positiva de *SOC1*, *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) y *LFY* (*LEAFY*).

Estos últimos datos se obtuvieron de plantas de 14 días de edad, así que es interesante que en plantas de 7 días post-siembra no se observe una expresión distinta de *SOC1*. Esto sugiere que *XAL1* adquiere diferentes blancos de regulación en diferentes estadios del desarrollo. Cabe mencionar que el amplificado de *AGL21* en la parte aérea y raíz (Figura 22.1 y .2) revela una posible contaminación por DNA genómico de algunas muestras, por la amplificación de dos bandas de diferente peso. La banda más ligera es de ~500 pb y coincide con el amplificado esperado para cDNA (que omite cinco intrones); el hecho de que su expresión sea casi nula en la línea silvestre apoya esa idea: en anteriores estudios, se ha observado que *AGL21* se expresa preferencialmente en raíz en líneas *wt* (Burgeff *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2004). La banda más pesada ronda los ~1000 pb, tamaño que se esperaría para el amplificado de la secuencia genómica (con los cinco intrones omitidos en el cDNA) usando los oligos elegidos para este experimento (ver apéndice 1). Sin embargo, las dos bandas aparecen solamente en dos muestras en la raíz, lo cual puede hablar de que existe menos contaminación de DNA genómico en esas muestras. Para evitar la amplificación de DNA en las muestras utilizadas, sintetizaremos oligos cuya secuencia esté interrumpida por un intrón para que sólo se unan y amplifiquen secuencias de cDNA.

Es importante señalar que no se realizó ninguna réplica de estos experimentos de PCR semicuantitativo; si bien los datos son sugerentes, se necesitan réplicas adicionales para obtener conclusiones.

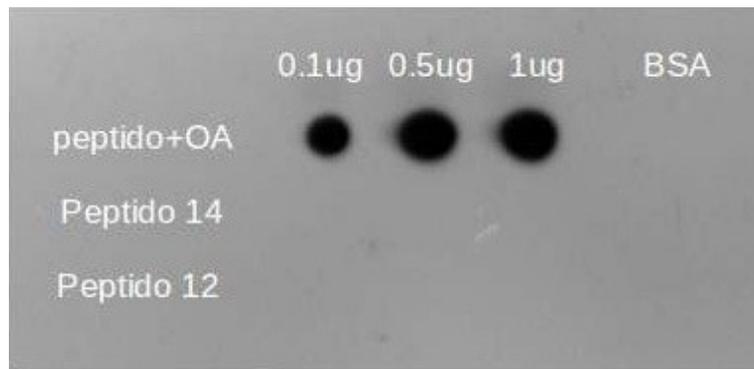
## **VII. Evaluación del anticuerpo $\alpha$ -XAL2/AGL19**

Este experimento se planteó con el objetivo principal de analizar la combinatoria de las proteínas MADS, entre ellas *AGL19*, y su posible función en el desarrollo radical. Se pensaba usar el anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19 para realizar experimentos de ChIP, entre otros, con complejos que incluyeran a *AGL19*. Después de descubrir la segunda mutación en la línea mutante nula de *AGL19* con la que se trabajó inicialmente, se dio prioridad al análisis de la regulación sobre *AGL19*. Aunque se siguió trabajando con la evaluación de anticuerpo, pensando en que éste podía resultar útil para experimentos posteriores, los constantes resultados negativos incitaron a que se le diera la menor prioridad a este experimento.

En el laboratorio, una estudiante de doctorado que estaba trabajando con *XAL2*, había pedido a una

compañía que llevara a cabo la generación de un anticuerpo específico contra el péptido XAL2/AGL19, pero no resultó ser específico. Luego de analizar la secuencia del péptido, el Dr. Rubén Marroquín sugirió conjugarlo con una molécula acarreadora a través de enlaces epsilon-amino en las lisinas. De esa forma se podían pegar más moléculas del péptido a la molécula acarreadora (en este caso ovoalbúmina) y exponer con mayor frecuencia la secuencia del péptido a los anticuerpos. Este fue el método que se utilizó.

Una vez obtenido el anticuerpo contra el conjugado péptido XAL2/AGL19+albúmina, se llevó a cabo un *dot-blot* contra diferentes péptidos y se corroboró que existía afinidad por el antígeno usado, pero no contra los otros péptidos. Además, se ensayó una primera titulación del anticuerpo y se observó que la intensidad de la señal en la placa variaba en función de la concentración usada [Figura 23]. Este ensayo sirvió como control de la eficacia del anticuerpo.

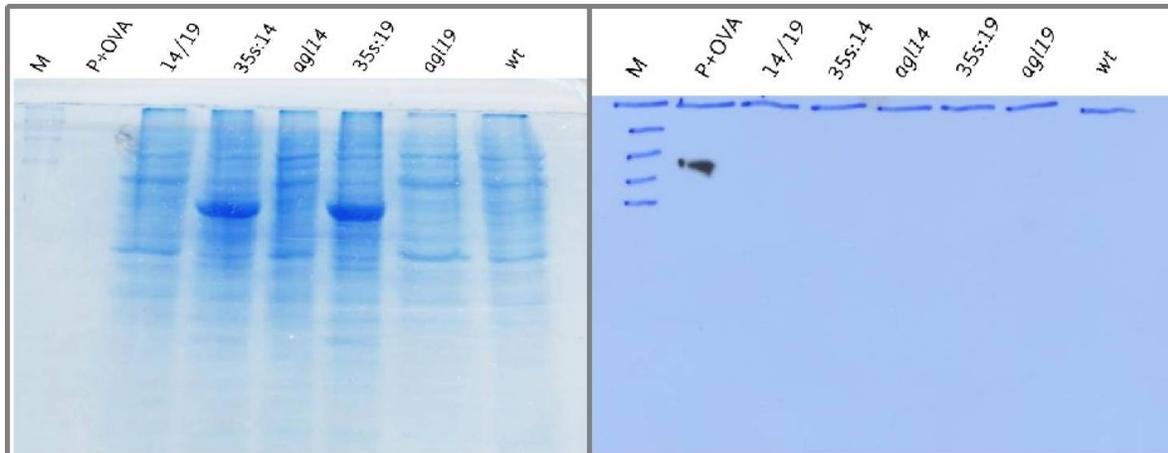


[Figura 23. Imagen de la placa revelada del *dot-blot*. En la primera fila se usó el conjugado péptido XAL2/AGL19+albúmina, en la segunda fila un péptido de XAL2 con una secuencia de aa distinta, y en la tercera un péptido de XAL1. En el cabezal de cada columna se indica la cantidad de péptido usado.

La dilución del anticuerpo fue de 1:1000, el tiempo de reacción de 1 s y el de exposición de 1s.]

