



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Caracterización de gen Argonauta 5 en *Arabidopsis
Thaliana* creciendo en deficiencia de fósforo**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

BEATRIZ PAREDES ANGULO

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. OSWALDO VALDES LÓPEZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel.
Vocal:	Dr. Ricardo Mejía Zepeda
Secretario:	Dr. Oswaldo Valdés López
Suplente:	Mtra. María Del Socorro Sánchez Correa
Suplente:	Mtra. María Del Roció Reyero Saavedra

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas, a cargo del Dr. Oswaldo Valdés López en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Sustentante

Beatriz Paredes Angulo

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

DEDICATORIAS

A los mejores padres que dios me pudo haber dado Emigdio y Olivia, gracias por todo su esfuerzo, entrega hacia sus hijos, ser el ejemplo más importante en mi vida y sobre todo por enseñarme que la única forma de educar es el amor. Este logro es suyo ¡Los amo!.

A mis hermanos Emigdio y Olivia, mis compañeros de toda la vida por estar siempre conmigo, mis personas incondicionales, gracias por nuestra unión, su apoyo, motivación y amor en todo momento.

A mi tías Esther y Macaria piezas fundamentales para mi formación, por apoyarme siempre, gracias por su amor, protección y hacerme sentir una hija para ustedes.

A mi tía Berthi una de las mejores personas en mi vida, gracias por su esfuerzo y su amor. A Carlos Alfredo un hermano más, por su inmenso cariño hacia sus primos.

A mi abuela Ramona † por sus valiosas enseñanzas y amor. A mi bisabuelo Refugio † por su amor y su enseñanza de vida.

A mis tíos y tías Francisco, Armando, Cristóbal y Ángeles, Cecilio y Norma, Berna e Irene y Armando C. Por su preocupación y empeño para formar buenas personas, sus consejos, su infinito apoyo, gracias por ser una guía en mi vida y sobre todo el gran cariño me han manifestado.

A mis tías Claudia y Ángeles P por su cariño, entusiasmo y apoyo.

A mis primos Azucena, Rodrigo, Irene, Mauri, Alejandro, Aldo, Juan de Dios, Anel, Marian y Angel por ser mis camaradas desde la infancia, gracias por su apoyo y cariño.

A las personas que hicieron inolvidable esta maravillosa experiencia que se llama Biología. A Lorena mi amiga y compañera entrañable, por tu sencillez, armonía y belleza interior que te caracteriza. A Edith por ser mi amiga protectora, tu gran energía y fuerza que le transmites al equipo. A Yenifer mi amiga más dulce e inocente, gracias por enseñarme que las personas son buenas si se lo proponen. A mí amigo Pedro por ser una persona noble, sincera y de valores, gracias por tus consejos. A mi amigo con espíritu de colibrí Marco, por el ánimo que me dieron tus aves y frases en las esquinas de mis libretas. A mi amigo Axel por tu fuerza emocional y tu gran objetividad para ver la vida que te hacen ser una persona auténtica. A mi amigo Joan por su entusiasmo para salir adelante ante cualquier obstáculo y siempre con humor. A mi amigo Moyers, porque siempre es agradable escuchar tus elocuentes comentarios.

A mi amiga Sarahí, por ser una de las personas más responsables y que me ha enseñado que los límites lo pone uno mismo, gracias por depositar tu confianza en mí y todas las historias que hemos compartido.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Christian por tus buenas ideas y todo tu apoyo, Alicia por tu alegría y tu buen humor hicieron esta experiencia más divertida, Judith por tu compañerismo y apoyo, Caro por tus aportaciones y hacer más amena mi estancia en el laboratorio.

A mis profesores de la carrera, Manuel Mandujano, Deni Magdalena, Ricardo Mejía Zepeda, Leticia Verdín†, Javier Martínez, Ángeles Sanabria, José Luis Tello, Omar Ángeles y Gloria Paniagua gracias por sus conocimientos y enseñanzas de vida.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por permitirme vivir esta experiencia que es la Biología.

A el doctor Oswaldo Valdés López por su abirme las puertas de su laboratorio, la confianza, la paciencia y su guía.

A la maestra María del Socorro Sánchez Correa por su buena disposición de ayudar y paciencia.

Al laboratorio 4 Metabolismo de Lípidos y Fluidez de membranas de la Unidad Investigación en Biomedicina de la FES Iztacala UNAM, a cargo del doctor Ricardo Mejía Zepeda.

A todos mis compañeros de laboratorio que me acompañaron durante la construcción de este trabajo, sus buenas ideas, apoyo y confianza.

A mi jurado, por sus observaciones, consejos y paciencia.

Gracias.

Índice

1. Resumen.....	9
2. Abstract.....	10
3. Introducción.....	11
3.1 Fósforo.....	11
3.2 Fósforo relación planta-suelo.....	11
3.3 Disponibilidad del fósforo en el suelo para las plantas.....	12
3.4 Efectos de la deficiencia de fósforo en las plantas	12
3.5 Modificaciones en la arquitectura radical inducida por deficiencia de fósforo.....	13
3.6 Fósforo presente en la membrana plasmática de plantas.....	14
3.7 Gen de Argonauta5 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
4. Antecedentes	17
5. Hipótesis.....	18
6. Justificación.....	18
7. Objetivos.....	19
7.1 Objetivo general.....	19
7.2 Objetivos particulares.....	19
8. Materiales y métodos.....	19
8.1 Obtención de material genético.....	19
8.2 Medio Murashige y Skoog.....	20
8.3 Desinfección de semillas.....	21
8.4 Cultivo <i>in vitro</i>	21
8.5 Evaluación de la arquitectura radical.....	21
8.6 Documentación fotográfica	21
8.7 Extracción de ácidos grasos	22
8.8 Transesterificación de ácidos grasos	22
8.9 Análisis de ácidos grasos	22
8.10 Cuantificación de fósforo total	23
8.11 Análisis estadístico.....	23
9. Resultados	24
9.1 Cuantificación de fósforo.....	24

9.2 Arquitectura radicular.....	25
9.3 Modificaciones morfológicas den deficiencia de fosforo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
9.4 Composición de ácidos grasos	31
10. Discusión.....	33
10.1 Comparación de fósforo en hoja y raíz.....	33
10.2 Evaluación de cambios morfológicos en la raíz.....	34
10.3 Comparación de ácidos grasos en raíz y hoja.....	35
10.4 Observación de la expresión fenotípica del gen AGO5 en deficiencia de fósforo.....	36
11. Conclusiones.....	37
12. Bibliografía.....	38
13. Anexos.....	43
13.1 Abreviaturas.....	43
13.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.....	44

Índice de Figuras

1. Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col0 en condiciones óptimas de fósforo +P con una raíz principal de mayor longitud.....	13
2. Esquema de arquitectura radical de una planta en deficiencia de fósforo raíces laterales (RL) y raíz principal (RP).....	14
3. Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500.....	23
4. Cuantificación de fósforo raíz a los 14 días de crecimiento, de los tratamientos.....	25
5. Cuantificación de fósforo de hoja a los 14 días de crecimiento	26
6. Longitud de raíz principal de diferentes concentraciones	27
7. Número de pelos radicales	27
8. Número de raíces laterales.....	27

9. Comparación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en medio M&S a los 14 días de crecimiento en medios de condiciones óptimas y deficientes de fosforo.....	29
10. Fotografías de raíces vistas en estereomicroscopio a 14 días de crecimiento.....	30
11. Esquema del desarrollo embrionario de <i>Arabidopsis thaliana</i>	44

Índice de Tablas

1. Tabla 1. Genotipos empleados en el experimento.....	19
2. Tabla 2. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog con vitaminas.....	19
3. Tabla 3. Perfil lipídico.	31

1. RESUMEN

El fósforo (P) es un elemento fundamental que interviene en el metabolismo y por lo tanto en el desarrollo de las plantas. La disponibilidad de este nutriente es básico para el crecimiento de las plantas. A pesar de que es uno de los nutrientes más abundantes en la corteza terrestre, sólo un 10% se encuentra disponible ya que la planta lo puede absorber en forma de ortofosfato PO_4^{3-} . La planta adquiere mecanismos para hacer frente a la inanición de este nutriente movilizándolo el P almacenado en las vacuolas y en los tejidos en crecimiento disminuyendo el tamaño del área foliar de las hojas, tornándose en una coloración más intensa, obligando a transferir el P almacenado en vacuolas y membranas hacia las estructuras de crecimiento. Otras de las estrategias que ocupa es modificar su arquitectura radicular, raíz primaria (RP), raíces laterales (RLs), pelos radicales (PR). Es de gran importancia encontrar cultivares que sean resistentes en la deficiencia de P. Estudios preliminares muestran que plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre expresan el gen AGO5 puede crecer en condiciones de estrés de fósforo modificando su arquitectura radicular mediante la regulación génica. En este trabajo fueron arrojados los siguientes resultados, en la cuantificación total de P la concentración es mayor en condiciones nulas de P para AGO5 en comparación de los otros tratamientos en inanición, lo que puede indicar que en estrés máximo la planta esté adquiriendo este nutriente de estructuras de reserva como las membranas celulares para hacer frente al estrés. En el perfil lipídico de raíces se presenta que AGO5 en condiciones nulas de P se presenta en mayor cantidad ácidos grasos saturados como palmítico, esteárico y araquídico a los cuales se les atribuye dar rigidez a las membranas, dando un indicio de este mecanismo que adopta AGO5. En deficiencia de fósforo existen cambios significativos en la raíz principalmente en pelos radicales de AGO5, en condiciones nulas de P se presentan en mayor cantidad. La raíz principal de AGO5 se ve disminuida entre la planta silvestre Col0. Las raíces laterales se encuentran en mayor número en el tratamiento 10 μ M de AGO5.

