



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**LHP1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*:
comprendiendo su función a través del análisis de
mutantes**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

María Teresa Alejo Vinogradova



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2018



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.

1. Datos del alumno
Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta 1.

2. Datos del tutor
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.
Título

Subtítulo
Número de páginas
Año

1. Datos del alumno
Alejo
Vinogradova
María Teresa
5549500814
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
414014040

2. Datos del tutor
Dra.
Ma. de la Paz
Sánchez
Jiménez

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Sol
Cristians
Niizawa

4. Datos del sinodal 2
Dr.
Javier Andrés
Juárez
Díaz

5. Datos del sinodal 3
Dra.
Rosalinda
Tapia
López

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Edén Marcela
Rodríguez
Flores

7. Datos del trabajo escrito.
LHP1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*:
comprendiendo su función a través del análisis de
mutantes

86
2018

Agradecimientos académicos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma de la Paz Sánchez Jiménez, en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, 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 y Berenice Garcia Ponce de León, y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo Ríos; 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. Además quiero agradecer a los miembros del jurado, por dedicar tiempo a la revisión de este trabajo, y aportar sugerencias que mejoraron este escrito final de mi trabajo de licenciatura.

El financiamiento para insumos, secuenciación, trabajo de campo y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación

CONACYT: 240180, 2015-01-687

UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN211516, IN208517, IN205517, IN204217

Agradecimientos personales

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a:

Mis padres, por el constante apoyo, los grandes consejos y las mejores pláticas, por creer en mí y por promover mi superación. Los quiero mucho.

A mi hermana, Alina, que, aunque explícitamente dije “no” a tener una hermana, no me arrepiento de que estuvieras ahí para ser objeto de peleas, golpes, bullying, carcajadas, tardeadas y maratones de Netflix y buenas conversaciones. Te quiero Pollo.

A Jesús por soportar por bastante tiempo, mis comentarios, mis enojos, mis momentos de depresión, por apoyarme siempre. Gracias por ser mi mejor amigo y mi novio.

A Maya, Cleo, Gary (en paz descancen), Vasili, Bush, Sherlock, Chato, Beni y Gregorio, por estar ahí cuando necesitaba de acariciar, apachurar, molestar, aplastar o abrazar “algo peludo”.

A mis amigos, Itzel, Manu, Stella, y Javi, por los buenos momentos, por las prácticas de campo, por las experiencias en equipo y por hacer de esta carrera toda una aventura. . . los quiero, tanto como pueda querer un robot.

Especialmente gracias a Itzel, por los muchos semestres de compañía y amistad, y por lo que están por venir, gracias por ser mi amiga. A Manu, por todos los momentos de reflexión filosófica. A Stell, por todas las horas (y HORAS!) de pláticas, por escuchar mis problemas, por soportar mis dramas y las bromas inocentes.

Ah... también a Yustis (Junior) por ser un buen amigo por casi tres años, por ser mi cómplice de bullying contra Stell, por esforzarse tanto todo los días por hacerme creer que en serio soy un robot. Thanks Bro.

A los Epichicos, a los que quedan y a los que se fueron (Stefan y Pame) por ser el mejor equipo de trabajo del “mundo mundial” (que es algo que diría Nancy. . . no yo). A todos los chicos de Lab, por las fiestas y por las platicas a la hora de la comida. Hicieron del lab una experiencia única.

Un agradecimiento especial a: Mirna, por compartir conmigo un año de experiencias, y gracias a ella y a Harumi y Claudia por ser el MEJOR equipo de la vida, creo será algo que jamás podré repetir.

Índice general

Resumen	1
1 Introducción	3
1.1 La epigenética: definición y mecanismos	3
1.2 La metilación de histonas y su función en la regulación epigenética	6
1.3 Regulación epigenética a través de Trithorax y Polycomb	7
1.4 El grupo Trithorax (TrxG): composición y función	9
1.5 El grupo Polycomb (PcG): composición y función	10
1.5.1 Subcomplejo Represor de Polycomb 2 (PRC2)	11
1.5.2 Complejo represor de Polycomb 1 (PRC1)	13
1.6 Los mecanismos de acción de PcG	14
1.7 LHP1 y su función en la regulación epigenética	16
1.8 La raíz de Arabidopsis como modelo para estudiar a LHP1 en el desarrollo	17
Hipótesis	21
Objetivos	21
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
2 Materiales y Métodos	23
2.1 Material biológico	23
2.2 Condiciones de crecimiento	23
2.3 Generación de plantas <i>pLHP1:LHP1:GFP</i> para el estudio de la expresión de <i>LHP1</i>	24
2.3.1 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y comprobación de las clonas obtenidas	24
2.3.2 Transformación de Arabidopsis con la construcción <i>pLHP1:LHP1:GFP</i>	24
2.3.3 Genotipado de las plantas transformadas	25
2.4 Análisis morfológicos de la raíz	25

2.4.1	Cinéticas de crecimiento	25
2.4.2	Análisis microscópico para el estudio morfológico del meristemo radicular	26
2.5	Generación de herramientas para el estudio de los complejos PcG y TrxG .	26
2.5.1	Clonación y recombinación de <i>ATX1</i>	26
2.5.2	Recombinación de <i>CLF</i>	28
3	Resultados	29
I	Estudio de la función de LHP1 en la raíz de Arabidopsis.	31
3.1	Análisis <i>in silico</i> de la expresión de <i>LHP1</i> en raíz	31
3.2	Fenotipo en raíces de las plantas mutantes de pérdida de función de <i>LHP1</i>	33
3.3	Expresión de <i>LHP1</i> en la raíz de Arabidopsis	40
II	Generación de herramientas moleculares para el estudio de TrxG y PcG	45
3.4	Clonación y recombinación del gen <i>ATX1</i>	45
3.5	Recombinación del gen <i>CLF</i>	46
4	Discusión	49
5	Conclusiones	55
6	Referencias	57
7	Anexo	65

Índice de figuras

1	Procesos, en plantas, a los cuales los complejos PcG y TrxG están asociados .	8
2	Componentes del complejo PcG	11
3	Variantes del complejo PRC2 que participan en diferentes procesos del desarrollo de Arabidopsis	12
4	Mecanismos de PcG en plantas	15
5	Anatomía de la raíz de Arabidopsis	18
6	Análisis de la expresión <i>in silico</i> del gen <i>LHP1</i> en Arabidopsis, comparado con otros miembros de PRC1 y PRC2	32
7	Longitud total de la raíz	34
8	Mediciones del meristemo de la raíz	36
9	Divisiones ectópicas en la endodermis del RAM de las mutantes de <i>LHP1</i> . .	37
10	Morfología del SCN	39
11	Expresión de <i>pWOX5:GFP</i>	40
12	Expresión de <i>LHP1</i> en la raíz de Arabidopsis	41
13	Fenotipo aéreo de las líneas Wt y mutantes <i>lhp1-6</i> transformadas con la construcción <i>pLHP1:LHP1:GFP</i>	42
14	Fenotipo aéreo de las líneas Wt y mutantes <i>lhp1-6</i> transformadas con la construcción <i>pLHP1:LHP1:GFP</i>	43
15	Clonación y recombinación de <i>ATX1</i>	47
16	Análisis de las clonas de <i>CLF</i> obtenidas a partir de su recombinación con el vector pGWB4	48
A1	Estructura del gen <i>LHP1</i> en las mutantes.	66
A2	Genotipado de las plantas mutantes complementadas <i>lhp1-6</i>	67
A3	Genotipado de las plantas Wt/ <i>pLHP1:LHP1:GFP</i>	68
A4	Esquema del funcionamiento del sistema GATEWAY	69
A5	Secuencia completa de la <i>ATX1</i> en pCR [™] 8/GW/TOPO [™] , clona B1	74