En contraste, los tres ensayos de *Western-blot* preliminares con extractos de proteínas nucleares no dieron reacción alguna contra el anticuerpo. Sólo se observó reacción contra el control positivo, el antígeno mismo, en el segundo ensayo (ver figura 24). Puesto que se supuso que la falta de reactividad del anticuerpo se debía a la poca concentración de las proteínas MADS en estos extractos, se sugirió hacer extractos totales altamente concentrados. Las líneas que se sugirieron servirían como controles: en las mutantes de pérdida de función de XAL2 y AGL19 debíamos observar una disminución de la señal, e incluso una completa falta de señal en la línea doble mutante *xal2/agl19*. De manera similar, en

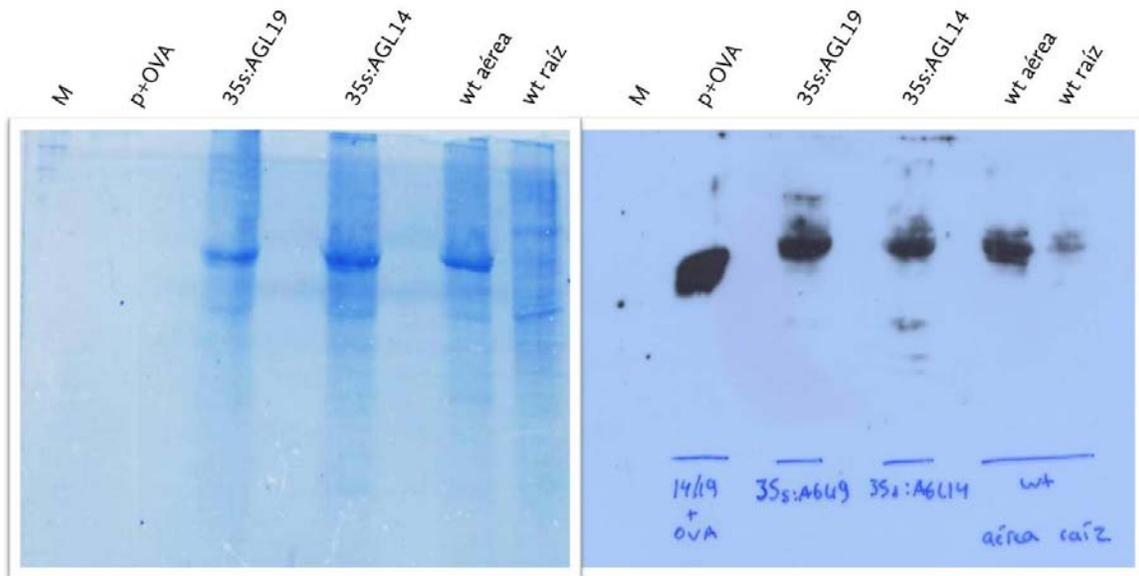
las sobreexpresoras esperaríamos un aumento de señal. Sin embargo, no se observa ninguna señal más que la del control positivo, que es el antígeno mismo. La reacción subsecuente a esta prueba fue la de una exposición de 72 horas, la cual tampoco tuvo ningún resultado. Lo que es más, el control positivo no se observó. Esto puede atribuirse, sin embargo, a que en exposiciones muy largas se pierde el efecto de la quimioluminiscencia.



[Figura 24. Western blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19. A la izquierda está el gel de acrilamida después de la transferencia. Arriba de cada carril se indica la línea analizada. M=marcador. P+OVA= Conjugado del péptido de XAL2/AGL19 más ovoalbúmina. Se cargaron 150  $\mu$ g de proteína en cada carril. A la derecha se muestra la placa revelada donde se aprecia que sólo hubo reacción del anticuerpo contra su antígeno. La concentración del anticuerpo primario fue de 1:250 y el del secundario 1:1000. El tiempo de reacción fue de 5 minutos y el de exposición 20 minutos. Nota: Las reacciones subsecuentes a este ensayo tuvieron el mismo resultado negativo.]

Para aumentar las probabilidades de interacción del anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19 con su proteína blanco, se sugirió usar urea a una concentración 6M como agente desnaturizante adicional a los pasos de desnaturización ya efectuados durante el protocolo para correr las proteínas en el gel, los cuales son calentamiento y un buffer desnaturizante. La tinción del gel de acrilamida con estas condiciones revela una banda en la muestra de wt aérea que corresponde a las observadas en las muestras de sobreexpresión de XAL2 y AGL19; lo cual lleva a pensar que se trata de la subunidad grande de la

RuBisCo debido tanto a la abundancia como al tamaño lo sugieren. Por otro lado, el resultado del revelado es un patrón de bandas sumamente inespecífico, cuyas intensidades parecen seguir una relación proporcional con las proteínas más abundantes: la banda que da una señal mas intensa está a la altura de la subunidad grande de la RuBisCo (ver Figura 25).



[Figura 25. Western blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19 y con desnaturización con urea 6M. A la izquierda está el gel de acrilamida después de la transferencia. Arriba de cada carril se indica la línea analizada. M=marcador. P+OVA= Conjugado del péptido de XAL2/AGL19 más ovoalbúmina. Se cargaron 150  $\mu$ g de proteína en cada carril. A la derecha se muestra la placa revelada donde se aprecia que el anticuerpo mostró inespecificidad. La concentración del anticuerpo primario fue de 1:250 y el del secundario 1:1000. El tiempo de reacción fue de 5 minutos y el de exposición 4 horas 30 minutos.]

De estos ensayos se pueden aventurar las siguientes conclusiones. El anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19 no reacciona con nada más que con el conjugado IGPETRHFKKFPPSN+OVA. Desde el principio se descartaron inespecificidades en el anticuerpo por las cuatro reacciones de inmunoadsorción contra ovoalbúmina realizadas al purificar el anticuerpo. Además, éste sólo reaccionó con su antígeno propio en un primer ensayo de *dot-blot* y no tuvo reacción cruzada con ninguna proteína en los primeros ensayos de Western Blot con extractos de proteínas nucleares. Sin embargo, esta falta de reactividad se repitió en prácticamente todas las condiciones utilizadas para maximizar la especificidad del anticuerpo por alguna de las proteínas MADS de interés. Una posible explicación de este fenómeno es que el

anticuerpo sólo reaccione contra una estructura mezcla del péptido y la ovoalbúmina, de manera no se pegaría al péptido solo en ninguna condición de desnaturalización.

Que el anticuerpo no haya reaccionado de manera específica en ninguna de estas condiciones hace difícil que se pueda usar para ensayos proteicos más finos. Si se corrobora su especificidad con alguna conformación de la proteína, serviría únicamente para ensayos de Western Blot en condiciones de alta concentración y muy desnaturalizantes, y se descartaría su uso para inmunoprecipitación o inmunolocalización.

Como sugerencia para una última prueba, la Dra. Alejandra Covarrubias del instituto de Biotecnología de la UNAM sugirió realizar de nuevo la desnaturalización con urea 6M pero aplicando un paso de diálisis previo. De ese modo se podría asegurar la completa desnaturalización de las proteínas y descartar o conservar el anticuerpo. Sin embargo, este último ensayo no se llevó a cabo por falta de tiempo.

Cabe señalar que el anticuerpo  $\alpha$ -XAL2/AGL19 generado por la conjugación del péptido de XAL2 +ovoalbúmina no es el primer anticuerpo contra esta proteína que se evalúa en nuestro laboratorio. En uno de esos casos, el anticuerpo generado contra esta proteína no tuvo la especificidad requerida (Garay-Arroyo, com. personal) y, en el otro, careció del título requerido para poder reconocer a ninguna proteína (Garay-Arroyo, com. personal). Esto podría sugerir que XAL2 (y probablemente su homóloga AGL19) tienen características de antigenicidad tales que las hacen pobres como antígenos. Esa falta de especificidad o de título también podría ocurrir debido a que los péptidos usados hasta ahora para efectuar una respuesta inmune son inaccesibles en la proteína en su conformación nativa. También es de resaltar que los estudios que utilizan anticuerpos contra otras proteínas MADS rara vez usan anticuerpos contra péptidos de la proteína (excepciones notables son AGL15 [Heck, *et al.*, 1995 y estudios posteriores], AG [Gómez-Mena *et al.*, 2005] y SEP3 [Kaufmann *et al.*, 2009]). Es común usar construcciones con etiquetas, como FLAG o GFP, contra las cuales existen anticuerpos producidos comercialmente (véase, p. ej., Smaczniak *et al.*, 2012, u otros estudios de proteómica de MADS). Dados los resultados anteriormente expuestos, se decidió avanzar en otros experimentos que pudieran generar más datos sobre la regulación de *AGL19* en la raíz, que son los que se reportan arriba. Se tomaron como antecedentes los reportes de que las proteínas del grupo Polycomb, encargadas de colocar marcas de represión en la cromatina, actuaban en el locus de *AGL19* (Schönrock *et al.*, 2006;

Turck *et al.*, 2007). En el laboratorio se contaban con líneas mutantes de pérdida de función de *CLF* y *LHP1*, así que se diseñaron experimentos de expresión relativa de *AGL19* en estas líneas.