2. ABSTRACT

The phosphorus (P) is an essential element which is involved in the metabolism and therefore in the development of the plants. The availability of this nutrient is essential for the growth of the plants. Despite the fact that it is one of the most abundant nutrients in the earth's crust but only a 10% is available because the plant absorbs it as orthophosphate PO_4^{3-} . The plant acquires mechanisms to deal with the starvation of this nutrient by mobilizing the P stored in vacuoles and in the growing tissue by decreasing the size of the leaf area of the leaves, becoming a coloration more intense, forcing the transfer of the P stored in vacuoles and membranes to the structures of growth. Other strategies that occupies it is to modify its architecture's root, primary root (PR), lateral roots (RLs), hairs (PR). It is of great importance to find cultivars that are resistant in the deficiency of P. Preliminary studies show that *Arabidopsis thaliana* plants that over-express the gene AGO5 can grow in conditions of stress of phosphorus by modifying its architecture root by gene regulation. In this work, were shown the following results in the quantification of total P concentration is higher in conditions void of P for AGO5, in comparison of the other treatments in starvation, which may indicate that in ultimate stress the plant this acquiring this nutrient structures of the reserve such as the cell membranes to cope with the stress. In the lipid profile of roots is presented that AGO5 in conditions void of P is presented in greater amount of saturated fatty acids such as palmitic, stearic, and araquidic which are attributed to give rigidity to the membranes, giving an indication of this mechanism, which adopts AGO5. In a deficiency of phosphorus there are significant changes in the root mainly in the hairs of AGO5, in conditions void of P are presented in greater amount. The main root of AGO5 is diminished between the wild plant Col0. The lateral roots are found in greater number in the treatment 10μ of AGO5.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Fósforo

El fósforo (P) es considerado como un elemento esencial para el desarrollo y producción de las plantas, puesto que forma parte de los componentes primarios responsable del almacenamiento y transferencia de energía. Además es importante en los procesos de transducción de señales, fotosíntesis y respiración celular ya que forman parte de moléculas como ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos (Rue Marbeuf, 2002).

El metabolismo de la planta se puede ver afectado por la baja disponibilidad de fósforo ya que depende en gran medida del pH y iones metálicos (Fe^{+2} , Mg^{2+} y Ca^{2+}) con los que interacciona para que pueda ser accesible (Sánchez, 2006).

La deficiencia de este nutriente en el suelo es una de las principales limitantes que afecta negativamente su crecimiento y la calidad nutritiva de sus semillas.

La disponibilidad de este nutriente es básico para el crecimiento de las plantas debido a que es el mineral más limitado combinado con una baja solubilidad y baja capacidad de absorción. Siendo en distintas vías metabólicas de mayor importancia que nutrientes como el carbono (Raven *et al*, 1992).

3.2 Fósforo relación planta-suelo

La deficiencia de este nutriente en el suelo limita la producción de alimentos, impactando directamente en la producción de fruto. El 90% del fósforo está presente en los suelos y el 10% fuera de los suelos (Fernández, 2007). Aunque el fósforo es uno de los elementos más abundantes, este se encuentra interaccionando con elementos inorgánicos y orgánicos, lo que lo hace inaccesible a las plantas (Beral y Coello; 2007). El fósforo a diferencia de otros elementos esenciales para la vida como H, C, N, y O no se encuentra en forma gaseosa y su ciclo se limita a la litósfera e hidrosfera se vuelve disponible para la vida por medio de una solubilidad lenta o depósitos de fósforo mineral (Cervantes y Marín, 2005)

3.3 Disponibilidad del fósforo

El P es un nutriente que tiene la propiedad de baja solubilidad, por lo tanto en los suelos se pueden presentar deficiencias a pesar de que exista concentraciones abundantes de compuestos sólidos en el suelo, ya que el fósforo soluble resulta insuficiente para cubrir las necesidades de las plantas (Parra y Fragoso, 2004). Una de las limitantes del P es la presencia de grandes concentraciones de sodio en lugar de calcio provocando que el suelo presente un pH alcalino impidiendo la solubilidad de compuestos orgánicos (Khoury, 2005).

El P en el suelo se encuentra mineralizado, dependiendo del pH de suelo se encontrará formando complejos con aluminio y hierro en suelos ácidos, en suelos alcalinos con calcio y magnesio, es menos accesible para la nutrición a la planta. La disponibilidad del P en suelo depende de la formación de compuestos débilmente solubles con cationes divalentes y monovalentes, la planta sólo lo puede absorber en forma de ortofosfato (P_i , H_2PO_4), encontrándose en una concentración menor a $10 \mu M$. Una de las zonas agrícolas en el mundo propensas a la deficiencia de este nutriente son América Latina y África (Navarro y Navarro 2013).

3.4 Efectos de la deficiencia de fósforo en las plantas

La deficiencia de P afecta al crecimiento de la parte aérea de la planta, disminuyendo el tamaño del área foliar de las hojas y tornándolas en una coloración más intensa. El fósforo se encuentra presentes en todos los tejidos de las plantas y representa de 0.05% y 1% del peso seco de la planta. Para hacer frente al estrés de fósforo las plantas han desarrollado estrategias para poder adaptarse (Herrera, *et al.* 2006). Por ejemplo, se ha observado que una de estas respuestas es la movilización de P de fuentes internas, principalmente de las reservas de la vacuola, de fosfolípidos de membrana y de ácidos nucleicos. Puesto que el P es un componente esencial en diversas rutas metabólicas, la deficiencia de este nutriente obliga a la planta a movilizar el P de reservas internas, principalmente del P almacenado en vacuolas y

de distintas biomoléculas, como los fosfolípidos de membrana y ácidos nucleicos (Resendes, 2007). Se ha observado que la deficiencia de P disminuye la síntesis de ATP en el cloroplasto afectando de esta forma la actividad carboxilasa de la enzima RUBISCO y a la tasa fotosintética (Lerner, 1999). Además, se ha observado que las plantas deficientes de P activan la síntesis y secreción de fosfatasa ácida (AP), exudación de ácidos orgánicos y aumento de la expresión de los transportadores de fosfato de alta afinidad, lo cual les permite solubilizar el P del suelo y absorberlo de una forma más eficiente (Kondranka y Richer, 1997).

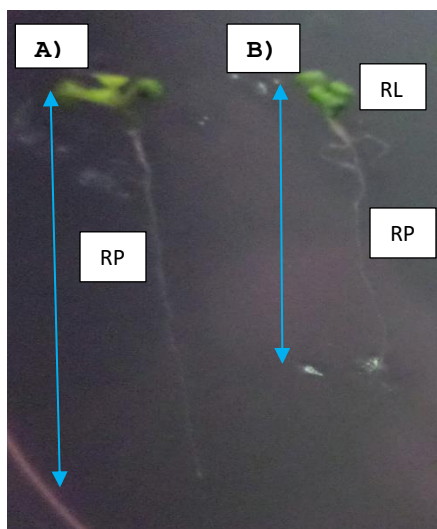


Figura 1. A) Planta de *Arabidopsis thaliana* Col0 en condiciones óptimas de fósforo +P con una raíz principal (RP) de mayor longitud. B) Planta de *Arabidopsis thaliana* Col0 en condiciones deficientes de fósforo -P presenta mayor número de raíces laterales (RL).

3.5 Modificaciones en la arquitectura radical inducida por deficiencia de fósforo

El término de arquitectura radical (AR) hace referencia a la disposición espacial del sistema radical en un sustrato (Fernández y Ramírez 2000). El sistema radical está conformado por la raíz primaria o principal (RP), encargada del anclaje y absorber agua, raíces laterales (RLs), pelos radicales (PR) y raíces adventicias como se muestra en la figura 2. Estos tres últimos tipos de raíces tienen como función captar agua y nutrientes minerales (Cambell et al., 2001).

La deficiencia de P provoca que la planta utilice mecanismos para que haga más eficiente la captación de este nutriente (Devaiah, Ballchanda 2007). Una de estas estrategias es tener modificaciones en la arquitectura radical. En plantas deficientes de P se ha observado una disminución en el crecimiento de la raíz, un aumento en el número y longitud de raíces laterales y pelos radicales (Dolan *et al.* 1993).

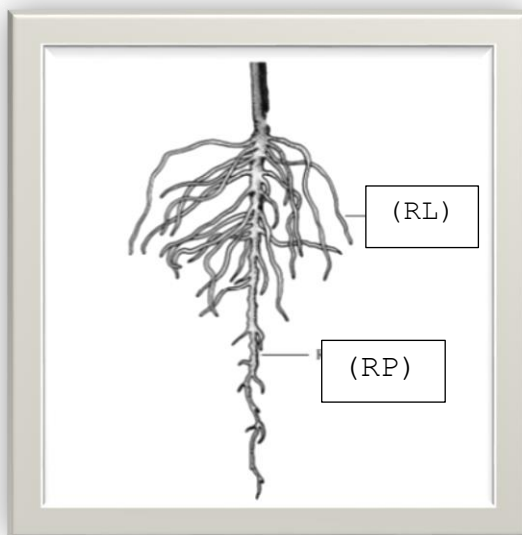


Figura 2. Esquema de arquitectura radical de una planta en deficiencia de fósforo raíces laterales (RL) y raíz principal (RP).

3.6 Fósforo presente en la membrana plasmática de plantas

Los lípidos son componentes de los tejidos de las plantas y los animales, son clasificados como esteroides, fosfolípidos, ceras, esfingomielinas y grasas (Garrido, *et. al* 2006). Los lípidos pertenecen al cuarto grupo principal de las moléculas presentes en todas las células llevan a cabo su función como matriz estructural de las membranas biológicas debido a sus características hidrófobas, que constituyen la bicapa lipídica, además de tener otras funciones como depósitos de energía y señalizadores intercelulares. En las plantas los ácidos grasos más comunes son ácido palmítico, oleico, linoleico y esteárico presentan entre C16 y C18 (Voet, *et al.* 2007). Los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas

plasmáticas se caracterizan por tener un grupo fosfato unido a un glicerol por medio de un enlace fosfodiéster, se clasifican en fosfoglicéridos y esfingolípidos. (Donald et al., 2009). Los fosfolípidos vegetales tienen un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados como al ácido oleico, ácido linoleico y ácido α -linoleico que aumenta la fluidez de la membrana (Lincon y Zeiger 2006). En estrés de fósforo se ha observado que en estrés de este nutriente aumenta la cantidad de sulfolípidos y disminuye el fosfatidilglicerol en *Arabidopsis thaliana* (Essigmann et al., 1998). Una de estas estructuras que reemplazan a los fosfolípidos que son sulfolípidos y galactolípidos movilizándolo el fósforo de tejidos viejos incorporándolos al metabolismo y estructuras de crecimiento activos. (Kass, 1996)

3.7 Gen de Argonauta 5 en *Arabidopsis thaliana*

Las proteínas Argonautas juegan un papel importante en el desarrollo, crecimiento y respuesta al estrés abiótico, regulan la expresión génica participando en diferentes vías del RNA, éstas presentan sRNA no codificantes tienen una longitud de 20-30 nucleótidos, que suprimen genes de manera específica en la secuencia (Oliver y Santos 2014). En la planta *Arabidopsis thaliana* se encuentran presentes diez proteínas Argonautas (AGO) repartidas en tres clados donde AGO1, AGO5, AGO10, su función es cortar secuencias de RNA, (Xhu R et al., 2016). Se ha descrito que otro papel que juegan las proteínas Argonautas es la regulación de la expresión génica por medio de la metilación del DNA. Se ha demostrado que las proteínas AGO1, AGO2 y AGO5 tiene actividad antiviral (Brosseau, et al. 2016) donde AGO1 y AGO10 promueven la defensa antiviral en tejidos de inflorescencia y AGO2 un papel más destacado en hoja. (García, et al. 2015).