Índice de tablas

- A1 Lista de primers usados en el genotipado de las líneas Wt, *lhp1-6* y *tfl2-2*. . . 65
- A2 Lista de primers usados durante la clonación y recombinación de *ATX1* y *CLF*. 65

Resumen

El grupo Polycomb es un complejo que participa en varios procesos del desarrollo en animales y plantas. Está compuesto por dos sub complejos: (1) PRC2, encargado de la catálisis de la marca H3K27me₃; y (2) PRC1, el cual reconoce la marca que deposita PRC2 y, a su vez, coloca la H2A119ub en animales y H2A121ub en plantas. El entendimiento del mecanismo por el cual PcG genera represión y regula a sus genes blanco, se ha ido modificando a partir de estudios recientes. Se ha encontrado que en algunos casos no se requiere de la H2A119ub para generar represión, o contrario no se requiere a la H3K27me₃, también se ha descrito que el reclutamiento de PRC2 y PRC1 puede ser a la inversa del mecanismo canónico. Particularmente, PRC1 se ha caracterizado muy poco y es el sub complejo menos conservado. Uno de sus componentes es LHP1, el lector de la marca H3K27me₃, cuya estructura es diferente a su homólogo en *Drosophila* y el cual también puede interactuar con PRC2, sugiriendo actúa como puente en el mecanismo de reclutamiento. LHP1 ha sido muy poco estudiado en el desarrollo de *Arabidopsis*, se ha caracterizado que sus mutantes presentan floración temprana, flores terminales y una roseta pequeña con un escape pequeño, y se describió que no presenta fenotipo en la raíz. Por ello en este trabajo, se caracterizó el fenotipo de dos mutantes de *LHP1*, *lhp1-6* y *tfl2-2*. Se encontró que las raíces de estas mutantes presentan diferencias con respecto al control, siendo más cortas a partir de los 5 días pos siembra (dps), lo cual se puede explicar por un cambio en el tamaño de las células del meristemo apical de raíz. También se observó que la longitud de la raíz es muy variable, sugiriendo que la ausencia de LHP1 tiene un efecto en la plasticidad de las plantas. Por otra parte, se encontraron dos afectaciones en el RAM; divisiones ectópicas en la endodermis y desorganización del nicho de células troncales (SCN). Este último fenotipo no se puede explicar por la desregulación de *WOX5*, ya que no se encontraron cambios en la expresión de *WOX5* en la mutante *lhp1-6*. Por último, los fenotipos anteriormente descritos se deben a la ausencia de LHP1, ya que al generar plantas *lhp1-6* complementadas con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*, se obtuvo una complementación casi total en la parte aérea. Los resultados mostraron que LHP1 tiene un papel importante en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, y particularmente en el mantenimiento del SCN. Además, se generaron dos herramientas moleculares para el estudio de *CLF* y *ATX1*, por medio del uso del sistema GATEWAY de clonación y recombinación, para profundizar en los mecanismos por los cuales PcG regula a los genes asociados al mantenimiento y organización de SCN, y para incluir en esta red a proteínas del complejo TrxG, el cual está involucrado en la dinámica de activación transcripcional y que se ha visto relacionado con PcG en la regulación de ciertos genes.

Introducción

1.1 La epigenética: definición y mecanismos

La epigenética como rama surge a partir del trabajo del biólogo del desarrollo Conrad Hal Waddington, que en 1942 usa por primera vez el término refiriéndose al estudio de los mecanismos por los cuales un genotipo tiene efectos en el fenotipo de un organismo (Van Speybroeck, 2002; Waddington, 2012). La idea original de Waddington fue retomada posteriormente por otros investigadores. Holliday en 1994, propone dos definiciones para el término epigenética: (1) “El estudio de los cambios en la expresión génica, que ocurren en los organismos con células diferenciadas, y la herencia mitótica de ciertos patrones de expresión”; y (2) “herencia nuclear que no está basada en diferencias en la secuencia del DNA” (Deans y Maggert, 2015).

La definición de Holliday como idea es la que ha sido retomada y usada extensamente, Wu y Morris en 2001 definen esta rama de la biología y de la genética como “el estudio de los cambios en la función de los genes que son heredables mitótica y/o meióticamente y no implican cambios en la secuencia de DNA” (Wu y Morris, 2001). Por otra parte, en 2009, Jablonka et al. (2009) remarcan que existe una diferencia entre epigenética y la herencia epigenética, definiendo la primera como “el estudio de los procesos que subyacen la plasticidad del desarrollo y la canalización y que traen consigo efectos en el desarrollo de eucariontes y procariontes” (Jablonka et al., 2009). Actualmente, una de las definiciones más aceptadas por la comunidad científica y la que se aplicó en este trabajo, es la que dio Russo en 1996, quien define a la epigenética como “el estudio de los cambios mitótica y/o meióticamente heredables en la función de los genes que no pueden explicarse por cambios en la secuencia de DNA” (Russo et al., 1996).

Una de las grandes aportaciones del trabajo de Waddington, fue demostrar que la genética no lo es todo cuando se trata de interpretar al fenotipo. Introdujo por primera vez la idea de la interacción génica, mostrando que el desarrollo de los organismos depende en gran medida de la regulación de los genes y la dinámica de sus interacciones. Por ello no se puede asumir linealidad entre los cambios en el genoma y los efectos en el fenotipo, ya que la mutación de un gen es reflejo no sólo de su función, sino también de su interacción con otros genes (Jablonka y Lamb, 2002). Por otra parte, Waddington hace énfasis en la

herencia de estas interacciones, teniendo que no sólo las modificaciones directas en los genes son heredables, sino también su regulación epigenética (Jablonka et al., 2009).

Los mecanismos epigenéticos tienen un papel fundamental en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular que se llevan a cabo durante el desarrollo de los organismos. Estos mecanismos se encuentran conservados entre animales y plantas, aunque existen algunas variaciones atribuidas a las diferencias fisiológicas y de desarrollo. Particularmente en plantas, los mecanismos epigenéticos tienen gran relevancia dado su carácter sésil, que les impide escapar de las adversidades del medio ambiente que las rodea, requieren de respuestas rápidas y eficientes para adaptarse a estos cambios. Al respecto los factores epigenéticos pueden integrar las señales ambientales que reciben y así generar respuestas más rápidas para una mejor adaptación.