## CONCLUSIONES

Los antecedentes del laboratorio de GeMoDEvo acerca del papel de *AGL19* en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, indicaban que este MADS-box tipo II era un promotor del crecimiento ya que dos de sus líneas mutantes (una de transposón y una de T-DNA) presentaban raíces mas cortas que la planta silvestre. Por otra parte, con una de las líneas mutantes (la de T-DNA), se habían hecho cruza con mutantes en otros genes MADS box del laboratorio en donde se veía un papel represor de *AGL19* ya que, en éstas líneas dobles y una triple, se anulaba el fenotipo de otros promotores del crecimiento (como *XAL1* y *XAL2*). Estos antecedentes dieron pie al desarrollo del presente trabajo que tenía como hipótesis inicial que *AGL19* jugaba un papel dual en regular el crecimiento de la raíz dependiendo de las proteínas con las cuales interactuaba. Durante el transcurso de la maestría surgieron diferentes dificultades que dieron como resultado las conclusiones que a continuación describo.

### **El papel de *AGL19* como regulador del desarrollo de la raíz primaria de *A. thaliana***

- La línea mutante *agl19-234* por inserción de T-DNA con la que originalmente se había descrito el fenotipo de raíz corta, al parecer, tenía otra mutación por lo que hubo que retrocruzar esta línea para limpiarla genéticamente. Debido a esto, se tuvieron que volver a llevar a cabo los análisis de crecimiento de la raíz primaria, así como las cuantificaciones de los parámetros celulares para determinar el papel de este gen durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
- Después de la segunda retrocruza, la línea mutante de pérdida de función *agl19-234* (2) no muestra una longitud de raíz significativamente diferente a la de la línea silvestre. Tampoco están alterados sus parámetros celulares en el meristemo a los 7 dps. Esto sugiere que el gen

*AGL19* no tiene una función evidente en la regulación del desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.

- Los datos preliminares de expresión de los genes MADS-box tipo II, *XAL1*, *XAL2*, *AGL17* y *AGL19* en líneas mutantes de pérdida de función de estos mismos genes sugieren que tienen regulación recíproca entre ellos y con otros de sus interactores directos. Los experimentos indican una regulación diferente durante el desarrollo y que, además, es desigual en la parte aérea y en la raíz en el mismo estadio del desarrollo. Sin embargo, para obtener evidencias más contundentes, se necesitarían hacer réplicas de los experimentos. Particularmente, los datos obtenidos a partir de estos experimentos sobre el papel regulador de *AGL19* sobre otros genes necesitarían corroborarse con una línea mutante retrocruzada.

### **La regulación sobre *AGL19* durante el desarrollo de *A. thaliana***

- Los experimentos sobre la expresión de los genes MADS box tipo II en fondos mutantes de los mismos genes también sugieren que *AGL19* es blanco de regulación de *XAL2* en raíces de 7 dps, lo cual se ha observado en experimentos independientes en nuestro laboratorio. Sin embargo, como se menciona arriba, esas evidencias preliminares necesitarían corroborarse con réplicas adicionales.
- La expresión de *AGL19* conducida por el promotor mínimo (175 pb) y el primer intrón no coincide con la expresión observada en experimentos de hibridación *in situ*. Esto sugiere que la región promotora completa (~2670 pb) debe ser necesaria para promover la expresión de *AGL19* como se observa en la hibridación *in situ*. Para corroborar esto, se puede observar la expresión de *AGL19* en las líneas reporteras con diferentes fragmentos de las regiones reguladoras.
- *AGL19* parece estar regulado negativamente por proteínas PcG tanto en la raíz como en la parte aérea, según los experimentos de expresión en fondos mutantes. Sin embargo, esos mismos experimentos sugieren que los complejos PcG no son los únicos responsables de la represión de *AGL19* en la parte aérea.
- La vía de regulación de *AGL19* por proteínas PcG y la vía de regulación por auxinas parecen estar ligadas; específicamente, los experimentos realizados sugieren que las auxinas necesitan la

presencia de CLF o LHP1 para inducir la expresión de *AGL19*.

### **Conclusiones adicionales**

- El anticuerpo anti-XAL2/AGL19 no resulta útil para las técnicas de análisis proteico que hemos planteado en el laboratorio.

## LITERATURA CITADA

- Aichinger, E., C. B. R Villar, R. Di Mambro, S. Sabatini y C. Köhler. 2011. "The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the *Arabidopsis* root." *The Plant Cell*, 23 (3): 1047-60.
- Aida, M., D. Beis, R. Heidstra, V. Willemsen, I. Blilou, C. Galinha, L. Nussaume, Y. S. Noh, R. Amasino, y B. Scheres. 2004. "The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche." *Cell*, 119: 109–120.
- Álvarez-Buylla, E. R., S. Pelaz, S. J. Liljegren, S. E. Gold, C. Burgeff, G. S. Ditta, L. Ribas de Pouplana, L. Martínez-Castilla y M. F. Yanofsky. 2000. "An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97 (10): 5328-33.
- Azpeitia, E., M. Benítez, I. Vega, C. Villarreal y E. R. Álvarez-Buylla. 2010. "Single-cell and Coupled GRN Models of Cell Patterning in the *Arabidopsis thaliana* Root Stem Cell Niche." *BMC Systems Biology*, 4 (1): 134.
- Becker, A. y G. Theissen. 2003. "The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants." *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3): 464-89.
- Benfey, P. N. y B. J. G. Scheres. "Root development." *Current Biology*, 10 (2000): 813-815.
- Bennett, T. y B. Scheres. 2010. "Root Development-two Meristems for the Price of One?" *Current Topics in Developmental Biology*, 91 (10):67–102.
- Benjamins, R. y B. Scheres. 2008. "Auxin: The Looping Star in Plant Development." *Annual Review of Plant Biology*, 59:443-465.
- Bergmann, M., L. Zervas y William F. Ross. 1935. "On Proteolytic Enzymes : VII. The Synthesis of Peptides of l-Lysine and their Behavior with Papain." *Journal of Biological Chemistry*, 111: 245-260.
- Burgeff, C., S. Liljegren, R. Tapia-López, M. Yanofsky y E. Álvarez-Buylla. 2002. "MADS-box Gene Expression in Lateral Primordia, Meristems and Differentiated Tissues of *Arabidopsis Thaliana* Roots." *Planta*, 214 (3): 365–372.
- Cerón, M. 2012. *Estudio del gen agamous-like 19 (agl19) en el desarrollo de la raíz de arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, UNAM, México.
- Coen, E.S. y E. M. Meyerowitz. 1991. "The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development." *Nature*, 353: 31-37.
- Cui, H. y P. N. Benfey. 2009. "Cortex Proliferation: Simple Phenotype, Complex Regulatory Mechanisms." *Plant Signaling & Behavior*, 4 (6): 551–3.
- Czechowski, T., R. P. Bari, M. Stitt, W.-R. Scheible y M. K. Udvardi. 2004. "Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes." *The Plant Journal*, 38 (2):366-379.