En la regulación post- transcripcional es mediada por sRNA guiada por complejos de proteínas Argonautas como AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 y AGO10 esenciales para mediar la regulación génica en plantas (Shao, C. et al. 2014).

Otras funciones estudiadas de estas proteínas se encuentra en la división celular donde AGO2 es capaz de reparar el DNA en plantas portadoras de mutaciones, de

igual forma AGO9 está implicada en la reparación del ADN somático (Oliver y Santos 2014).

Se conoce poco el papel que desempeña AGO5 en mecanismos para hacer frente a la deficiencia de nutrientes, por el momento se tienen datos de que promueve la transición a gametogénesis a megaespora funcional en *Arabidopsis thaliana* y que participa en la respuesta antiviral a través de la acción de proteínas Dicer (DCL) (Brosseaut y Moffet 2015). Estudios preliminares muestran que plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre expresan AGO5 puede crecer en condiciones de estrés de fósforo modificando su arquitectura radicular mediante la regulación génica.

4. ANTECEDENTES

Xu R y Zhang, S en 2016 realizaron una análisis para clasificar 15 genes de la familia de AGO realizado en el genoma de manzana (*Malus domestica*), los genes se agruparon en cuatro grupos AGO1, AGO4, MEL1/AGO5 y ZIPPY/AGO7. Los estudios de expresión arrojan que estos genes están involucrados en respuestas generadas para hacer frente al estrés abiótico, como calor y bajas temperaturas y estrés salino.

Zhu XF, *et. al* en 2015 revelan que cultivares de arroz Nippobare (Nip) en condiciones de deficiencia de fósforo presenta mayores niveles de fósforo soluble en la raíz y menor contenido en la pared celular, sugiere que el aumento de pectina está relacionado con niveles mayores de P como resultado de que la pectina ayuda a la re movilización de P depositado en la pared celular, mecanismo desconocido para la reutilización de este nutriente en las plantas.

Bernal Essigman, *et. al* en 1998 revelan que en estrés de fósforo la mutante *pho1* en *Arabidopsis thaliana* muestra un aumento de sulfolípidos y una disminución de fosfatidilglicerol en las membranas de los tilacoides, sugiriendo que la cantidad de sulfolípidos está relacionado con la baja disponibilidad de fosforo en el ambiente, siendo un mecanismo de resistencia de la planta para sustituir al fosfatidilglicerol.

Estudios preliminares en el laboratorio del Dr. Oswaldo Valdés-López, FES Iztacala UNAM, revelan que plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre expresan Argonauta 5 pueden crecer en condiciones de total ausencia de P. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la epigenética puede regular las respuestas de plantas a la deficiencia de P.

5. HIPÓTESIS

La mutante del gen AGO5 en deficiencia de fósforo presentará mecanismos que le ayudara a hacer frente al estrés modificando su morfología y procesos fisiológicos.

6. JUSTIFICACIÓN

La deficiencia de fósforo impacta directamente en la producción de alimentos, estudios geológicos estiman que en cien años las reservas de fósforo se agotarán, por eso es importante identificar genes resistentes a la inanición de fósforo y las de adaptaciones morfológicas les permiten hacer frente al estrés.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

- Establecer cuál es el papel que juega el gen de AGO5 en la regulación de la deficiencia de fósforo y caracterizarlo fenotípicamente en *Arabidopsis thaliana*.

7.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el crecimiento *Arabidopsis thaliana* AGO5, ago5 y Col0 propagadas en medio Murashige y Skoog en condiciones óptimas de P y en condiciones de deficiencia de P.
- Evaluar la arquitectura radicular de las plantas crecidas en deficiencia de P respecto a las plantas crecidas en condiciones óptimas de P.
- Cuantificar las concentraciones de P presentes en hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar la composición de ácidos grasos presentes en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* por cromatografía de gases.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Obtención de material genético

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este experimento fueron proporcionadas por el Instituto Salk de Estudios Biológicos. En la tabla 1 se muestran los genotipos utilizados en el presente trabajo.

Semillas utilizadas	
Mutante (HM)	OxAGO5
Knockout (Hz)	ago5
Silvestre (Wt)	Col0

Tabla 1. Genotipos empleados en el experimento.

8.2 Medio Murashige & Skoog

8999999999999999

La preparación del medio de cultivo in vitro fue realizada de acuerdo con Murashige y Skoog, (1962) con la composición mostrada en la tabla 2.

Cada 100 ml de solución preparada se le sumo el 3% de sacarosa JT. Baker y 1.5% de agar de micro propagación. Fueron cinco medios de cultivo que se prepararon por cada ejemplar de semillas los cuales presentaban las siguientes concentraciones de KH₂P₄ la solución en condiciones óptimas (+P) contenía 100 µM y las concentraciones para los medios en deficiencia de fósforo fueron las siguientes 20 µM, 10 µM, 5 µM y 0 µM. A todos los medios de cultivo se les fue ajustado el pH a 5.7 con HCL y NaOH con una concentración de 0.1 N, posteriormente fueron esterilizados en autoclave de vapor eléctrica durante 30 minutos, para el vaciado en cajas Petri cuadradas cuadrículadas y estériles con dimensiones de 100 x 100 x 15 mm.

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
Macros		
NH ₄ NO ₃	16,5	100 ml
KNO ₃	19	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
Micros		
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69	10 ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0,083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ .5H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
CoCl ₂ .6H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
Fuente de hierro		
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,00556	10 ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,00746	
Vitaminas		
Inositol	10	10 ml
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Tabla 2. Composición del medio de propagación Murashige y Skoog con vitaminas.

8.3 Desinfección de semillas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* antes de sembrarse en la placa de agar fueron desinfectadas con 1ml de etanol al 70% durante un minuto y posteriormente se utilizó 1ml de solución cloro-tween al 0.05%, se enjuagaron cinco veces con agua destilada.

8.4 Cultivo *in vitro*

Las semillas fueron sembradas en una campana de flujo laminar la cual previamente fue previamente esterilizada, se sembraron un promedio de 12 semillas desinfectadas por caja con ayuda de una micro pipeta, selladas las cajas se mantuvieron a una temperatura de 4° C durante 48 horas transcurrido este tiempo fueron se sacaron a temperatura ambiente con luz 12/12.

8.5 Evaluación de la arquitectura radical

Se llevó a cabo la evaluación del crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* a los 14 días después de haber sido sembradas, por medio un microscopio estereoscópico, se realizó el conteo de las raíces laterales (RL) y en un centímetro de longitud se contaron los pelos radicales (PR), la medición de la raíz principal fue mediante un vernier digital KNOVA ® con un rango de 0-150 mm.

8.6 Documentación fotográfica

Las imágenes de las raíces de las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron captadas por medio de un estereomicroscopio modelo SZX10 Olympus® con un objetivo parafoval 5.0x con una cámara de alta resolución DP71 Olympus® y analizados por el software de imágenes Olympus MicroSuite el cual se pudo hacer un segundo conteo de pelos radicales (PR) y ubicar una reglilla de 1 mm en la imagen. Las raíces

fueron vistas desde la caja donde inicialmente fueron sembradas y rociadas con agua destilada para evitar su desecación.

8.7 Extracción de ácidos grasos

Se tomaron 20 mg de raíces por cada ejemplar de semillas AGO5 (+P), AGO5 0 μ M (-P), ago5 (+P), ago5 0 μ M (-P) y Col0 (+P), Col0 0 μ M (-P), se extrajeron los lípidos por el método de Folch, *et.al* 1957. La biomasa se colocó dentro de un homogeneizador potter-elvehjem de 2 ml y se trituró el material con 1 ml de cloroformo- metanol (2:1), posteriormente se agregó 0.5 ml de agua, se utilizó una centrifuga marca Hermle® (2500 rpm) durante un minuto, separándose dos fases en la cual se recuperó únicamente la fase clorofórmica, fueron depositadas en viales para la transesterificación.

8.8 Transesterificación de ácidos grasos

Después de la extracción de lípidos se agregó 0.5 ml de trifloruro de boro (BF₃) al 14% con metanol en el vial, para la transesterificación y posteriormente fueron cerrados con una cámara de gas nitrógeno, se sumergieron los viales en un baño de agua a una temperatura de 94°C, durante 30 minutos.

Los viales fueron sacados y se les agregó 1ml de hexano y 1ml de agua se formaron dos fases en la que se extrajo la fase orgánica, se evaporó el hexano con gas nitrógeno y los metil esteres obtenidos fueron almacenados en viales a -4°C preservándolos de la luz.

8.9 Análisis de los ácidos grasos

Para el análisis de los ácidos grasos son resuspendidos los metil esteres extraídos en hexano de alta pureza para ser inyectados por medio de un inyector capilar en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 computarizado, figura 4.



Figura 3. Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 computarizado, utilizado para el análisis de lípidos de raíz en *Arabidopsis thaliana* en AGO5+P, AGO5-P, ago5+P, ago5-P, Col0 +P y Col0 -P.