En este sentido los mecanismos epigenéticos permiten generar cambios en la expresión génica sin alterar la secuencia de DNA, generando respuestas inmediatas. Los principales mecanismos de regulación epigenética descritos son: i) metilación de DNA, ii) modificaciones post-traduccionales de histonas y iii) regulación por RNA no codificantes. La forma general en la que funcionan estos mecanismos epigenéticos es a través de la deposición de las marcas y el reconocimiento y el borrado de las mismas. Por ello cada proceso regulado por estos mecanismos involucra la presencia de tres tipos de proteínas; aquellas que colocan la marca (*writers*), aquellas que la reconocen (*readers*) y las que la borran (*erasers*). Así cada complejo puede contener varios homólogos de cada tipo de proteína, que en conjunto permiten tener una cromatina dinámica para regular la expresión génica. (Berr et al., 2011).

Uno de los primeros mecanismos descritos fue la metilación del DNA en modelos animales, donde se encontró que ésta se presenta principalmente en los residuos de citosinas (5mC) en un contexto CpG (Li y Zhang, 2014). A diferencia de lo que ocurre en animales, en plantas la metilación del DNA se da en las citosinas en cualquier contexto, ya sea CG, CHG y CHH (donde H puede ser A, T o C). Comúnmente la 5mC está asociada a la heterocromatina (tanto facultativa como constitutiva) y por tanto a la represión o silenciamiento génico. Las enzimas encargadas de colocar esta marca son las DNA metiltransferasas, las cuales pueden ser de mantenimiento o estar participando en la metilación de novo. La remoción de esta marca se puede dar de dos maneras: (1) pasiva, que implica que se pierde durante la replicación; y (2) activa, donde participan enzimas, siendo esta la más común en plantas (He et al., 2011; Pikaard et al., 2014). En algunos casos, para que la metilación del DNA ocurra, se requieren de otros complejos epigenéticos que permiten el reclutamiento de las metiltransferasas y el establecimiento de la metilación en los genes blanco. Por ejemplo, se sabe que la acción histona metiltransferasa KRYPTONITE (KYP)

de plantas es necesaria para el mantenimiento de la metilación en sitios CHG (Jackson et al., 2002).

En el caso de los RNA no codificantes, en plantas se pueden dividir en dos grupos: los RNA largos no codificantes (lncRNA) y los RNA cortos no codificantes (sRNA). Los lncRNA se transcriben por las RNA polimerasas II y III, además de la IV y V y tienen funciones importantes en diversos procesos celulares, como lo son el procesamiento de RNA y la regulación de la expresión génica. En plantas, se han estudiado estos RNA en los procesos de vernalización y la regulación de auxinas, los cuales son medidos por cambios en el arreglo de la topología nuclear (Ariel et al., 2014). Por otra parte, de los sRNA se sabe que en plantas son móviles y participan en la modulación de la metilación del DNA, que además ha demostrado ser heredable (Liu et al., 2015).

Otro de los mecanismos epigenéticos es el que se da a través de las modificaciones post-traduccionales de las histonas. Las histonas son proteínas pequeñas, codificadas en tándem, que se componen de una región con estructura terciaria globular y otra región con alto contenido de lisinas (K) y argininas (A). Se arreglan formando octámeros compuestos por los dímeros de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que conforman los nucleosomas alrededor de los cuales se enrollan 147pb de DNA. Este conjunto de proteínas, DNA y otros componentes, como proteínas no histonas y RNA, conforman a la cromatina. De acuerdo a estos componentes, la cromatina se clasificó en eucromatina (cromatina laxa) o heterocromatina facultativa o constitutiva (cromatina condensada); sin embargo, en la actualidad se han descrito cinco tipos de cromatina para animales (Filion et al., 2010) y 9 tipos de cromatina para plantas dependiendo del conjunto de marcas epigenéticas que contengan (Sequeira-Mendes et al., 2014).

Las histonas pueden modificarse post-traduccionamente, principalmente en sus regiones N-terminal, ya que contienen residuos susceptibles a acetilaciones, metilaciones, ubiquitinaciones, SUMOilaciones, fosforilaciones entre otros. Estas modificaciones son importantes porque pueden, directa o indirectamente (a través de factores epigenéticos), modificar la estructura de la cromatina, lo que puede derivar en la activación, represión o silenciamiento de los genes o de regiones específicas (Bannister y Kouzarides, 2011).

1.2 La metilación de histonas y su función en la regulación epigenética

La metilación de histonas es una marca muy estudiada tanto en mamíferos como en plantas. A diferencia de la metilación del DNA, la metilación de histonas puede inducir la activación o represión transcripcional, dependiendo tanto del residuo modificado como del número de metilos. Así, la metilación de las histonas se da generalmente en las lisinas (en algunos casos también en argininas) de la cola N-terminal de las histonas H3 y H4, dentro de las cuales se han descrito modificaciones en: H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 y H4K20, y pueden presentarse en tres estados mono, di o tri metilados. En animales, se ha establecido que la combinación de ciertas marcas permite la activación transcripcional, como son la H3K4me_{2/3}, H3K36me₃ y H4K20me₁ mientras que otras como la H4K20me₃, H3K27me₃ y la H3K9me₃ promueven la represión (Schuettengruber et al., 2011; Schubert et al., 2006; Jørgensen et al., 2013). Esta combinación de marcas difiere un poco en plantas, ya que se ha reportado que la marca de H3K9me_{1/2} promueve represión, mientras que la H3K9me₃ está más asociada a activación transcripcional (Jackson et al., 2004). Por otra parte la marca de H4K20me₃ en plantas está más asociada a activación transcripcional (Sánchez y Gutierrez, 2009).

Se ha observado que las marcas de metilación se encuentran distribuidas en patrones específicos, lo que permite hacer asociaciones de alguna marca con cierta región génica o intergénica, por ejemplo, la H3K4me₁ se deposita en enhancers y promotores, mientras que la H3K27me₃ solo en promotores y la H3K4me₃ abarca parte del promotor y del primer exón. Sin embargo, en plantas los límites entre marcas y sus sitios de deposición son más difusos, o diferentes a los establecidos en animales, implicando que la regulación epigenética tiene varios aspectos específicos de cada organismo (Xiao et al., 2016). Es importante mencionar que además de la metilación de las histonas, la regulación epigenética requiere de la participación de otras modificaciones de histonas, por lo que cada zona (e.g. zonas promotoras, intergénicas, génicas, telómericas o de transposones) tiene un set de marcas epigenéticas específicas que determinan un estado de la cromatina particular

La metilación en las lisinas de las histonas es catalizada por las histona metiltransferasas de lisina (HKMT), proteínas que se distinguen por presentar un dominio catalítico denominado SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax) (Trievel, 2004). En plantas se han descrito varias HKMT, algunas de ellas son capaces de colocar varios grupos metilo, e incluso modificar más de una lisina. Se les ha agrupado en 4 clases, dependiendo de su función, teniendo que en la clase 1, se encuentran las HKMT homólogas a *E(Z)* que

colocan la marca de H3K27me3 y en la clase 2 aquellas homólogas a *trx* que catalizan la H3K4me3, la clase 3 agrupa a las enzimas que colocan la H3K36me3 homólogas a *ash1* y por último, están, tenemos a las proteínas SET más parecidas a Suv(var)3-9 que se asocian a la H3K9me2/3 (Baumbusch et al., 2001). Las HKTM de cada grupo pueden formar complejos específicos con otras proteínas, generando así grupos asociados a ciertos procesos de activación o de represión.