- Davies, B., M. Egea-Cortines, E. de Andrade Silva, H. Saedler y H. Sommer. 1996. "Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins." *The EMBO Journal*, 15 (16): 4330-43.
- Derkacheva M. y L. Hennig, 2014. "Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants". *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/ert410
- Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts y B. Scheres. 1993. "Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root." *Development*, 119: 71-84.
- Doerner, P. 2003. "Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals Review." *Current Biology*, 13 (9):R368–74.
- Egea Cortines, M., H. Saedler y H. Sommer. 1999. "Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*." *The EMBO Journal*, 18(19): 5370–9.
- Fan, H.Y., Y. Hu, M. Tudor y H. Ma. 1997. "Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins." *The Plant Journal*, 5: 999-1010.
- de Folter, S., R.G.H. Immink, M. Kieffer, L. Parenicova, S.R. Henz, D. Weigel, M. Busscher, M. Kooiker, L. Colombo, M.M. Kater, B. Davies y G. C. Angenenta. 2005. "Comprehensive Interaction Map of the Arabidopsis MADS Box Transcription Factors." *The Plant Cell*, 17: 1424-33.
- de Folter, S y G. C. Angenent. 2006. "trans meets cis in MADS science." *TRENDS in Plant Science*, 11(5): 224-31
- Fonseca-Salazar, G. 2011. *Caracterización funcional de AGL17 en el desarrollo radicular de Arabidopsis thaliana*. Tesis de maestría, UNAM, México.
- Galinha, C., H. Hofhuis, M. Luijten, V. Willemsen, I. Blilou, R. Heidstra y B. Scheres. 2007. "PLETHORA Proteins as Dose-dependent Master Regulators of *Arabidopsis* Root Development." *Nature*, 449 (7165): 1053–7.
- Garay-Arroyo, A., M. P. Sánchez, B. García-Ponce, E. Azpeitia y E.R. Álvarez-Buylla. 2012. "Hormone symphony during root growth and development." *Developmental Dynamics*, 241 (12): 1867-85.
- Garay-Arroyo, A. E. Ortiz-Moreno, M. P. Sánchez, A. S. Murphy, B. García-Ponce, N. Marsch-Martínez, S. de Folter, A. Corvera-Poiré, F. Jaimes-Miranda, M.A. Pacheco-Escobedo, J. G. Dubrovsky, S. Pelaz y E. R. Álvarez-Buylla. 2013. "The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression." *The EMBO Journal*, 32: 2884 – 2895.
- Gómez-Mena, C., S. de Folter, M.M.R. Costa, G.C. Angenent y R. Sablowski. 2005. "Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis." *Development*, 132 (3): 429-38
- Gramzow, L y G. Theissen. 2010. "A hitchhiker's guide to the MADS proteins in plant." *Genome Biology*, 11:214.
- Grieneisen, V. A., J. Xu, A. F. Marée, P. Hogeweg y B. Scheres. 2007. "Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth." *Nature*, 449(7165): 1008-13.

- Heck, G.R., S. E. Perry, K. W. Nichols y D.E. Fernandez. 1995. "AGL15, a MADS-domain protein expressed in developing embryos." *Plant Cell*, 7: 1271-82
- Hennig, L. y M. Derkacheva. 2009. "Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players?" *Trends in genetics : TIG* 25(9): 414–23.
- Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto y T. Korenaga.1999. "Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999." *Nucleic acids research*, 27 (1): 297-300.
- Honma, T. y K. Goto. 2001. "Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs." *Nature*, 409: 525-529.
- Immink, R. G. H., I. a N. Tonaco, S. de Folter, A. Shchennikova, A. D. J. van Dijk, J. Busscher-Lange, J. W. Borst y G. C. Angenent. 2009. "SEPALLATA3: The 'Glue' for MADS Box Transcription Factor Complex Formation." *Genome Biology*, 10 (2): R24.
- Immink, R. G. H., K. Kaufmann y G. C. Angenent. 2010. "The 'ABC' of MADS protein behaviour and interactions". *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21 (1): 87-93.
- Ivanov, V. B. y J. G. Dubrovsky. 2013. "Longitudinal Zonation Pattern in Plant Roots: Conflicts and Solutions." *Trends in Plant Science*, 18 (5): 237-43.
- Jack, T. 2001. "Relearning our ABCs: new twists on an old model." *TRENDS in Plant Science*, 6 (7): 310-16.
- Jack, T. 2004. "Molecular and Genetic Mechanisms of Floral Control." *The Plant Cell*, 16(S1): S1-S17.
- Jiang, K. y L. J. Feldman. 2005. "Regulation of root apical meristem development." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 485–509.
- Kaufmann, K., R. Melzer y G. Theissen. 2005. "MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants ." *Gene*, 347 (2): 183-198.
- Kaufmann, K., J. M. Muiño, R. Jauregui, C.A. Airoidi, C. Smaczniak, P. Krajewski y G.C. Angenent. 2009. "Target genes of the MADS Transcription Factor SEPALLATA3: Integration of Developmental and Hormonal Pathways in the *Arabidopsis* Flower." *PLOS Biology*, DOI:10.1371/journal.pbio.1000090
- Kim, S. Y., T. Zhu y Z. R. Sung. 2010. "Epigenetic regulation of gene programs by EMF1 and EMF2 in *Arabidopsis*." *Plant physiology*, 152 (2): 516-28.
- Kim, S. Y., J. Lee, L. Eshed-Williams, D. Zilberman y Z. R.Sung. 2012. "EMF1 and PRC2 cooperate to repress key regulators of *Arabidopsis* development." *PLoS genetics*, 8 (3): e1002512.
- Lafos, M., P. Kroll, M. L. Hohenstatt, F. L. Thorpe, O. Clarenz y D. Schubert. 2011 "Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during *Arabidopsis* differentiation." *PLoS genetics*, 7: 4: e1002040
- Lamb, R. S., T. A. Hill, Q.K. Tan y V. F. Irish. 2002. "Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes." *Development*, 129: 2079-2086.
- Lee, J. y I. Lee. 2010. "Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator". *Journal of Experimental Botany*, 16 (9): 2247-2254.
- Lee, J., M. Oh, H. Park y I. Lee. 2008. "SOC1 Translocated to the Nucleus by Interaction with AGL24 Directly Regulates *LEAFY*." *The Plant Journal*, 55 (5): 832–43.

- Lenhard, M. y T. Laux. 1999. "Shoot Meristem Formation and Maintenance." *Current Opinion in Plant Biology*, 2 (1): 44-50
- Ljung, K., A. K. Hull, J. Celenza, M. Yamada, M. Estelle, J. Normanly y G. Sandberg. 2005. "Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots." *The Plant Cell Online*, 17 (4): 1090-1104
- Mähönen, A. P., K. ten Tusscher, R. Siligato, O. Smetana, S. Díaz-Triviño, J. Salojärvi, G. Wachsman, K. Prasad, R. Heidstra y B. Scheres. 2014. "PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses." *Nature*: dx.doi.org/10.1038/nature13663.
- Martin, C. y Y. Zhang. 2005. "The diverse functions of histone lysine methylation." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 838–49.
- Masiero, S., L. Colombo, P. E. Grini, A. Schnittger y M. M. Kater. 2011. "The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction." *The Plant Cell*, 23 (3): 865-72.
- de Meaux J., J. Y. Hu, U. Tartler y U. Goebel. 2008. "Structurally different alleles of the ath-MIR824 microRNA precursor are maintained at high frequency in *Arabidopsis thaliana*." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105: 8994-9.
- Messenguy F. y E. Dubois. 2003. "Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development." *Gene*, 316:1-21.
- Nakajima, K., G. Sena, T. Nawy, y P. N. Benfey. 2001. "Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning." *Nature*, 413 (6853): 307-11.
- Nakajima, K. y P.N. Benfey. 2002. "Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root." *Plant Cell (Suppl)* 14: S265–S276
- Ng, M. y M. F. Yanofsky. 2001. "Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by APETALA1." *Plant Cell*, 13: 739-753.
- Ochoa-Espinosa, A. 2002. *Análisis funcional preliminar de AGL19, un gen MADS-box específico de la raíz de Arabidopsis thaliana (L) Heynh.* Tesis de licenciatura, UNAM, México.
- Parenicová, L., S. de Folter, M. Kieffer, D. S. Horner, C. Favalli, J. Busscher, H. E. Cook, R. M. Ingram, M. M. Kater, B. Davies, G. C. Angenent y L. Colombo. 2003. "Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in *Arabidopsis*: New Openings to the MADS World." *The Plant Cell*, 15: 1538-1551.
- Pelaz, S., G. S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman y M. F. Yanofsky. 2000. "B and C Floral Organ Identity Functions Require SEPALLATA MADS-box Genes." *Nature*, 405: 9–12.
- Pelaz, S., R. Tapia-López, E. R. Álvarez-Buylla y M. F. Yanofsky. 2001. "Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*." *Current Biology*, 11(3): 182-184.
- Perales, M. y G. V. Reddy. 2012. "Stem Cell Maintenance in Shoot Apical Meristems." *Current Opinion in Plant Biology*, 15 (1): 10-6
- Perilli, S., R. Di Mambro y S. Sabatini. 2012. "Growth and Development of the Root Apical Meristem." *Current Opinion in Plant Biology*, 15 (1): 17–23.
- Peterson, S. V., A. I. Johansson, M. Kowalczyk, A. Makoveychuk, J. Y. Wang, T. Moritz, M. Grebe, P. N. Benfey, G. Sandberg y K. Ljung. 2009. "An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis." *The Plant Cell Online*, 21 (6): 1659-1668.