8.10 Cuantificación de fósforo total

Se tomaron 20 mg de raíz y 20 mg de hoja de cada tratamiento aplicado de fósforo, fueron triturados con 1 ml de ácido tricloro acético (ATC) para romper las células.

Para la preparación de los tubos fue necesario lavarlos tres veces con agua destilada y jabón libre de fosfatos para evitar contaminación, se prepararon los tubos con 1 ml de agua destilada, 1 ml de molibdato de amonio al $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1 M y 0.5 ml del sobrenadante extraído, y 1 ml de reactivo de color sulfato ferroso FeSO_4 se dejó efectuar la reacción y se leyeron las concentraciones a 660 nm en un espectrofotómetro digital.

8.11 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba Anova de un factor y se aplicó la prueba de Tukey con un alfa de 0.05.

9. RESULTADOS

9.1 Cuantificación de fósforo

En este estudio se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en deficiencia de fósforo y en condiciones óptimas de este nutriente. Se emplearon n=10 plantas por tratamiento, los resultados de la cuantificación de fósforo total en la raíz arroja que AGO5 +P (100 μ M) es la planta que mayor nivel de P contiene en comparación con Col0 y ago5 crecidas en las mismas condiciones, en contraste con los niveles de fósforo en hoja se encuentran significativamente más bajos que la concentración presente en raíz. De igual forma AGO5 0 μ M es la que significativamente presenta una concentración más elevada de fósforo en todos los tratamientos de carencia de fósforo. Los resultados presentan que AGO5 guarda más fósforo en raíz que Col0 y ago5, asimismo los niveles de P son significativos más altos en AGO5 +P y AGO5 0 μ M, en este último tratamiento puede indicar que en estrés máximo la planta este adquiriendo este nutriente de estructuras de reserva como las membranas celulares para hacer frente al estrés como se muestra en la figura 5.

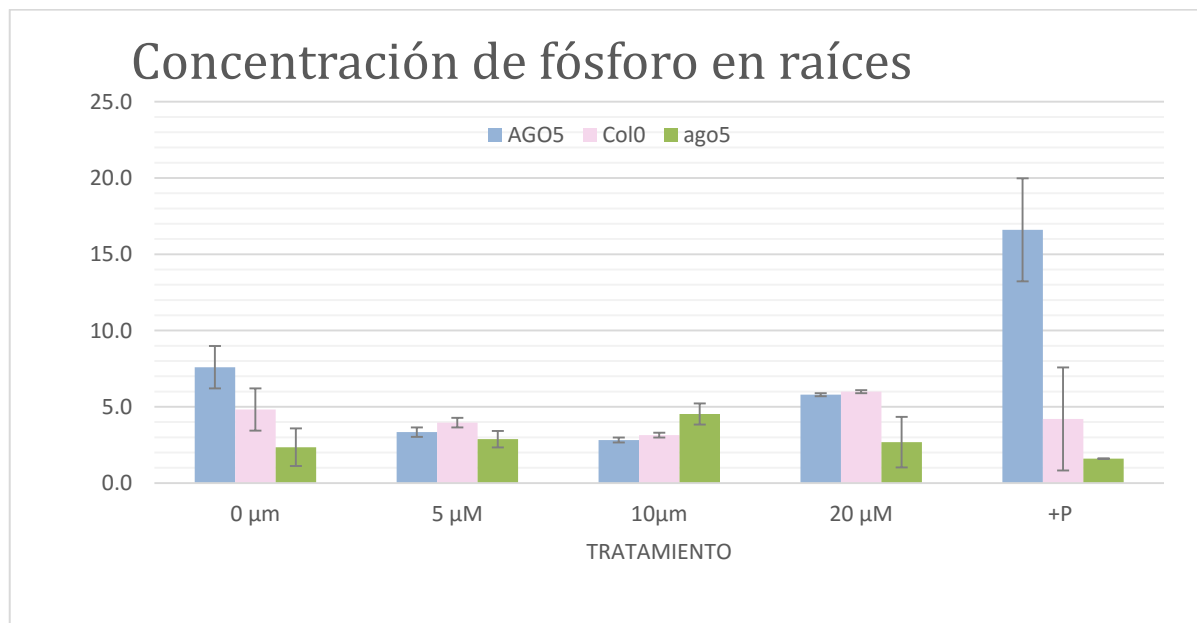


Figura 4. Gráfica de cuantificación de fósforo raíz a los 14 días de crecimiento, en Col0, AGO5, ago5 en deficiencia de fosforo 0µM, 5µM, 10µM, 20µM.

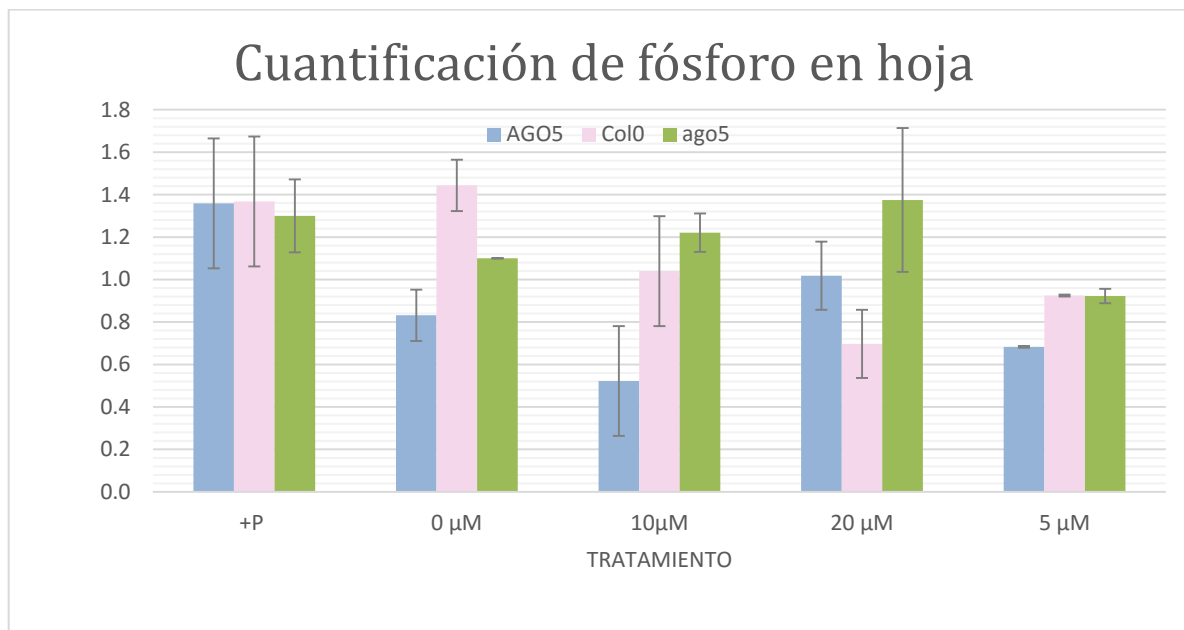


Figura 5. Graficas de cuantificación de fósforo de hoja a los 14 días de crecimiento, en Col0, AGO5, ago5 en deficiencia de fósforo

En los resultados de la cuantificación de fósforo total de hoja se emplearon n=10 plantas por tratamiento. Se arrojó que los niveles de fósforo son más altos en raíz que en hoja. Además también se reveló que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los genotipos en hoja. En deficiencia de P la mutante AGO5 muestra concentraciones significativas más bajas en contraste con ago5 y Col0.

9.2 Arquitectura Radicular

Mediante el cultivo de semillas de *Arabidopsis thaliana* provenientes de la colección de mutantes tDNA inserción, pertenecientes al Instituto Salk, AGO5, ago5 y Col 0 cultivadas en medio Murashige y Skoog en condiciones de deficiencia de fósforo 0µM, 5µM, 10µM, 20µM y en concentraciones óptimas 100µM (+P). Las mediciones

arrojan que la mutante AGO5 + P en comparación con las plantas de AGO5– P tiene una diferencia marcada de más el 60 % de longitud en la raíz principal como se muestra en la figura 6. Lo cual nos hace suponer que entre más alta sea la concentración de fósforo en el medio la RP será de mayor longitud usando este cambio morfológico como una forma de aumentar la movilidad y toma del nutrimento del suelo.

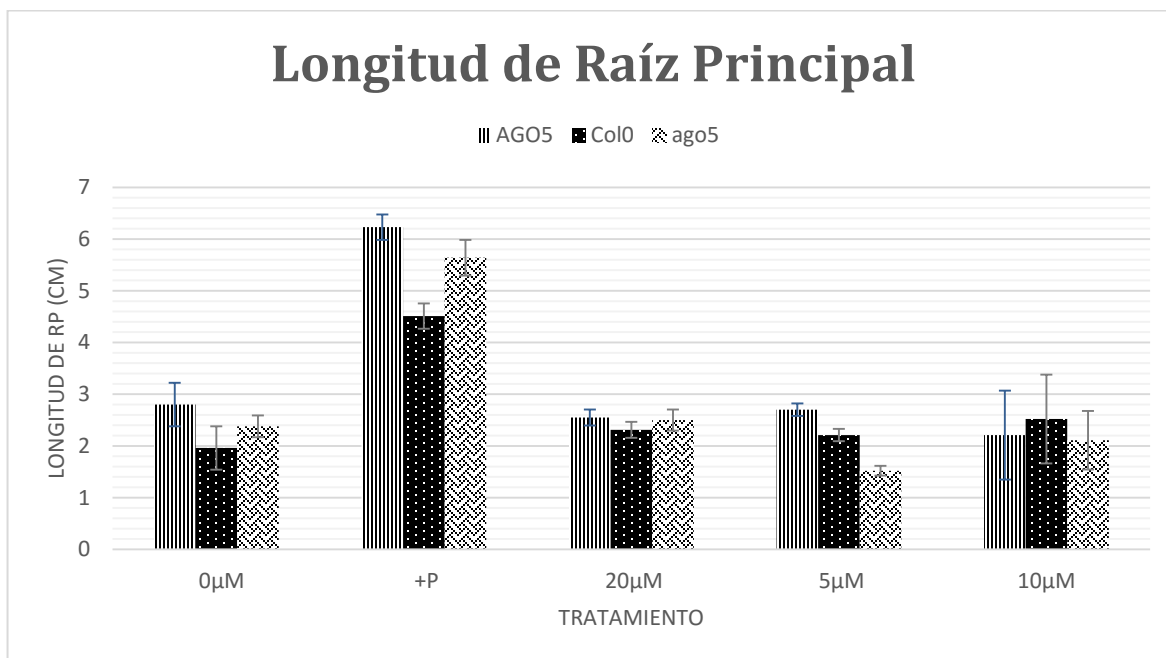


Figura 6. A) Gráfica de longitud de raíz principal de Hz, (ago5), HM (AGO5) y Col 0 en concentraciones +P y –P.