Los *readers* o lectores de estas marcas generalmente contienen cromodominos, dominios PHD, WD40 o Tudor, los cuales sirven para reconocer marcas de metilación específicas y además, contienen otros dominios que les permite interactuar con otras proteínas que ayudan a la conformación de la cromatina. El hecho de que los lectores puedan reconocer marcas específicas, promueve una regulación fina, donde cada estado de metilación tiene importancia para la regulación positiva o negativa de los genes (Yun et al., 2011). Por otro lado, la dinámica de la cromatina depende de otro grupo de proteínas que se encargan de eliminar estas marcas, los llamados *erasers* o borradores que son en gran parte las proteínas JUMONJI (JMJ), que tienen actividad de desmetilasas de histonas y que están asociadas a los diferentes complejos epigenéticos, siendo importantes para regular la deposición de las marcas (Xiao et al., 2016).

Existen varios complejos de proteínas descritos que regulan la dinámica de la cromatina, cada uno de ellos puede contener a los lectores, a los escritores y a los borradores de varios tipos de marcas. Dentro de estos complejos encontramos aquellos que se componen de proteínas desacetilasas de histonas (HDAC) y de remodeladores de la cromatina conocido como el complejo NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase), el cual está involucrado en varios procesos del desarrollo embrionario (Basta y Rauchman, 2015). Otro par de complejos importantes en diversos procesos del desarrollo son los complejos Trithorax y Polycomb, los cuales contienen los lectores y escritores de marcas importantes para la activación y represión, respectivamente (Xiao et al., 2016). Esta asociación entre proteínas para formar complejos específicos es lo que en última instancia moldea a la cromatina y por ende, regula la expresión de los genes.

1.3 Regulación epigenética a través de Trithorax y Polycomb

En plantas, los grupos Trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG), son complejos multiproteicos capaces de depositar y reconocer marcas de metilación en histonas. Estos complejos se han etiquetado como antagónicos porque mientras que TrxG contiene los elementos necesarios

para promover la activación transcripcional, PcG contiene los de represión. La función de PcG y TrxG es esencial en diversos procesos del desarrollo tanto en animales como en plantas. Están involucrados en la regulación del ciclo celular, a través de la modulación de la senescencia y la detección y reparación del daño al DNA. También participan en vías de transducción de señales, como aquellas asociadas a la vía MAPK. Se ha descrito su papel en el mantenimiento y en la diferenciación de células troncales, siendo importantes para la transición de los diferentes linajes celulares (figura 1; Schuettengruber et al., 2011).



figura 1. Procesos, en plantas, a los cuales los complejos PcG y TrxG están asociados. Adaptado de Schuettengruber et al., 2011.

Estos factores epigenéticos inicialmente fueron descritos en *Drosophila*, en donde se determinó que tienen un papel importante en la modulación de genes HOX, que codifican factores transcripcionales que modulan la proliferación y la diferenciación celular. Los componentes descritos de TrxG tienen homólogos en mamíferos y plantas, siendo un grupo bastante conservado (Schuettengruber et al., 2011; Sanchez et al., 2015). Entre sus componentes encontramos varias histonas metiltransferasas, proteínas remodeladoras de la cromatina y proteínas que ayudan a las interacciones entre estos componentes. Por otra parte, PcG está conformado por dos subcomplejos: el subcomplejo represor de Polycomb 1 (PRC1) ; y el 2 (PRC2). Mientras que PRC2 contiene a la histona metiltransferasa, así como otras proteínas que promueven el reclutamiento del complejo y su asociación con factores de transcripción; PRC1 contiene proteínas ubiquitintransferasas y otras proteínas que reconocen las marcas de las histonas (Derkacheva y Hennig, 2014). Al igual que en

Drosophila, en plantas estos complejos se han visto asociados a genes MADS-box que presentan funciones similares a los genes HOX. Aunque PcG tiene varios componentes conservados, existen algunas diferencias en plantas que podrían estar asociadas a sus características plásticas propias.

Estos factores epigenéticos regulan varios procesos del desarrollo de las plantas, algunos de ellos de manera antagónica. Además se ha demostrado que ambos complejos actúan como integradores de señales ambientales (Ding et al., 2012). De ahí que estos grupos proteicos sean de tanto interés en plantas y por lo mismo, deben estudiarse con mayor profundidad.

1.4 El grupo Trithorax (TrxG): composición y función

TrxG en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), es un complejo asociado a la activación transcripcional a través de la deposición de las marcas H3K4me3 y H3K36me3. Tiene varios componentes, entre los cuales se encuentran a las HKMT que contienen un dominio SET, remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y otro tipo de proteínas que en conjunto con las HKMT forman el complejo COMPASS-like (Schuettengruber et al., 2011). En animales se ha descrito una familia de metiltransferasas capaces de mono, di o trimetilar la H3K4 que incluye a MIXED LINEAGE LEUKAEMIA 1-4 (MLL 1-4) y SET A y B. En tanto que en plantas, como es común, las duplicaciones génicas han generado la presencia de varias proteínas parálogas, las HKMT de TrxG descritas hasta ahora son ARABIDOPSIS TRITHORAX 1, 2, 3, 4 y 5, diferenciándose ATX1 y 2 por la presencia de un dominio DAST y por estar más involucradas en la de posición de la H3K4me3 (Alvarez-Venegas y Avramova, 2001), mientras que ATX3, 4 y 5 parecen ser redundantes (Chen et al., 2017). Además, existen las proteínas ARABIDOPSIS TRITHORAX RELATED/SET DOMAIN GROUP 3 (ATXR3/SDG2) y 7 (ATXR7/SDG25) que también catalizan la H3K4me3 y SDG25 además coloca la H3K36me3. Se ha reportado que ATXR3 es una de las enzimas más importantes de este grupo de proteínas, ya que la pérdida de función de ésta provoca una disminución mayor de la marca de H3K4me3 respecto a la de ATX1 y ATX2 (Guo et al., 2010). Asociado a estas proteínas también se encuentran ABSENT SMALL HOMEOTIC DISCS1 HOMOLOG 2 (ASHH2/SDG8), implicado en la deposición H3K36me2/3 y ASHH1/SDG26 asociado a las marcas H3K4me3 y H3K36me3 (Berr et al., 2011).