- Pien, S. y U. Grossniklaus. 2007. "Polycomb Group and Trithorax Group Proteins in *Arabidopsis*." *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1769 (5-6): 375–82.
- Pollock, R. y R. Treisman. 1991. "Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets." *Genes and Development*, 5: 2327-41.
- Reményi, A., H. R. Schöler y M. Wilmanns. 2004. "Combinatorial Control of Gene Expression." *Nature Structural & Molecular Biology*, 11 (9): 812–5.
- Riechmann, J. L., B. A. Krizek y E. M. Meyerowitz. 1996. "Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10): 4793-98.
- Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman y G. Yu. 2000. "Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes." *Science*, 290(5499):2105-10.
- Riechmann, J. L. y E. M. Meyerowitz. 1997. "MADS Domain Proteins in Plant Development." *Biological Chemistry*, 378(10): 1079-1118.
- Rubini, J. R., R. R. Becker y M. A. Stahmann. 1953. "Effect of Synthetic Lysine Polypeptides on Rabbit Blood Coagulation." *Experimental Biology and Medicine*, 82 (2): 231-234.
- Rutherford, R., y P. H. Masson. 1996. "Arabidopsis thaliana sku mutant seedlings show exaggerated surface-dependent alteration in root growth vector." *Plant physiology*, 111(4): 987-98.
- Sabatini, S., D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, T. Guilfoyle, J. Malamy y B. Scheres. 1999. "An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root." *Cell*, 99(5): 463-472.
- Sabatini, S., R. Heidztra, M. Mildwater y B. Scheres. 2003. "SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem." *Genes and Development*, 17: 354-358.
- Sarkar, A. K., M. Luijten, S. Miyashima, M. Lenhard, T. Hashimoto, K. Nakajima, B. Scheres, R. Heidstra y T. Laux. 2007. "Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers." *Nature* 446, 811–814.
- Scheres, B., H. Wolkenfelt, V. Willemsen, M. Terlouw, E. Lawson, C. Dean y P. Weisbeek. 1994. "Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root-meristem initials." *Development*, 120, 2475–2487.
- Schönrock, N., R. Bouveret, O. Leroy, L. Borghi, C. Köhler, W. GUISSEM y L. Hennig. 2006. Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes & development*, 20(12), 1667–78.
- Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc y G. Cavalli. 2007. "Genome regulation by polycomb and trithorax proteins." *Cell*, 128(4), 735–45.
- Schuettengruber, B. y G. Cavalli. 2009. "Recruitment of Polycomb Group Complexes and Their Role in the Dynamic Regulation of Cell Fate Choice." *Development*, 136 (21): 3531–42.
- Sevilem, J., S. Miyashima y Y. Helariutta. 2013. "Cell-to-cell Communication via Plasmodesmata in Vascular Plants." *Cell Adhesion & Migration*, 7 (1): 1-6
- Shen, W.-H. y L. Xu. 2009. "Chromatin Remodeling in Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis thaliana*." *Molecular Plant*, 2 (4): 600–9.

- Shore, P. y A. D. Sharrocks. 1995. "The MADS-Box Family of Transcription Factors." *European Journal of Biochemistry*, 229(1): 1-13.
- Simon, J. A. y R. E. Kingston. 2009. "Mechanisms of Polycomb Gene Silencing: Knowns and Unknowns." *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 10 (10): 697–708.
- Smaczniak C., R.G.H. Immink, J.M. Muiño, R. Blanvillain, M. Busscher, J. Busscher-Lange, Q.D. (P.) Dinh, S. Liu, A.H. Westphal, S. Boeren, F. Parcy, L. Xu, C.C. Carles, G.C. Angenent y K. Kaufmann. 2012. "Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (5): 1560-65.
- Stahl Y., R. H. Wink, G. C. Ingram y R. Simon. 2009. "A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems." *Current Biology*, 19: 909-14.
- Tapia-López, R., B. García-Ponce, J. G. Dubrovsky, A. Garay-Arroyo, R. V. Pérez-Ruíz, S.-H. Kim, F. Acevedo, S. Pelaz y E. R. Alvarez-Buylla. 2008. "An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*." *Plant Physiology*, 146 (3): 1182-92.
- Theissen, G. 2001. "Development of floral organ identity: stories from the MADS house." *Current opinion in plant biology*, 4(1): 75-85.
- Theissen G. y H. Saedler. 2001. "Floral quartets." *Nature*, 409: 469-71.
- Turck, F., F. Roudier, S. Farrona, M.-L. Martin-Magniette, E. Guillaume, N. Buisine, S. Gagnot, R. a Martienssen, G. Coupland y V. Colot. 2007. "*Arabidopsis* TFL2/LHP1 Specifically Associates with Genes Marked by Trimethylation of Histone H3 Lysine 27." *PLoS Genetics*, 3 (6): e86.
- Van den Berg, C., V. Willemsen, G. Hendriks, P. Weisbeek y B. Scheres. 1997. "Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem." *Nature*, 390(6657): 287-89.
- Voinnety, O., S. Rivas, P. Mestre y D. Baulcombe. 2003. "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." *The Plant Journal*, 33: 949-56.
- Wagner, D., Sablowski, R.W., y Meyerowitz, E.M. 1999. "Transcriptional activation of PETALA1 by LEAFY." *Science*, 285: 582-84.
- Weake, V. M. y J. L. Workman. 2008. "Histone ubiquitination: Triggering gene activity." *Mol. Cell*, 29, 653–63.
- Welch, D., H. Hassan, I. Blilou, R. Immink, R. Heidstra, y B. Scheres. 2007. "Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action." *Genes and development*, 21(17): 2196-2204.
- Wildwater, M., A. Campilho, J. M. Perez-Perez, R. Heidstra, I. Blilou, H. Korthout, J. Chatterjee, L. Mariconti, W. Gruissem y B. Scheres. 2005. "The RETINOBLASTOMA-RELATED Gene Regulates Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Roots." *Cell*, 123 (7): 1337–49.
- Xu, L. y W.-H. Shen. 2008. "Polycomb Silencing of KNOX Genes Confines Shoot Stem Cell Niches in *Arabidopsis*." *Current Biology*: CB 18 (24): 1966–71.
- Zhang H. y B.G. Forde. 1998. "An *Arabidopsis* MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture." *Science*, 279 (5349): 407-409.