En relación con la longitud de la RP y PR se muestra que en los tratamientos de deficiencia de P hay una mayor cantidad de PR, en contraste con el medio de concentración óptima de P, mostrándose una sobresaliente diferencia en el tratamiento 0µM de la mutante AGO5 en comparación con ago5 +P, pudiendo observarse cambios en el incremento de pelos radicales, tomando como punto de comparación al control Col 0 como se muestra en la figura 7. Las raíces de AGO5 +P tiene mayor longitud de raíz en RP en condiciones óptimas de fósforo, pero en deficiencia de este nutriente los pelos radiculares tienen un drástico incremento.

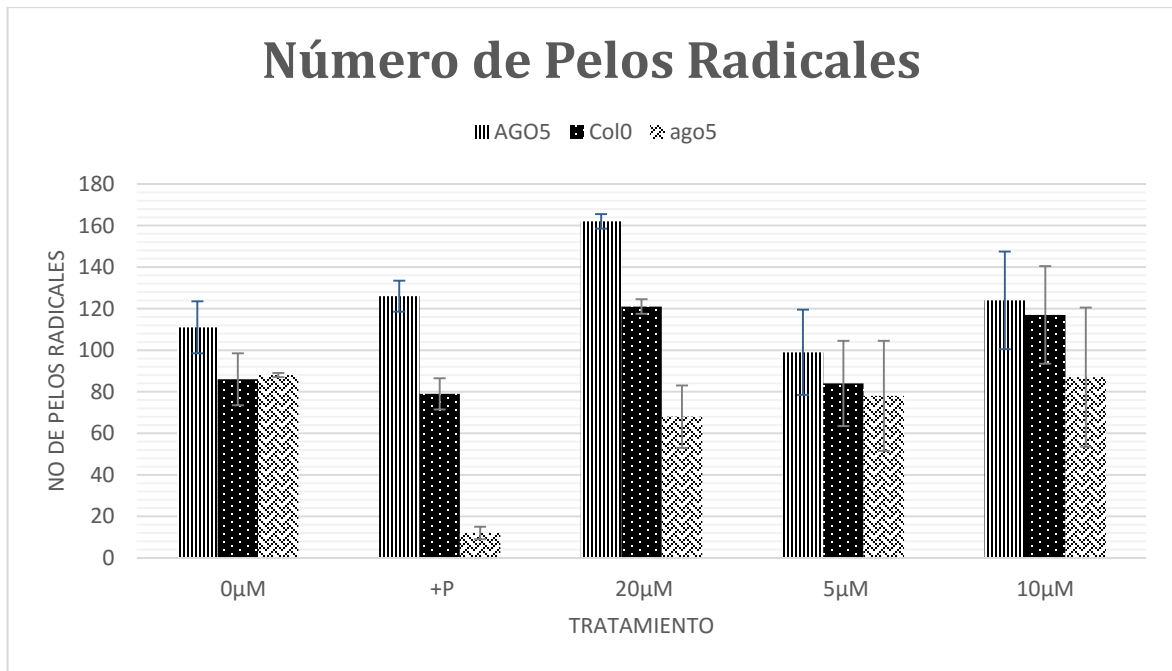


Figura 7. B) Gráfica de número de pelos radicales de Hz (ago5), HM (AGO5) y Col 0 en concentraciones +P y -P

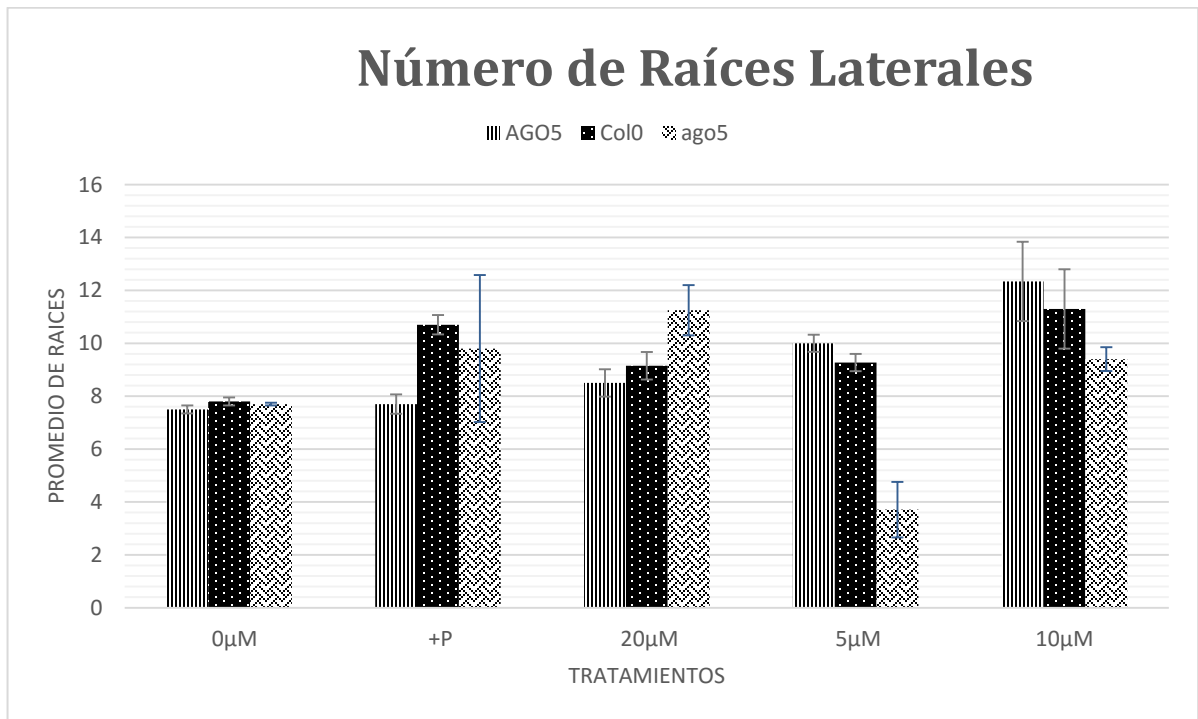
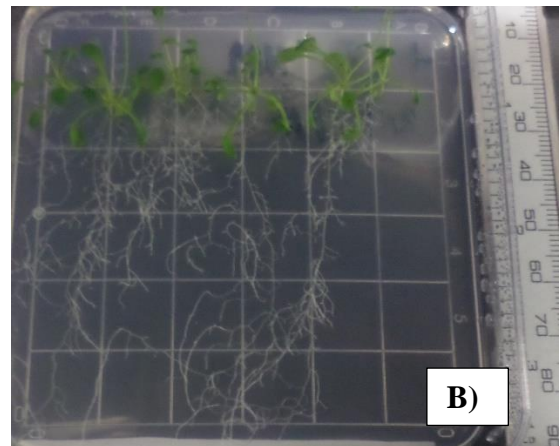
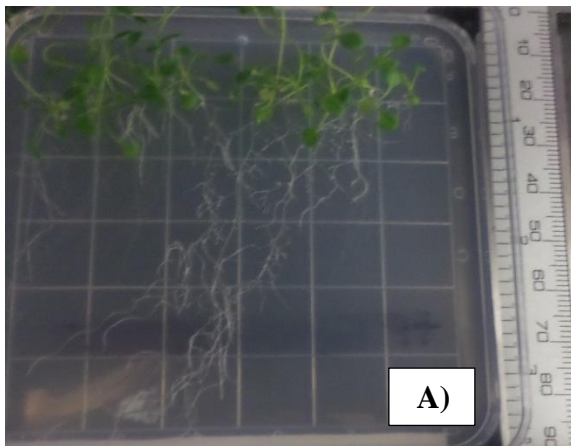


Figura 8 .C) Gráfica del conteo del número de raíces laterales Hz (ago5), HM (AGO5) y Col 0 en concentraciones +P y -P.

En la valoración de las raíces laterales en las concentraciones +P y - P se encontró que es mayor el número de RL en las concentraciones 10 μ M y 5 μ M de la mutante AGO5, con relación al control Col0, tratamiento de AGO5 10 μ M tiene un aumento significativo, se evidencia que hay cambios en la arquitectura radicular con respecto a las concentraciones de +P, en niveles óptimos del nutriente siendo que la raíz principal es de mayor longitud, mostrándose con una ventaja mayor en la mutante AGO5, que en Col 0 y ago5 como se puede apreciar en la figura 8. Existiendo concordancia que en deficiencia de P disminuye la raíz principal, así como un aumento de raíces laterales y pelos radicales, aseverando que cuando la planta es sometida a estrés de fósforo adopta este mecanismo de modificar su raíz para mayor absorción de P.

9.3 Modificaciones morfológicas en deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* obtenidas del Instituto Salk U.S.A pertenecientes a la colección de mutantes tDNA inserció, sembradas in vitro en medio Murashige y Skoog con catorce días de crecimiento Col0 +P, Col0 0 μ m, AGO5+P y AGO5 0 μ m.