Las HKMT de TrxG requieren del complejo COMPASS-like para llevar a cabo su función. En animales, este complejo está conformado por las proteínas Set1/Ash2 (complejo de histona metil transferasa ASH2), la proteína de unión a retinoblastoma (RbBP5), la

proteína 5 con repeticiones de WD (WDr5) y la proteína Dpy-30(Dpy30), donde las proteínas RbBP5-ASHL forman un heterodímero que proveen del dominio necesario para promover la actividad del dominio SET (Li et al., 2016). A diferencia de animales, las HTKM's de plantas contienen todos los dominios necesarios para modificar a las histonas, pero aun requieren del complejo homólogo a COMPASS-like para regular correctamente a los genes. Este complejo está formado por la proteína relacionada a ARABIDOPSIS Ash2 (ASH2R), WDR5 y la proteína similar a retinoblastoma (RBL) (Jiang et al., 2011).

Por último, los remodeladores dependientes de ATP en animales son Brahma (BRM) y BRG1, además de un grupo de modificadores de la cromatina (CHD). Homólogos de estas proteínas se han identificado en plantas, entre los cuales están BRAHMA (BRM), SPLAYED (SYD) y PICKLE (PKL) (Sanchez et al., 2015). Además de los componentes descritos, en plantas existen dos proteínas que pertenecen al grupo TrxG que se encuentran exclusivamente en plantas, ULTRAPETALA 1 (ULT1) y 2 (ULT2), a las cuales se les ha atribuido una función de coactivador, y se cree que promueven la deposición de la marca por medio de la interacción con ATX1 (Carles y Fletcher, 2009).

La forma en que TrxG es reclutado y actúa sobre sus genes blanco varía entre organismos. En plantas se ha visto que ATX1 es capaz de unirse tanto a proteínas de unión a factores de transcripción (TBP) como a la Ser5P de la RNA Pol II, por lo que en este caso TrxG tiene asociación directa con la maquinaria de la transcripción (Ding et al., 2011), similar a lo que se ha descrito en animales. En plantas también se ha observado que la marca H3K4me3 es necesaria para el proceso de elongación y no para iniciación como sucede en animales, siendo que a través de ella actúen metiltransferasas de la H3K36me3, y así se promueva la transcripción (Ding et al., 2012).

Se ha estudiado la función de TrxG en la modulación de genes clave para varios procesos del desarrollo de las plantas, así como en procesos de integración de señales ambientales para regular la floración a través de la regulación transcripcional del gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, el cual es un gen MADS-box importante para la transición a la floración y que se regula antagónicamente por PcG (Alvarez-Venegas, 2010).

1.5 El grupo Polycomb (PcG): composición y función

El grupo Polycomb (PcG) se ha descrito como la contraposición del grupo TrxG, siendo este el encargado de catalizar marcas asociadas a represión transcripcional. De manera similar a TrxG, contiene HKMT con un dominio SET asociadas a proteínas que reconocen la marca y ayudan a remodelar la cromatina. El sub complejo PRC2 de PcG es el encargado

de la catálisis de la trimetilación de H3K27me3 y el subcomplejo PRC1 es el que reconoce la marca y promueve la ubiquitinación en la histona H2A (figura 2).

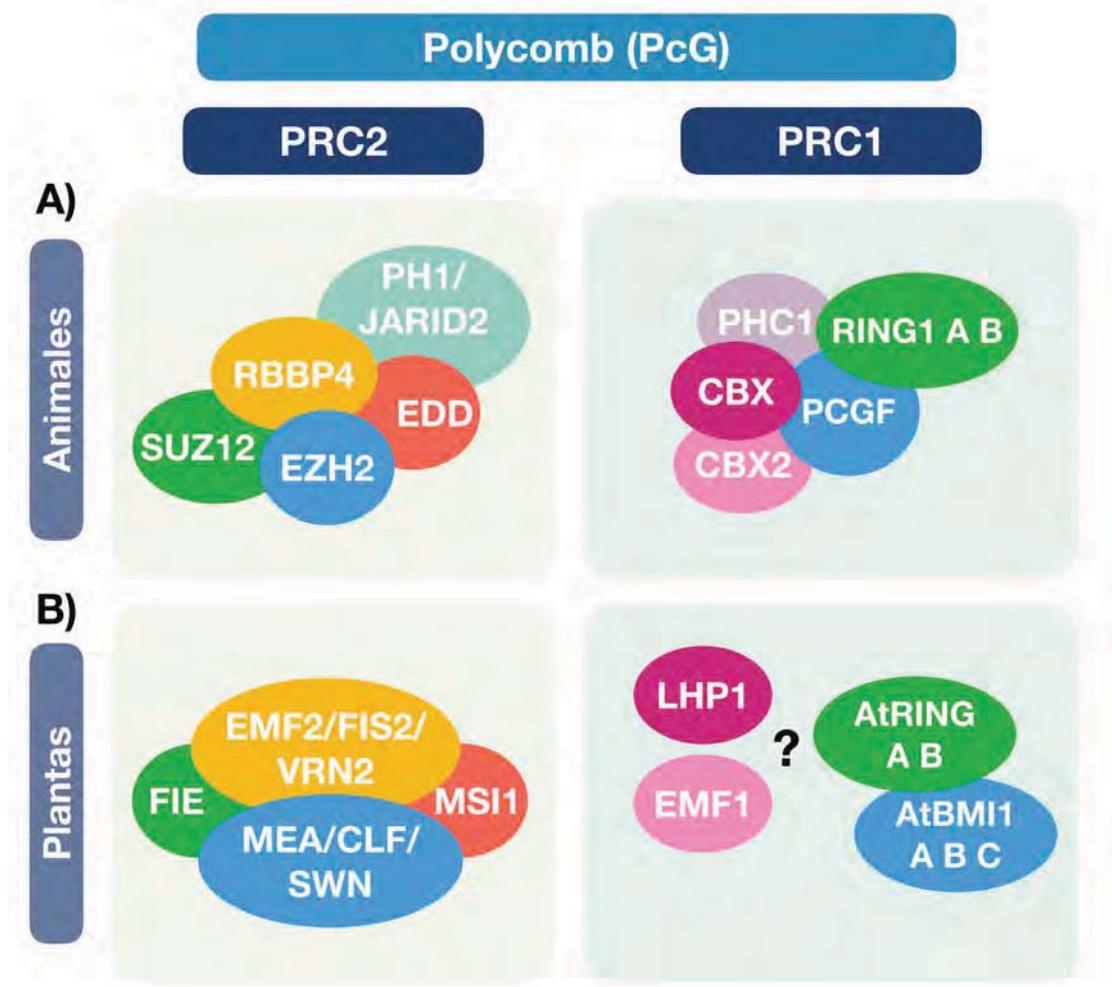


figura 2. Componentes del complejo PcG. A) Proteínas de PRC1 y PRC2 encontradas en mamíferos. B) Homólogos de PcG encontrados en Arabidopsis, en el caso de PRC1 no se ha demostrado que las proteínas descritas formen un complejo como ocurre en animales, aunque si existen evidencias sobre las interacciones entre ellas. Adaptado de Molitor y Shen, 2012; Simon y Kingston, 2009, Xiao y Wagner, 2014.