- Zhang, X., S. Germann, B. J. Blus, S. Khorasanizadeh, V. Gaudin y S. E. Jacobsen. 2007a. "The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation." *Nature Structural & Molecular Biology*, 14: 869-71 <http://epigenomics.mcdb.ucla.edu/LHP1/project.html>
- Zhang X., O. Clarenz, S. Cokus, Y. V. Bernatavichute, M. Pellegrini, J. Goodrich y S. E. Jacobsen. 2007b. "Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation in *Arabidopsis*." *PLoS Biol* 5(5): e129. doi:10.1371/journal.pbio.0050129 <http://epigenomics.mcdb.ucla.edu/H3K27m3/>
- Zobel, O., W. Faigl, H. Saedler y T. Munster. 2010. "MIKC\* MADS-box proteins: conserved regulators of the gametophytic generation of land plants." *Mol. Biol. Evol.*, 27: 1201-11.

## APÉNDICE 1 - OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Oligo

Secuencia 5'-3'

### RT-PCR

AGL12-RT-F	TGG TCG TGG TTC TTC TTC TGC TAC
AGL12-RT-R	TGT CTC CAT GAC TGC GAA GTT AGC
AGL14 F458	GTA GAA AGA TAT CAA AAG CGA A
AGL14 R458	GGA GGA AAC TTT TTG AAG TGT
OEAB 155	AAG ATG GAG GAG CAA GAA C
OEAB 168	CTT AGC TGC AGC CTA ACC TG
AGL19 F430	GAG ACG AAA CAT CTG GAT TG
AGL19 Rev North	ACG TTG ATT GTG ATG ATG C
AGL16 F 4002	CAT AGA GAG ATA CAG CGA TGC
AGL16 R 4003	CAT GAT CAT GCT GCG GTT GGC
SOC 1 F Mitzi	GGA GCT GGC GAA TTC ATA AAG
SOC 1 R Mitzi	AAG CAG AGA GAG AAG AGA CGA GTG
OEAB 164	GAT CGA GCA ACA ACA ACT ATT G
OEAB 167	TTATTCGTTTGCTCTTGGTGGAG
LHP1_JSF_qF	GCATCTGTATCAGACAATGTCCA
LHP1_JSF_qR	TTCAATCAGGAGATGAGGATTGT
CLF QRT F	AACCAAGTGAGGAGAAGGTCAA
CLF QRT R	CTCTTTGGGCAACCGCAGTA

### Construcciones

AGL19F1A	GGC GCG CC GTT CAC GAC GAT GAG AAT CGC
AGL19R4XM	CTC GAG CCA CCG CC CGT TTT GCC CCT CAC CAA CC
AGL19TOPO-D	CAC CTA AAG AAG AAG GTT CAC GA

## **APÉNDICE 2 - SECUENCIA DE AGL19**

AT4G22950.1 (Recuperada de TAIR, 15 de enero de 2013)

región intergénica

intrón

exón

taaagaagaaggttcacgcagatgagaatcgcttggtgagatctaaccgtctgcgaaatcggagaagacacac tttgctgaa  
atttctcaagaagtggtcaaggaagcaagaaaagtgagcatgggactggcttttataagcagcattgagtgacgagaaca  
aaattgattttgacgaaaccgtaattagtagtggtttttagtaaaccgggtttgttatgacggcctcaagctggccccgtattgg  
tggctctattcaagcgtgtaaaataaaattcaacatttgacccttatgttacgcctacccttatgtaggcgaatctttcaact  
gttagtgaataaaaaactctaatacatggatttttagagaccaatcaaatatttatcagcggagctcatgtaccataatattata  
atagaataaaaaactttatgacatatataaacggtaataagtaaattagttaaaacggttatgctaagaatcatataacatcgaa  
aaagcagtagtagcaagatcgtttgaagttttatctataagaaaagatcgatggaattattttaagatttttagttcagatggt  
tcacgcagaattttatttgtattgggtagtgacttcacaaatagcataaaggaaccagcttacgtaagagaatattttggttt  
gaattttcaaattacatataggtagaaaatattcaaatatatagaagacgaccattgatagattttggatattagataattgga  
tgtaaaataactactccttttaggctaaccctacacttgcttttctgtaactatgggaagatggtatagtagtatcattacatt  
gattctcacgtaggtttttttctatatattttgttagggaaatgcaaattaacaaagcatttttagtacggttcatttagtgaa  
agggatgtggtcctctcctagcgtgcgacacctgttccaagatataagaataaaacaaatggtatttgtaacgtattattgt  
gaaaagcatccaatagtggaataaccacttgcttatgccaagattataagataatttaaatcgaggaaacgaataaaagtaaaa  
aagctagaagggtggtggtataaaattacaagaaacgtatcaacaagaggcgaagatgacataatattgacatgtgaaattga  
aacatatacaagtagctgttactgttttattttgtgcgaaggctgtgttataataaaatttttattgtacggcgggttatt  
tatcacagattaaagttctctcttttatttatcgcataaaagttctgcttctctgtggaaaataaaaacgagttttggt  
tcaacttcttctcaaatcaagagactattataagaagtaaaacagcaattgttaattttgtatctcctgatcagatatata  
tagacttaaatatgcacataagtgactgaaataaatttgtatccatttttgtgtcgaagcttttttaatttcttaaaatagat  
aacaagatcggatggtgcacgtttgaagagaagcgaagatcggacggtgtgtcctaactacttattttgtccgatatgagct  
ggcaacggacaaggatgcttgatgtcctcaggtggcactagtgaaaccactttgacggacaccggatctgtaggttgtcgg  
ttaatatggacacgtgccaagatctccccattacctacataatataatctccttcaacttaattatggttaagatgtaagt  
ttgcatttactccaacaatataaaattaattaaccatacctagactagatataccaaaaatcatgtaaaattaagaaaa  
tatgatacgaatataatataatataatataatatttttcttacgattgtacaaagttagataaattatgggtttattgggttat  
aggcttttagagtaacataataattttaaaaaaaaactgattatgcaattaaattcgaaaacgaaataatataatagcatga  
ttcttttcttgtcacacttcattatagattatttctccccgtcaacaattattgcacttacataattttattactattata  
gattggccttgaatttgcattagaatttttaccaaaagaagaagaattacgtaatgcaatttctaaaaataaaagtgatg  
tactactaggcaggtctaggtttatatagactatccgtagccataagagaaaaaggcaatttaataatataatgcaaaaaag  
aataaggctatgatgtcaaattatcaatcaaaaacacttagtttttcttcttcttctctccccctcctcatcataaa  
tctagggctttcaagaatctctatcacaccctctcccaaaatctgcctatttttctctctccactcacttatagaaga  
tagattatacacatagagagacacatcaatccaagctcacttacaaatagggtaaatctcgaattccatcttctgtttg  
tggttgatccatattctatttacagagaaaaataaattcaaatccatatcttctttatggttcttgggtcactttttagttg  
gagtatgtcttcttttatgttcttctgatctgaaccattatccatataatagttctaatttctgggtactattcgttttat  
ttggttgaataaataactgtctctgtgtgattttacacagaatatttatataagaataaaactagaagtaagg**ATGGTGA**  
**GGGGCAAACGGAGATGAAGAGGATAGAGAACGCAACAAGCAGGCAAGTGACGTTTTTGAAGAGAAGAAATGGACTCTTGAA**  
**GAAAGCCTTCGAATTATCGGTCTTTGTGATGCTGAAGTTGCTTTGGTTATCTTCTCTCCAAGATCCAAACTCTATGAGTTC**  
**TCTAGCTCTAG**gtatgtccctttttgtttatttacttgtgaaaaacgatttgcactgatcaatttttggatccgattcga  
ctagaggggctaatacgggtccaattttcaccgtaataagtagattcattggattttttggttatatgattatcaagatctga  
taagagagttatataatgggtgattttgttttcatataaaagtagatcggagtaagaaattagactacttttataggactgac  
actaatgatactttttgtagttgtagtcatcagatttttatggcactacaacctatgaaacgtgtgtgtatatacaagtatat  
gtatacttgttatgagccatccattttcgtgtagatgagttgatcttctgacttctctatttactgagatattttgaa  
atgcaaaacactttttttgagatacttgatgtttatccgtttgtaagaaagatgagtttgacaccagtgctactgctagg  
ctatgtgtatgtaacaatatctatgacttaattttgagtataaaaggtccttatattgttcaaataggactgtacatac  
tatcaacatgtttataaaatttagaaaaatagtcattttcaggattaacaataaatttcttattttggatataatgtccacat  
gtatctgcctctgtgtaatacaaatgcatatacagtggtgtgtgtagtagaaatataatcatatagatgatgacagatata  
tctacataatgctagggatgagacgaagcattgtagtaaataatgctagttttgatcatggtttgcattatacatatcaata  
aatatatttgcacatgtttaaatacagacatgatgagttcatgatataacacattctcattcatgagtttacaataataca  
gatgcttctttgtatatgtgtatgtggatgtatatataatgggaaactttatatgtatgatgaatataaaaatttagcaa  
caaattaagaggctactattttgtcttaatttttaacacacaccggttaattaaattgagcattaactgtagagaagtcacgcatg  
tgtgtagatcagaattattttaaattcttctacgttttcttattttattctttgggatataaatttaggtgtaataaatat  
agatttgattataaagattaaagcacttaaacattaaactatgaaatgtcttttgagcaaaccaagagaggttaatacacaat  
taactaggatttcttaaccacataatccttgtgttatcgcactgcttaatgatactctaaaggttttagcttattaatttca  
atattcgatttgagcgtgtccatgtgcatctatataacttgtctctttatatgtatattggcgtagccatgtaaaatatt  
gatgcatgatttgaatcataaatcttaaatacaatataatttgatattttctgcattttgaaagtaagaggaacactctttg  
ttttcatataaacctattattttgttttagaaaataaacatgtatatattatataatggctcctgaaacatgagatcatatccta  
acttttgggaacaatgcaactaagccatatctgcatgattctctgtgattctctctgcttcacagttcagtttcaatatttaa