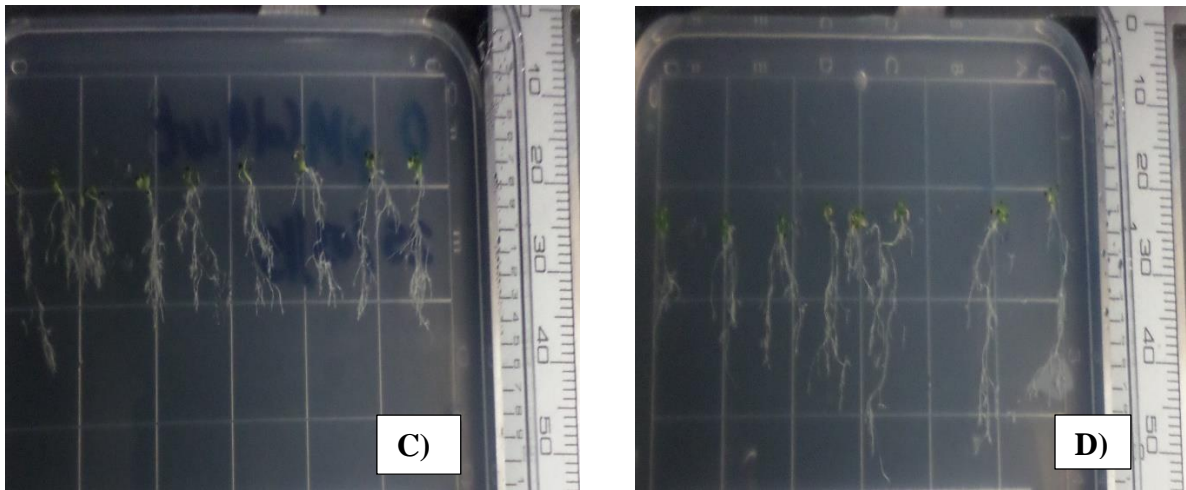


Figura 9. Comparación de plantas de *Arabidopsis thaliana* en medio M&S a los 14 días de crecimiento en medios de condiciones óptimas y deficientes de fósforo. A) Col 0 +P, B) AGO5 +P, C) Col 0 -P, D) AGO5 -P.

Imágenes tomadas de las raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0 +P, Col0 0 μ M, AGO5+P, AGO5 0 μ M, ago5 +P y ago5 0 μ M en un microscopio estereoscópico modelo SZX10 Olympus® a los 14 días de crecimiento.

Los resultados arrojan que AGO 5 en deficiencia de P presenta mayor cantidad de pelos radicales y raíces laterales en relación con este mismo genotipo en condiciones óptimas de P, en lo que respecta a Col0 +P en contraste con AGO5 +P no existen cambios marcados en la longitud de la raíz principal, pero este cambio logra ser significativo menor en Col0 -P y AGO5 -P, donde este último expone una mayor elongación en RP, siendo un cambio notorio en la morfología de raíz cuando es expuesto a estrés como se muestra en la figura 10.

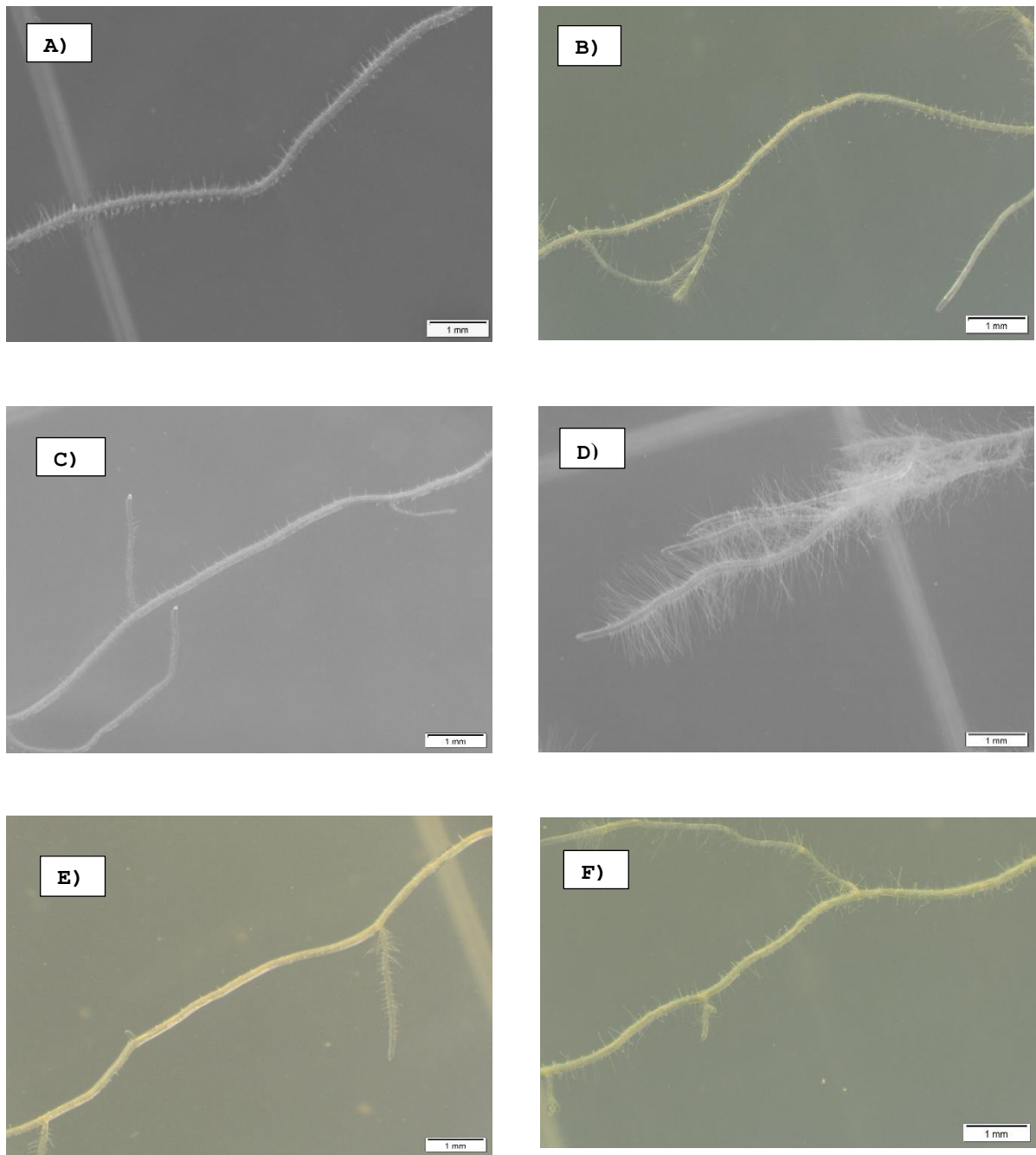


Figura 10. Fotografías de raíces de los tratamientos A) Col0 +P, B) Col0-P, C) AGO5 +P, D) AGO5 -P, E) ago5 +P. y F) ago5 -P vistas en estéreo microscopio 0.5x a 14 días de crecimiento. En condiciones óptimas y nulas de fósforo

9.4 Composición de ácidos grasos

Ác. Grasos	Col0+Pmol%	Col0-Pmol%	AGO5+Pmol %	AGO5-Pmol%	ago5+Pmol%	ago5-Pmol%
<i>Mirístico</i>	-----	1.33*	-----	0.81	-----	-----
	8.5	7.4	56.5*	24	38	23.7
<i>Palmitico</i>	-----	-----	-----	5.1	21	51.5*
<i>Palmitoleico</i>	10.9*	3.5	9.2	7.94	6.2	-----
<i>Estearico</i>	14.3	12	27	19	20	6
<i>Oleico</i>	17.4	28*	16	25.7	11.4	2.1.
<i>Linoleico</i>	6	-----	10.6	12.7	2.1	19.3*
<i>Gamalinolei co</i>	-----	14.5	9.2	26*	-----	-----
<i>Linolenico</i>	3.5	-----	-----	4.3*	-----	2.93
<i>Araquidico</i>	4.2	-----	5.2*	-----	-----	-----
<i>Eicosanoico</i>	2.5	1.69	0.7	3.2*	-----	-----
<i>EPA</i>	20*	11	3	3.06	5.6	15
<i>NI</i>						

Tabla 3. Composición de ácidos grasos. Valores dados en porcentaje de ácidos grasos presentes en 20 mg de raíces de *Arabidopsis thaliana* a los 14 días de crecimiento. *Presenta diferencias significativas. (Se utilizó esta técnica para poder evaluar si existen cambios en la composición lipídica de la planta en deficiencia de fosforo, se especula que bajo estas condiciones se ven afectados los lípidos de membrana para movilizar el fosforo inmerso en las membranas y llevarlo a formar parte del metabolismo)

En este trabajo se extrajeron los lípidos de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana* de los tratamientos +P y -P por el método Folch, *et. al* 1957, en n=10 plantas de los genotipos AGO5, Col0 y ago5. En el análisis arrojado de los lípidos se observa que ago5 -P presenta mayor cantidad de ácido palmitoleico 51.5 mol% y Gamma linoleico con un 19.3 mol %. La detección de los lípidos en Col0 -P el lípido más abundante es el ácido graso insaturado linoleico, mientras que AGO5 en condiciones nulas de P revela que presenta mayor cantidad ácidos grasos saturados que por su naturaleza son sólidos a temperatura ambiente como palmítico con el 20 mol%, esteárico 7.39mol%, araquídico 4.3 mol% a los cuales se les confiere la característica de dar rigidez a las membranas, dando un indicio de que. En cambio se puede observar que ago5 -P presenta una diferencia significativa de ácidos grasos como palmitoleico es monoinsaturado y Gammalinoleico que es poliinsaturado los cuales dan la característica de hacer más fluida la membrana.