1.5.1 Subcomplejo Represor de Polycomb 2 (PRC2)

El subcomplejo PRC2 cumple funciones similares tanto en animales como plantas. En animales PRC2 está compuesto por el homólogo al *enhancer* de zeste 2 (EZH2), el supresor 12 de zeste (SUZ12), EMBRYONIC ECTODERM DEVELOPMENT (EED) Y la proteína de

unión a retinoblastoma P46 y 8 (RBAP46 y 8), donde EZH2 contienen la unidad catalítica SET que coloca la marca H3K27me3. En plantas existen tres homólogos a EZH2/1, CURLY LEAF (CLF), SWINGER (SWN) Y MEDEA (MEA) asociadas a las proteínas FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2), VERNALIZATION 2 (VRN2), EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2) y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1). De manera interesante, en animales se ha identificado que PRC2 tiene dos posibles variantes, una conteniendo a las proteínas POLYCOMB LIKE PCL 1,2 y 3 y la otra a JARID2 y AEBP2 (Zhang et al., 2015). De manera similar en plantas, se han descrito tres variantes de este sub complejo, FIS-PRC2, VRN-PRC2 y EMF2-PRC2, los cuales participan en diferentes etapas del desarrollo (figura 3; Hennig y Derkacheva, 2009).

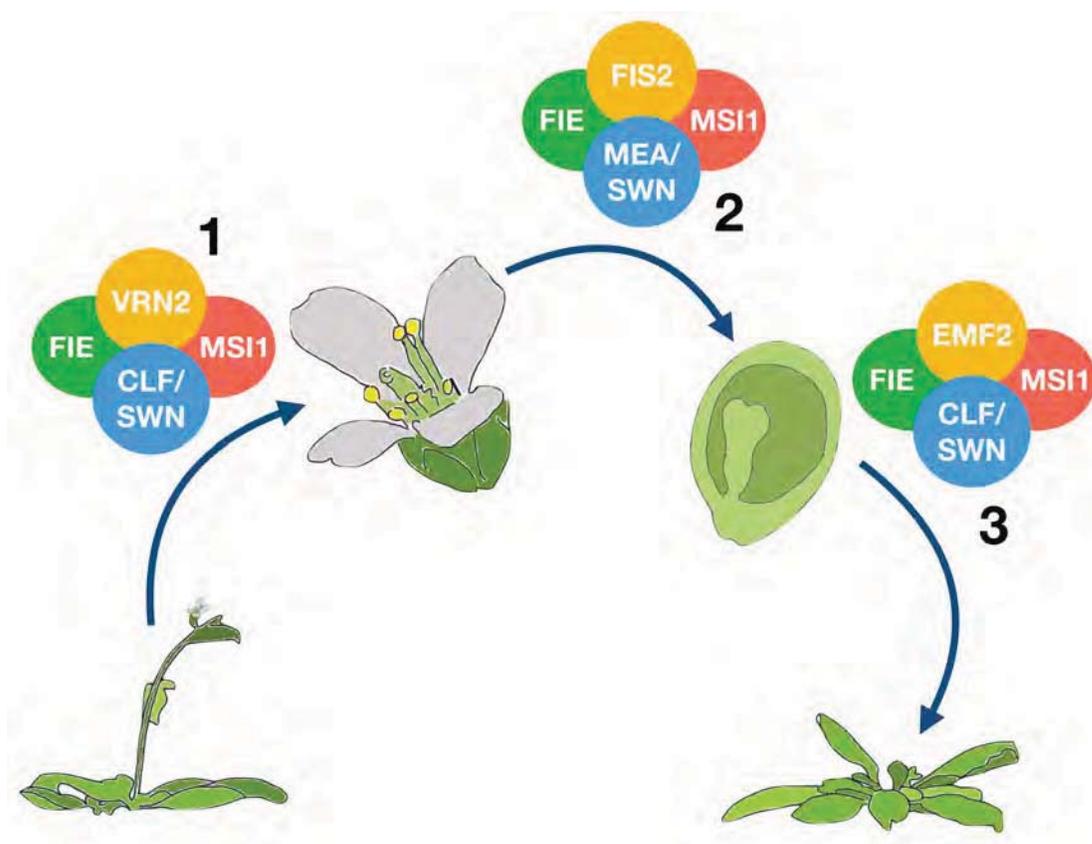


figura 3. Variantes del complejo PRC2 que participan en diferentes procesos del desarrollo de Arabidopsis: transición a floración, desarrollo embrionario y desarrollo vegetativo. Adaptado de Hennig y Derkacheva, 2009.

Las variantes de PRC2 están involucradas en procesos diferentes. VRN-PRC2 está implicado en el proceso de vernalización donde regula a *FLC* durante la transición a la floración (Bemer y Grossniklaus, 2012), mientras que el reclutamiento del complejo FIS-PRC2 se da durante el desarrollo del gametofito y del endospermo. Por último, se ha descrito que EMF2-PRC2 es el mediador de la transición del embrión al estado vegetativo, donde esta

variante de PRC2 está implicada en el silenciamiento de genes específicos asociados a la maduración de la semilla (Xiao y Wagner, 2015).

1.5.2 Complejo represor de Polycomb 1 (PRC1)

El sub complejo PRC1 está encargado de reconocer la H3K27me3 y además de catalizar la ubiquitinación en la histona H2A. En animales está conformado por dos proteínas ubiquitintransferasas, REALLY INTERESTING NEW GENE (RING1 A y B), seis variantes de PGC GF 1-6, que ayudan a la regulación de PRC1, entre los cuales están PGC GF2 (MEL18) y PGC GF4 (BMI), y Chromobox family (CBX) que reconoce la H3K27me3. Al igual que PRC2, PRC1 en animales tiene variaciones, donde la combinación de diferentes proteínas modifica la forma en que este subcomplejo funciona (Blackledge et al., 2014). Por otra parte, PRC1 en plantas está menos caracterizado, se propone que puede estar compuesto por ubiquitintransferasas homólogas a RING, AtRING1 A y B, además de tres homólogos al grupo PGC GF, que en plantas también tienen función de ubiquitintransferasas, B CELL-SPECIFIC MOLONEY MURINE LEUKEMIA VIRUS INTEGRATION SITE1 A, B y C (AtBMI A, B y C). Aunque no se han descrito homólogos de CBX, la función de este último se le atribuye a una proteína con estructura completamente diferente, LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1). El hecho de que LHP1 pueda unirse a PRC2, sugiere que esta proteína actúa fuera de PRC1 y funciona más como el puente entre ambos sub-complejos. Sin embargo, LHP1 no es el único puente hasta ahora descrito, EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1) también es capaz de unirse a PRC2 para reclutarlo (Calonje et al., 2008).