cggtcataaatcatgatgatataattctaaatgtcaataaataaatggaatttatttatttagtcacataagtataactt  
ttcacacatatatgcatatatagcttcaattggttttgactccacattttcgtttcttttattttcatttgattcatttcag  
TATAGCAGCAACAATTGAACGCTATCAGAGACGAATAAAAGAAATTGGGAATAATCATAAGAGAAATGATAATTCTCAGgta  
aattctcattcatatttcgggttttacatattgtaaactgacgatattttttataaatatttttttgtgtgttccaaat  
ttaaccgactatactacttttacttgacagCAAGCGAGAGACGAAACATCTGGATTGACAAAAAAGATTGAACAGCTAGAGA  
TATCTAAACGgttttgaaactcaaaatttcttatgagaaacgtttatataaaattataaacgaactataagatactttgatt  
gttgaataattgcagAAAATTGCTTGGAGAAGGCATTGATGCATGTTCCATCGAGGAGCTGCAACAGTTAGAGAATCAGTTG  
GACCGAAGCTTGAGCAGGATAAGAGCCAAGAAGgtattatttatactcatttccagtgataatggaaattaggattaagata  
ctataatcgttttccgcaattttagaatattaagatttgatgagaaaattttatgtttacttaatatgatggaagttatta  
tacetgtgtttggctctttgctttacaaaaataattttaccatactaatctagtgatctacacaagtaattaaaagata  
gttaaaccttagattcaattcatttagcaaaaaaaaaattcatcatttttagttattattatatatgcaataccgttaacaat  
tgaatggtttgcattgctcgtaataatcatgcatgcatgcttctttatttaattgctatgtgaaattgtgaatggtttgc  
ggcctcactaatcatatcatcagcctcattgaggccatgcaacattgagtaattttattgatgattcctcaatataacattg  
aaacaatgagatcaacaacgcacttagtgtaggatacttagttgaaagattccttggatatacatgcaaatgtcttcat  
aatctattaataatgtgaaatttgcttatagattgttcgtatattcaattattttcagTACCAATTACTCCGTGAAGAAAT  
TGAGAAGTTGAAGGCAGAGgtaaaacacaattcacttaactttttttgcttctctaaatgtaattacatatatag  
agtcatcctgtatctcgttattaacttcatataactgttcttgtcaaaatcttactagGAGAGGAATCTCGTTAAGGAA  
AATAAAGATCTGAAGGAGAAGgtacagtttttagcatcttataaaaggattattttttatgatatgtaaatatgttgcag  
agaagagtttttccggtgaaattgtgaaaataaaaagTGGCTTGGAAATGGGAACAGCAACAATAGCATCATCAATCAACGT  
TATCATCATCAGAAGTGAACATAGATGACAATATGGAAGTGGAGACTGGTTTGTTCATTGGACCTCCTGAGACAAGACAATC  
CAAAAAATCCCTCCTCAAAATTAAtcttacaacttcttcaaaaagaatgttttaa

## APÉNDICE 3 - MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

#### Condiciones estándar de crecimiento

Antes de sembrar las semillas, se estratificaron por 3 días en agua estéril a 4°C. El medio de crecimiento fue Murashige-Skoog (MS) 0.2X al 1% de agar y 1% de sacarosa. Se dejaron germinar en una cámara de crecimiento en cajas de Petri en posición vertical programada en un fotoperíodo de día largo (DL; 16 h luz por 8 h oscuridad) a 22°C y con una radiación de 110  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A los dos días se marcaron las semillas que no germinaron para descartarlas del ensayo.

### DNA Y RNA

#### Extracción de RNA con TRIzol (Invitrogen)

Se mantienen las muestras en nitrógeno líquido. Se muelen en el tubo sin dejar que el tejido se descongele. Se pueden usar pistilos azules, o perlas estériles y la trituradora (3 pulsos de 2 segundos). Se agregan 600  $\mu\text{l}$  de TRIzol. Cuidar que el tejido quede embebido en TRIzol antes de que se descongele por completo. Se centrifugan los tubos a 13 krpm por 15 minutos a 4°C. Se toma el sobrenadante, cuidando de no tomar el precipitado. Se añaden 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol; se agita en el vórtex hasta que la solución se haga blancuzca. Centrifugar a 13 krpm por 10 minutos a 4°C. Se toma la fase acuosa (la superior) e ir pasando con pipeta cuidadosamente a un tubo nuevo en hielo. Se agrega el mismo volumen de isopropanol que lo obtenido en la fase acuosa y se agita por inversión. Se incuba de 15 a 20 minutos a -20°C, o bien 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugan las muestras a 12 krpm por 10 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. Se lava la pastilla con 1 ml de etanol a 70% agitando el tubo en el vórtex. Se centrifuga 5 minutos a 13 krpm a 4°C y se desecha el sobrenadante. Se da un espín en centrífuga para bajar los remanentes de líquido y recolectarlos con pipeta procurando no llevarse nada de la pastilla. Se resuspende la pastilla en 20  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular, pipeteando vigorosamente para que la pastilla se resuspenda bien. Se incuba a 65°C por 5 minutos. Se da un espín en centrífuga y revisar que no hayan detritos en el fondo. Se pasa a un tubo nuevo el sobrenadante. Se almacena a -70°C.

#### Síntesis de cDNA a partir del RNA extraído

Luego de estos pasos, se prueba la integridad del RNA corriendo un gel de agarosa al 1% y se calibran los niveles de carga usando lecturas de Nanodrop e intensidades relativas de las bandas en el gel (medidas con el software KodakMI). Se sintetiza el cDNA a partir de los RNA usando la enzima SuperScript II siguiendo las indicaciones del fabricante. El volumen del cDNA resultante se quintuplicó con agua de grado molecular.