10. DISCUSIÓN

10.1 Concentraciones de fósforo en hoja y raíz

En los resultados obtenidos de la cuantificación de fósforo total en plantas con concentraciones bajas de fósforo y condiciones óptimas se muestra que AGO5 +P (100 μm) es la planta que mayor nivel de P en hoja se encuentran significativamente más bajos que la concentración presente en raíz. De igual forma AGO5 0 μm es la que significativamente presenta una concentración más elevada de fosforo en todos los tratamientos de estrés. Por lo tanto se sugiere que AGO5 en condiciones nulas de fósforo, la planta este adquiriendo este nutriente de estructuras de reserva como las membranas celulares para hacer frente al estrés ya que se ha reportado que la planta es capaz de remover hasta el 50% de fósforo de las hojas para pasarlo al metabolismo y poder generar tejidos de la raíz para la movilización de fósforo (Lucas, *et al.* 2016). Se ha descrito que las plantas son capaces de absorber en los primeros estadios de crecimiento el fósforo contenido en sus semillas en caso de que el ambiente en cual se desarrollan pueda estar en condiciones deficientes de P (Guananga, 2004). Probablemente el gen de AGO5 puede estar modificando la conducta de la planta adoptando nuevos mecanismos para la sobrevivencia de la planta. Esta removilización de P en las membranas puede ser sustituido por sulfolípidos y galactolípidos para mantener la estructura de las membranas (Valdés, *et al.* 2008). Realizando una comparación de los resultados arrojados se puede observar que la concentración de P es menor en hoja que la encontrada en raíz esto es respaldado por (CIAT, 1983) donde revelan que algunos nutrimentos como el P en la planta pueden cambiar de posición en la hoja y raíz si se ven en deficiencia de P para llevarlo a las estructuras que lo requieran. Moreno en 2007 reportó que trigo *Triticum aestrum* y alfalfa *Medicago sativa* en condiciones deficientes de este nutriente genera retraso en el crecimiento; comparado con el estudio realizado se observa que de igual forma en deficiencia de P *Arabidopsis thalina* con el genotipo AGO5 su crecimiento se ve mermado con respecto al tratamiento AGO5 +P. Por otra parte AGO5 0 μm es el que tiene la concentración más alta de P de los

tratamientos con concentraciones de deficiencia. Herrera y colaboradores en 2006 a descrito que las semillas almacenan fósforo en sus cotiledones y eje embrionario para el desarrollo adecuado de la planta; lo cual puede respaldar que las semillas están siendo una fuente de este nutriente para AGO5 0 μ m.

10.2 Evaluación de los cambios morfológicos presentes en la arquitectura radical producida por el estrés de fósforo

Los genotipos usados en este experimento fueron AGO5, ago5 y Col0 en *Arabidopsis thaliana*, propagadas en medio MS las cuales muestran que. La evaluación de las raíces en condiciones deficientes de fósforo de Col0 concuerdan con lo establecido, que presenta modificaciones morfológicas, presentando aumento en la densidad de las raíces laterales (RLs) y pelos radicales (PR), disminuyendo la raíz principal (RP) (Bates y Lynch, 1996). En los resultados se muestra que AGO5 +P presentan un incremento significativo en la raíz principal respecto a las concentraciones con estrés de fósforo.

En la evaluación de los pelos radicales (PR) y raíces laterales (RLs), Col0 y ago5 no presentan diferencias entre el número pelos y raíces laterales de los tratamientos en deficiencia entre grupos, en comparación con AGO5 dobla la cifra de pelos radicales y el número más alto de raíces laterales estuvo presente en AGO5 un cambio morfológico mayor que los otros grupos, las concentraciones bajas de este nutriente pueden inducir cambios más marcados. Bouain y colaboradores en 2016 indican que solo fósforo inorgánico (Pi) puede ser absorbido, por lo tanto la planta debe de adquirir mecanismos como la modificación de su arquitectura radical para absorber la mayor cantidad de nutrientes y movilizar el P inaccesible, expresando así un cambio inducido por el medio en el que se está desarrollando. Este estudio evidencia que AGO5 en deficiencia de P presenta cambios morfológicos que son significativamente mayores que los presentes en Col0 puede señalar que la planta adopta estrategias para mejorar la eficiencia del uso del Pi, siendo un tema importante para la agricultura.

10.3 Comparación de los ácidos grasos de raíz y hoja

Por medio del método Folch, *et. al* 1957, se extrajeron los ácidos grasos de raíz. La composición de ácidos grasos mostro que AGO5 en condiciones nulas de P presenta una cantidad más elevada de ácidos grasos saturados que por su naturaleza sólidos a temperatura ambiente como palmítico con el 20 mol%, esteárico 7.39 mol%, araquídico 4.3 mol% están presentes en contraste con Col0 en el cual el lípido más abundante es el ácido graso insaturado linoleico. Se ha descrito que los fosfátidos (ácidos grasos oleico, linoleico, linolenico, esteárico, araquídico, palmítico, palmitoleico) son importantes constituyentes de las membranas celulares asociados a cloroplastos participando en el metabolismo y son parte del elemento estructural del cloroplasto (Davis et al., 1969). Probablemente este cambio en los lípidos presentes en este perfil lipídico de raíz tenga impacto en la fluidez de la membrana como lo menciona (Ramarkrishna. 1988) los mecanismos de evasión al estrés por P en plantas puede generar estrategias de cambios en las membranas celulares como alterar la fluidez membranal cambiando la composición de los ácidos grasos y su nivel de saturación. Se ha descrito por Taiz y colaboradores en 2006 que los fosfolípidos presentes en las membranas celulares de plantas tienen un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados como ácido oleico, linoleico y linolenico que aumentan la fluidez membranal, lo que nos hace inferir que Col0 -P presenta mayor fluidez en sus membranas ya que el ácido graso más abundante es el linoleico con 28 mol% con respecto a ago5 que tiene 2 mol% y AGO5 25 mol%.

Por otra parte (Svitonoff, 2007) dejó ver en un experimento con mutantes LPR1 y *lpr1* en *Arabidopsis thaliana* en deficiencia de fósforo encontró que estos genes liberan oxidasas multicobre (MCO) para detener y reprogramar el crecimiento de las raíces existiendo un intercambio de cobre, por el fósforo de las estructuras de reserva para que pueda ser utilizado en el metabolismo de la planta. En relación los lípidos presentes en AGO5 en condiciones nulas de P presenta una cantidad más elevada de ácidos grasos saturados que por su naturaleza sólidos a temperatura ambiente como palmítico con el 20 mol%, esteárico 7.39 mol% y araquídico 4.3 mol%

como un mecanismo, este gen puede estar aumentando la rigidez membrana debido a la movilización de fósforo.

10.4 Observación de la expresión fenotípica del gen AGO5 en deficiencia de fósforo

En este trabajo se captaron imágenes en un microscopio estereoscópico de raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* a catorce días de crecimiento de AGO5, Col0 y ago5 +P y -P. En las imágenes se evidencia que la raíz de AGO5 presenta mayor número de raíces laterales y cantidad de pelos radicales que Col0 y ago5 en deficiencia de fósforo. Contrasta AGO5 +P con los cambios morfológicos en la imagen de AGO5. Las variaciones fenotípicas pueden presentarse variaciones por influencia de su ambiente para expresar sus genotipos (Pedroso et al., 2009). En condiciones de estrés la planta debe optar por modificar su morfología para poder movilizar y captar fósforo del sustrato en el que se encuentre, lo que nos hace suponer que AGO5 *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés puede estar expresando así un fenotipo.

11. CONCLUSIONES

- Se encuentra relacionada la deficiencia de fósforo con la expresión de AGO5, lo que puede sugerir que este gen está adoptando ciertos mecanismos para movilizar fósforo. Lo que puede ser de gran importancia para la agricultura.
- El genotipo AGO5 se ve afectado en deficiencia de fósforo ya que al estar en condiciones nulas de este nutriente su morfología se ve severamente modificada, principalmente en su arquitectura radical, nos puede señalar que se está expresando un fenotipo.
- La deficiencia de fósforo tiene efectos en el genotipo AGO5 ya que presenta mayor cantidad de ácidos grasos saturados, lo que nos lleva a suponer que existe un cambio en la rigidez de la membrana y se está utilizando el fósforo presente en la membrana.

12. Bibliografía

- I. Afif Khouri Elías. (2005). Dinámica del fósforo en suelos cálcicos de áreas mediterráneas: trabajo experimental. España: Universidad Oviedo.
- II. B. Ramarkrishna. . (1988). Mejoramiento para la tolerancia a factores ambientales en el cultivo de maíz. Ecuador: IICA. pp: 274.
- III. Bates T, Lynch J (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 19,529-538
- IV. Brosseau, Moffett. (2015). Functional and Genetic Analysis Identify a Role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. *Plant Cell*, (6), pp: 1742-54.
- V. Cervantes Gemma. Torre-Marín, M. Assumpta. (2005). Desarrollo sostenible. Barcelona, España: UPC.
- VI. CIAT. Los macronitritos en la nutrición de plantas de arroz. (1983).Colombia
- VII. Cuesta Moliner Candela, Cires Rodríguez Eduardo. (Agosto 29, 2014). *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en Biología. ResearchGate, No 52, 175-178.
- VIII. Devaiah, Ballchanda N. Nagarajan, K Vinay. Ragthama, Kaschandra.. (2007). Phosphate WRKY75 Transcription Factor Is a Modulator of Phosphate Acquisition and Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* . *Plant Physiol*, 143(4): , 1789–1801. 6/04/2015, De *Plant Physiol* Base de datos.
- IX. Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119,71-84
- X. Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt. (2009). Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. España: Editorial Panamericana.

- XI. Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D, Benning C (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc Nat Acad Sci, USA 95, 1950-1955
- XII. Fernández, María Teresa. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. Redalyc, vol. XLI, núm. 2, pp 57-67.
- XIII. Folch J., Lee M. y Sloane Stanley G.H. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". J. Biol. Chem. 1957.
- XIV. Garrido, Armando. Teijón, José María. Gaitán, Dolores. Villaverde Carmen. Ramírez, Jesus. Carlos, Mendoza. (2006). Fundamentos de Bioquímica Estructural. España: Tebar.
- XV. Guananga Quishpe, A. (2004). *Efecto de dos Arreglos Agroforestales en la Colonización Micorrizial y Contenido de Fosforo del Suelo en Cutuglahua, Pichincha*. Licenciatura. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- XVI. H. R. Lerner. (1999). *Plant responses to environmental stresses Phytohormones to genoma reorganization*. Estados Unidos de America: Marcel Dekker.
- XVII. H.L. Pedroso, L.C. Rocha-Filho, C. Lomônaco. (2006) Variación fenotípica de plantas del Cerrado (Sabana brasileña) frente a la heterogeneidad ambiental. Revista Científica Y Técnica Ecológica y del Medio Ambiente. Brasil. 38.400-902.
- XVIII. Herrera, Jorge. Ramiro, Alizaga. Eric Guevara. Victor, Jimenez. (2006). Germinación y crecimiento de plantas. Costa Rica: UCR.
- XIX. J. Qin, X. Ma, Z. Yi, Z. Tang, Y. Meng. (4 Agosto 2015). Plant Biology. Frontiers in Plant Science, 10.1111, /plb.12373.
- XX. Kass, D. 1996. Fertilidad de Suelos. Editorial EUNED, San José, Costa Rica. 272 p.
- XXI. Kondranka y Richer. (1997). Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome. New York.