Se ha descrito que el complejo canónico de PRC1 está formado por las ubiquitintransferasas AtRING1 a y B y AtBMI1 A, B y C. En animales se determinó que las proteínas RING tienen baja actividad de ubiquitintransferasa y requiere de proteínas del grupo PGC GF para funcionar correctamente. Sin embargo, en plantas no se ha descrito si las proteínas AtRING1 y AtBMI1 forman algún complejo *in vivo* (Merini y Calonje, 2015). Por otra parte, en Arabidopsis se ha descrito la interacción *in vitro* entre AtBMI1 A y B y LHP1, EMF1 y las AtRING1, lo que indica un mecanismo similar a lo que se ha encontrado en animales. Además, LHP1, uno de los primeros componentes de PRC1 descritos, es capaz de interactuar con PRC2 a través de MS1 y EMF2, lo que sugiere su capacidad de reclutar a PRC1 a los genes blanco de PcG a través de PRC2 (Derkacheva et al., 2013).

1.6 Los mecanismos de acción de PcG

En un principio, el mecanismo de regulación de PcG descrito en *Drosophila* fue adoptado por los grupos de investigación de plantas y animales. Así se asumió que PRC2 colocaba la marca de H3K27me3, la cual posteriormente era reconocida por Pc del complejo PRC1 y así se promovía la deposición de la ubiquitinación (figura 4A). Sin embargo, recientemente se ha descrito en *Drosophila* que PRC1 no siempre está formado por los cuatro elementos base, lo que implica que algunos genes blanco solo requieren de ciertos componentes de PRC1 para ser regulados. Por otra parte, en mamíferos se han descrito hasta 5 variantes del sub complejo PRC1, que surgen a partir de la interacción de RING2 (RING1B-RNF2) con diversos remodeladores, desmetilasas de histonas o HDAC's (Simon y Kingston, 2009). Sin embargo, en plantas hasta ahora no está descrita ninguna variante de PRC1 como tal. Al igual que en PRC1, PRC2 tiene dos variantes descritas en animales y tres en plantas, en este caso, la diferencia entre los complejos se da por el intercambio de algún componente. Este cambio en los componentes de los PRC2 y PRC1 sugiere que los diferentes procesos del desarrollo están siendo regulados por diferentes grupos proteicos, a través de mecanismos diferentes al canónico (Schwartz y Pirrotta, 2013).

Existen reportes que indican que en plantas existen diferentes mecanismos de acción de PcG que contrastan con el típico mecanismo reportado. Por una parte se ha reportado que las ubiquitintransferasas AtBMI de PRC1, son capaces de depositar la marca de H2AK121Ub aun en ausencia de la H3K27me3 e incluso se ha reportado que, en algunos casos, se requiere de la marca de ubiquitinación para que se deposite la H3K27me3 (Zhou et al., 2017). Además, existen reportes que indican que se requiere LHP1 para una adecuada deposición de la marca de H3K27me3, pero que es dispensable para deposición de la marca de H2A121ub, mostrando que LHP1 no es necesario para que se lleve a cabo la ubiquitinación (Zhou et al., 2017). Lo anterior sugiere que en plantas PcG actúa en otras tres formas diferentes a la descrita inicialmente para *Drosophila*: 1) PRC1 puede ser el primer sub complejo reclutado, siendo que la ubiquitinación es importante para promover la deposición de la H3K27me3 (figura 4B); 2) la represión puede medirse solo por PRC1, por lo que la marca de ubiquitinación sería la responsable de ésta (figura 4C); y 3) la regulación está asociada únicamente con PRC2 por medio de la deposición de la H3K27me3 (figura 4D).

Se ha descrito que PRC2 actúa de manera canónica en la regulación de *FLC*, donde es el primero en reconocer el gen y recluta a su vez otras proteínas para generar represión. Entre estas se encuentra LHP1, que junto con un par de RNA no codificantes, COOLAIR