### **Protocolo para adición de *overhangs* de adenina (*tailing*)**

Se dejan incubar las muestras en una mezcla de 10 ul con DNA 2-7ul, Buffer PCR 1ul, MgCl 0.3ul, dATPs [2.5mM] 0.8ul, 1 ul Taq Polimerasa.

### **Protocolo de miniprep casera**

Se dejan creciendo los cultivos de bacterias toda la noche y, al día siguiente, se separan en tubos Eppendorf de 1.5ml. Se aumenta la densidad de los cultivos centrifugando a 13 krpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante y repitiendo el paso hasta usar todo el cultivo y tener una pastilla muy concentrada. Se agregan 200ul de agua estéril y se disuelve la pastilla. Se añaden 200ul de NaOH 1M y SDS 10% y se mezclan las fases. Se añaden 150ul de acetato de K 3M y ácido acético glacial 11.5 % y se agita suavemente. Opcionalmente, se centrifuga la muestra a 14 krpm por 5 minutos y se pasa el sobrenadante a un tubo limpio. Se agregan 500 ul de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y se agita en vórtex. Se centrifuga a 14 krpm por 5 minutos y se pasa la fase superior a un tubo nuevo. Se añaden 1000 ul de etanol 100% y se mezcla suavemente. Se centrifuga a 14 krpm por 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Se añaden 500 ul de etanol 70% frío y se agita en vórtex para lavar la pastilla. Se centrifuga a 14 krpm por 5 minutos. Se deja secar el etanol y la pastilla se disuelve en agua estéril, preferentemente en volúmenes pequeños (50 ul).

### **PCR para colonias bacterianas**

Se seleccionan las colonias a probar. Se siembra una porción de la colonia en una placa con el medio y el antibiótico correspondiente y se coloca lo que resta en un tubo eppendorf con 50 ul de buffer de lisis (1% Tritón X-100, 20mM Tris\*Cl pH 8.0, 2mM EDTA pH 8.0). Se calienta a 95°C por 10 minutos. Se centrifuga la solución a 14 krpm por 10 minutos y se toman 4ul de sobrenadante para la PCR. Se corre la PCR con los oligos y condiciones necesarias según el producto buscado.

### **Extracción de DNA genómico (versión larga)**

Se muele el material biológico (tejido de plantas en este caso) y se agregan 700ul de buffer de extracción. Se incuba la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos agitando cada 3 minutos en el vórtex. Se agregan 700ul de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se agita en el vórtex. Se incuba por 19 minutos y se centrifuga a 14 krpm por 10 minutos. Se lava la pastilla con etanol 70%. Se centrifuga a 14 krpm por 5 minutos. La pastilla se deja secar y se resuspende en 40ul de agua grado molecular. Se puede agregar 1 ul de RNasa A 10ug/ul.

Buffer de extracción: Tris-Hcl 1M pH 7.5, NaCl 5M, EDTA 0.5 M pH 8, SDS 10%.

## **ANÁLISIS DE MATERIAL BIOLÓGICO**

### **Reactivo de Hersch**

15 ml de ácido láctico, 15 ml de fenol, 15 ml de aceite de clavo, 7.5 ml de xileno y 1.5 g de hidrato de cloral.

### **Solución X-Gluc**

Amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0 100mM, EDTA 10mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM, ferrocianuro de potasio, tritón X-100 0.5 mM, X-Gluc em DMSO 0.5 mg/ml.

### **Tinción con X-Gluc**

Se colocan los tejidos o raíces en la solución de X-Gluc y se incuban a 37°C por una noche o se pueden revisar cada media hora en el caso de raíces. Se lavan los tejidos con etanol al 70% cuatro veces. Si se trata de tejidos verdes, se elimina la clorofila con acetona: metanol 1:3 las veces que sea necesario haciendo cambios de mezcla. Al aparecer el color azul, se lava con buffer Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  60mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM).

### **Aclaración de raíces de *Arabidopsis thaliana***

Las plantas se incuban en una solución de aclaración (glicerol 30%, DMSO 2%) al menos 1 día y se montan en la solución de aclaración y montaje de NaI (NaI 4.2M,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  8mM, glicerol 65% y DMSO 2%)

## **TRANSFORMACIÓN**

### **Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens***

Se crecen plantas de *A. thaliana* hasta que florezcan. Se pueden cortar el primer escapo si se quieren más flores. Se prefieren plantas con mayoría de botones inmaduros. Se cultivan 1000 ml de la cepa deseada de *Agrobacterium* una noche. Se centrifuga el cultivo por 10 minutos a 4 krpm y se resuspende a  $\text{OD}_{600}=0.8$  en sacarosa 5% hasta el volumen requerido para sumergir la planta en la cámara de vacío. Se vierte la solución en la cámara de vacío y se agrega Silwet L-77 a una concentración de 0.05%. Se sumergen los botones y las ramas en el cultivo y se enciende la cámara de vacío por 5 minutos. Se enjuagan las partes sumergidas y las plantas se colocan bajo un domo (puede ser de manera horizontal) por un día. Se dejan crecer hasta que produzcan semillas. Se seleccionan las semillas transformantes sembrándolas en placas con el antibiótico correspondiente.

### **Infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* para expresión transitoria en tabaco**

Se hace un cultivo de la cepa p19, supresora de la silenciación. Se crece la cepa de interés a la par de la p19 toda la noche en 5 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes. Se centrifuga todo el volumen del cultivo a 4 krpm por 5 minutos. Se resuspenden las cepas por separado en 2 ml de una solución 100 mM de  $\text{MgCl}_2$  (opcionalmente, con acetoseringona 150ug/ml). Se mide la densidad

óptica de las células en suspensión a OD600. Se hace una mezcla p19:cepa de interés a 10:1. Con una jeringa, se infiltra la cara abaxial de una hoja de una planta de *Nicotiana benthamiana*, de 3-5 semanas de edad, hasta que el líquido ocupe todo el órgano.

## PROTEÍNAS

### Extracción de proteínas

Se homogenizan las muestras con nitrógeno líquido y se pasa el tejido a un tubo con 1-2 ml de buffer de extracción, según la cantidad de tejido. Se sónica la muestra 3 veces por 10 segundos en el nivel 12. Se incuba a 4°C en agitación. Se centrifuga a 13 krpm por 10-15 minutos a 4°C. Se cuantifican las proteínas (Bradford) y se almacenan alícuotas a -80°C.

Buffer de extracción: Tris-HCl pH 7.5 25mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, EDTA 5mM, Tritón X-100 0.4%, DTT 1mM, NaCl 0.5M, PMSF 1mM.

### Geles de acrilamida

Gel separador: Acrilamida 40%, Tris pH 8.8 1.5 M, SDS 10%, APS 10%, TEMED 0.005%.

Gel concentrador: Acrilamida 40%, Tris pH 6.8 1M, SDS 10%, APS 10%, TEMED 0.05%.

### Protocolo de Dot-blot

Se pre-humedece la membrana y se coloca en la cámara de vacío. Se colocan las muestras de proteína a la concentración deseada, lo suficiente para generar una gota de líquido, y se enciende la máquina de vacío.

### Protocolo de Western-Blot

Luego de obtener un gel con el corrimiento de las proteínas deseadas, se prehumedece la membrana 10 minutos en agua. Con una relación 10v/250mA, se hace la transferencia por 2 horas y media. Se tiñe la membrana con rojo de Ponceau. Se bloquea la membrana durante una hora con leche al 3% en PBS 0.05%. Se agrega el primer anticuerpo con el título requerido. Se incuba a 4°C toda la noche. Se hacen 3 lavados de 10 minutos o de 4-5 minutos con PBST 0.05% (NaCl 5M, Tris pH8 2M, Tween). Se agrega el segundo anticuerpo según el título deseado y se incuba por una hora. Se hacen 3 lavados por 10 minutos con PBST 0.05%.