- XXII. Lenin Sánchez Calderón. (2006). Caracterización genética de las respuestas morfo-fisiológica del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a la deficiencia de fósforo. (Tesis Doctoral). Centro de Investigación y Estudios Avanzados Campus Guanajuato Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética. México.
- XXIII. Lilia Bernal. Patricia Coello. Jorge Acosta. (2007). Eleazar Martínez-Barajas. Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). México. *Agro ciencia*, volumen 41, 291-297. 8/03/2015, De Redalyc Base de datos.
- XXIV. Lincon, Taiz. Eduardo, Zeiger. (2006). *Fisiología Vegetal*. E.U.A: Universitat Jaume. pp : 11-1205.
- XXV. LU Yan-li, LIN Hai-jian, ZHANG Shu-zhi, SHEN Ya-ou, LIU Hai-lan, ZHANG Zhi-ming, RONG Ting-zhao, ZHANG Xiao, TIAN Yue-hui, NIE Zhi, Shi-bin GAO. (2014). Genome-Wide Expression Profile of Maize Root Response to Phosphorus Deficiency Revealed by Deep Sequencing. . *Journal of integrative Agriculture*. , Vol. 13, 1216–1229. 6/04/2015.7.
- XXVI. Martón Gómez José Javier. (2013). Análisi morfológico de las semillas mediante modelos basados en las curva cardioide. España: Ediciones Universidad de Salamanca.
- XXVII. Mayerling Fernández, Shirley; Ramírez, Ricardo. (2000). Efecto de la fuente del fósforo sobre la morfología radical y la acumulación del elemento en siete líneas de maíz. *Bioagro*, vol. 12, núm. 2, pp. 41-46.
- XXVIII. Moreno, Resendez, Alejandro. (2007). Elementos nutritivos. Asimilación, funciones y toxicidad e indisponibilidad de los suelos. México: Libros Red.
- XXIX. MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- XXX. Navarro, García, Ginnes. Navarro, García Simon. (2013). *Química agrícola*. España: Mundiprensa.
- XXXI. Neil, Cambell. Lawrence, Mitchel. Jean Reeace. (2001). *Biología, conceptos y relaciones* . Mexico: Pearson.

- XXXII. Oliver, Cecilia. Santos, Juan L. Pradillo, Mónica. (2014). On the role of some ARGONAUTE proteins in meiosis and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 5, 5: 177.
- XXXIII. Parra, Carmen. Martínez Eleazar. Acosta Jorge. . (2004). Respuesta a la deficiencia de fosfatos en genotipos de frijol contrarrestantes en su capacidad de crecer suelos con bajo contenido de fósforo. . *Agrociencia*, vol 38, 54-78.
- XXXIV. Peter H. Raven, Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn. (1992). *Biología de las plantas*. Barcelona, España: Reverté.
- XXXV. Rue Marbeuf. (2002). Los fertilizantes y su uso. 12/10/2016, de Asociación internacional de la industria de los fertilizantes. Sitio web: <ftp://ftp.fao.org/aql/aqll/docs/fertuso.pdf>
- XXXVI. Runge-Metzger (1995) closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. John Wiley & Sons, New York.
- XXXVII. Shao, C. Dong, AW. Max, X. Meng, Y.. (Diciembre, 2014). Is Argonaute 1 the only effective silencer of smallRNA-mediated regulation of gene expression in plants? *Experimental Botany Journal*, 6293:9, (65/22).
- XXXVIII. Svitoonoff S. Creff, A. Re, Mand. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics*, (6), 39
- XXXIX. Valdés, López Oswaldo. Hernández, Georgina. ((Octubre, 2008.)). Transcriptional Regulation and Signaling in Phosphorus Starvation: What About Legumes? *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 50, paginas 1213-1222.
- XL. W. Meinke David, Cherry J. Michael, Dean Caroline, D. Rounsley Steven, Koornneef Maarten. (1998). *Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis*. *Science* Vol. 282, pp. 662-682.
- XLI. Xiao Fang Zhu, Zhi Wei Wang, Jiang Xue Wan, Ying Sun, Yun Rong Wu, Gui Xin Li, Ren Fang Shen, and Shao Jian Zheng. (2014, Diciembre 20). Pectin enhances rice (*Oryza sativa*) root phosphorus remobilization. *Journal Experimental Botany*, 66 (3), pp: 1017-1024.

- XLII. Xu R, Liu C, Li N, Zhang S. (2016 Julio 30). Global identification and expression analysis of stress-responsive genes of the Argonaute family in apple. NCBI: 10.1007/s00438-016-1236-6, pp. 59-64.

13. ANEXOS

13.1 Abreviaturas

- ❖ (**C**) Carbono
- ❖ (**+P**) Condiciones óptimas de fósforo
- ❖ (**AGO1**) Argonauta 1
- ❖ (**AGO10**) Argonauta 10
- ❖ (**AGO2**) Argonauta 2
- ❖ (**AGO3**) Argonauta 3
- ❖ (**AGO4**) Argonauta 4
- ❖ (**AGO5**) Argonauta 5
- ❖ (**ago5**) Argonauta 5 no expresante
- ❖ (**AGO6**) Argonauta 6
- ❖ (**AGO7**) Argonauta 7
- ❖ (**AGO8**) Argonauta 8
- ❖ (**AGO9**) Argonauta 9
- ❖ (**AR**) Arquitectura radical
- ❖ (**ATC**) Ácido tricloroacético
- ❖ (**ATP**) Adenosin trifosfato
- ❖ (**BF3**) Trifloruro de Boro
- ❖ (**Ca**) Calcio
- ❖ (**DCL**) Dicer
- ❖ (**Fe**) Hierro
- ❖ (**FeSO4**) Sulfato Ferroso
- ❖ (**H**) Hidrogeno
- ❖ (**HCL**) Acido clorhídrico
- ❖ (**HM**) Homocigoto
- ❖ (**Hz**) Heterocigoto
- ❖ (**LPR1**) Low Phosphate Root1
- ❖ (**lpr1**) Low Phosphate Root1 no expresante
- ❖ (**MCO**) Oxidasas multicobre
- ❖ (**Mel1**) Meliloti 1
- ❖ (**Mg**) Magnesio
- ❖ (**N**) Nitrogeno
- ❖ (**NaOH**) Hidróxido de sodio
- ❖ (**Nip**) Nippobare
- ❖ (**O**) Oxígeno
- ❖ (**-P**) Deficiencia de fósforo
- ❖ (**P**) Fósforo
- ❖ (**pH**) Potencial de hidrogeno
- ❖ (**Pi**) Fósforo inorganico
- ❖ (**PO₄³⁻**) Ortofosfato
- ❖ (**RA**) Raíces aéreas
- ❖ (**RLs**) Raíces laterales
- ❖ (**RNA**) Ácido ribonucleico
- ❖ (**RNAs**) ARN small

- ❖ **(RP)** Raíz principal
- ❖ **(RuBisCo)** Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa
- ❖ **(UV)** Luz ultravioleta
- ❖ **(Wt)** Silvestre

13.2 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

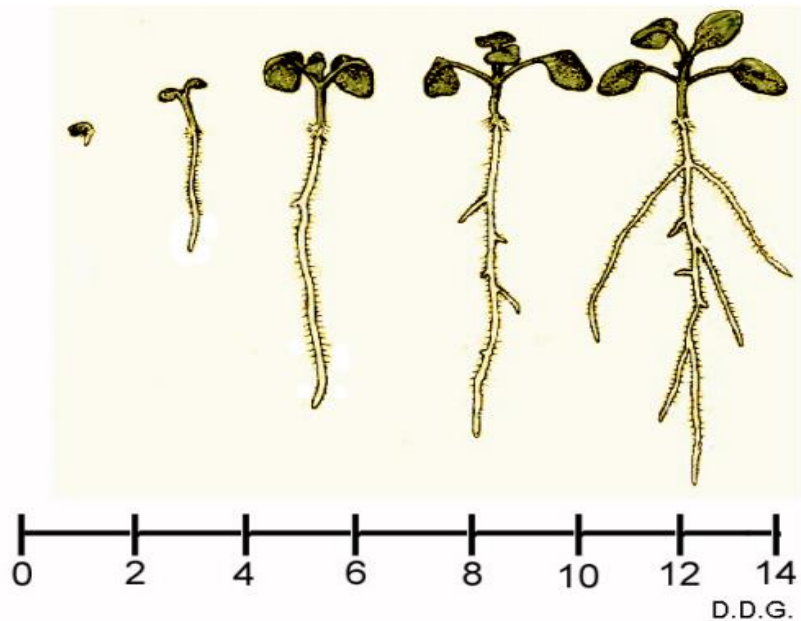


Figura 11. Esquema del desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana* . Calderón.(2006)

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea de pequeño tamaño y ciclo anual empleada como organismo modelo para el estudio de la biología molecular, la fisiología y la genética de plantas.(Meinke *et al.*,2010) No representa un alto valor agronómico, perteneciente a la familia de las Brassicaceae tiene ventajas para la investigación desde hace 40 años, por su características como el tamaño pequeño de su genoma organizado en 5 cromosomas(125 Mb), un ciclo de vida rápido toma una tiempo de alrededor de 6 semanas desde la germinación hasta la aparición de semillas maduras, fácil producción de semillas con un tamaño aproximado de 0.5mm, rápido cultivo en condiciones de laboratorio y gran número de líneas mutantes

(Martón y Gómez 2013). Usada en la investigación de genómica funcional de *Arabidopsis* por la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma (Moliner, Rodríguez, 2014).