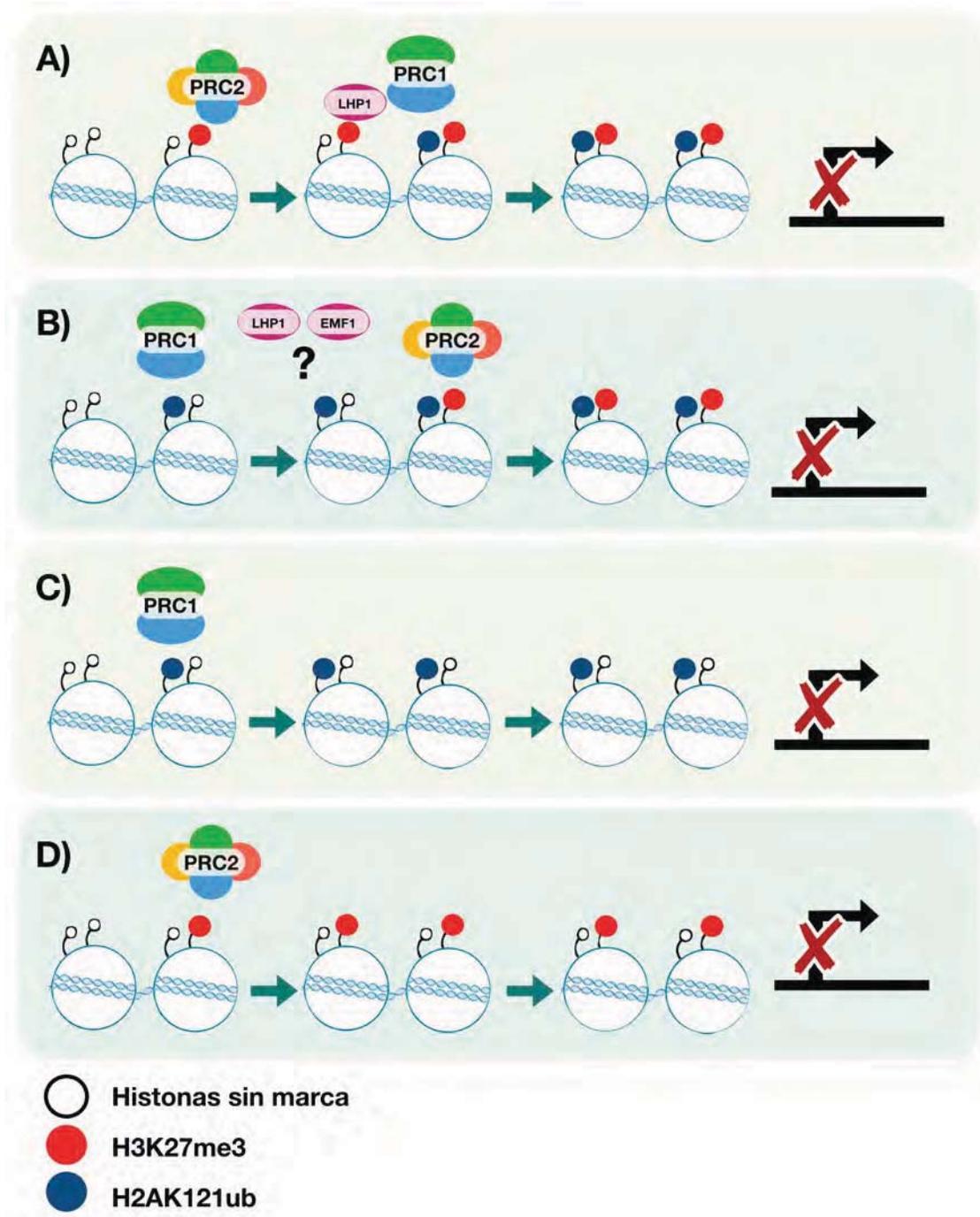


figura 4. Mecanismos de PcG en plantas. A) Mecanismo canónico, donde PRC2 coloca la marca de H3K27me3, la cual es reconocida posteriormente por PRC1 a través de LHP1. B) Mecanismo inverso al canónico, donde el gen blanco es reconocido por PRC1, el cual coloca la marca de H2AK121ub y posteriormente recluta a PRC2. C) Represión mediada únicamente por PRC1. D) Represión mediada sólo por la acción de PRC2. Adaptado de Schwartz y Pirrotta, 2013; Zhou et al., 2017.

y COLDAIR, promueve la represión estable de *FLC* durante la vernalización (Bemer y Grossniklaus 2012).

Los diversos mecanismos de PcG posiblemente están asociados a diferentes procesos del desarrollo, generando una regulación más exacta al asociar proteínas o subcomplejos específicos a cierto conjunto de genes. De esta manera, es interesante estudiar a las proteínas de PcG tanto en células en proliferación, como en aquellas que ya se encuentran diferenciadas, ya que estas transiciones posiblemente implican combinaciones particulares de complejos y mecanismos.

1.7 LHP1 y su función en la regulación epigenética

A pesar de que LHP1 presenta convergencia funcional con CBX, es homólogo de la proteína de animales HETERO Cromatin Protein 1 (HP1), la cual es capaz de regular a los genes a través del reconocimiento de la marca de H3K9me3, marca de heterocromatina que está asociada más a regiones teloméricas y centroméricas (Exner et al., 2009; Zeng et al., 2010), mientras que en plantas la marca asociada a estas regiones es la H3K9me2 (Fransz y de Jong, 2011), siendo una diferencia entre estos organismos que puede explicar la función diferencial entre LHP1 y HP.

Estructuralmente tanto HP1 como LHP1 están formadas por dos dominios: un cromodominio que reconoce la metilación y un cromosombra, dominio que en animales es capaz de unirse a un gran número de proteínas. Aunque ensayos *in vitro* muestran que LHP1 puede unirse tanto a la H3K9me3 como a la H3K27me3, *in vivo* únicamente se ha visto colocalizada con la marca de H3K27me3 (Zemach et al., 2006; X. Zhang et al., 2007).

La asociación de LHP1 con PcG se debe no solo a su capacidad de reconocer la H3K27me3, sino también porque los primeros estudios de LHP1 indican una asociación con las ubiquitintransferasas AtRING (Xu y Shen, 2008). Recientemente, se ha descrito que LHP1 también se une a PRC2 a través de la interacción con MSI1 (Derkacheva et al., 2013). Otra evidencia que muestra la asociación de LHP1 a PcG es su capacidad de reclutar a los factores de transcripción ASYMETRIC LEAF 1 y 2 (AS 1 y 2) que a su vez se unen al complejo EMF-PRC2 y lo reclutan en los promotores de los genes *KNOX*, *BP* y *KNAT2* (Lodha et al., 2013).

Aunque LHP1 está relacionado a PcG, se ha descrito que no es necesario en muchos casos para que PRC1 catalice la H2A121ub o para la interacción entre PRC1 y PRC2 (Zhou et al., 2017). Es posible que, al igual que HP1, LHP1 esté involucrado en la regulación de varios

procesos por la capacidad de su dominio cromosombrado de reconocer y unirse a diversos grupos de proteínas. Se ha visto que posiblemente LHP1 tiene la función indirecta de activación en los genes *YUCCA*, afectando la vía de síntesis de auxinas (Rizzardi et al., 2011). Por otra parte, también se ha propuesto el papel de LHP1 como modulador de la estructura global de la cromatina ha sido propuesto, pero este aspecto ha sido poco estudiado. En las mutantes de pérdida de función existen alteraciones en el arreglo de la cromatina, lo que propone una regulación más global de las interacciones génicas. Siendo así que LHP1 puede estar también implicado en la regulación de genes a través de la modulación de la topología de la cromatina (Veluchamy et al., 2016).

Gran parte de los estudios que involucran a LHP1 se han realizado en la parte aérea de *Arabidopsis*, pero poco se sabe sobre el desarrollo de la raíz. Las mutantes de pérdida de función de este gen tienen un claro fenotipo aéreo, con afectaciones en el desarrollo de hojas, flores terminales y defectos en las silicuas y semillas, además de presentar floración temprana. En el desarrollo de la raíz, inicialmente se describió que estas mutantes no tienen fenotipo al compararlo con el tipo silvestre (Gaudin et al., 2001). Sin embargo, otros estudios han reportado que LHP1 es necesario en la raíz para evitar divisiones ectópicas en las células de la endodermis, a través de su interacción con el factor transcripcional SCARECROW (SCR) (Cui y Benfey, 2009), el cual está involucrado en promover la primera división de la célula inicial de córtex/endodermis (Sabatini et al., 2003). Estos datos muestran que LHP1 puede estar regulando el desarrollo de la raíz, por lo que es necesario un estudio más extenso de esta proteína para definir su función en este órgano.

1.8 La raíz de *Arabidopsis* como modelo para estudiar a LHP1 en el desarrollo

Todos los resultados descritos generan nuevos cuestionamientos sobre los mecanismos de regulación de PcG y si estos están asociados a diferentes procesos del desarrollo. La raíz de *Arabidopsis* representa un buen modelo para el estudio de la proliferación y diferenciación, ya que este órgano está compuesto de diferentes tipos celulares que a su vez se encuentran en diferentes estadios del desarrollo. La raíz se compone de un nicho de células troncales (SCN), conformado por el centro quiescente (QC) y las células iniciales que dan origen a los tejidos de la raíz. En la parte central se encuentra el estele, el cual contiene a los haces vasculares y está rodeado por la endodermis, el córtex y la epidermis. Hacia la región apical está la columela y la capa lateral (figura 5A).

La raíz se divide en tres zonas; la zona meristemática (ZM), que incluye al nicho de células troncales y abarca los dominios de alta proliferación y transición a la elongación, donde las células se encuentran en constante división mitótica y es la zona denominada como meristemo apical de la raíz (RAM). La zona de elongación, donde las células dejan de dividirse para comenzar a aumentar de tamaño, y la zona de diferenciación, en la cual las células dejan de elongar para llegar a un estadio final diferenciado (figura 5B) (Cederholm et al., 2012; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

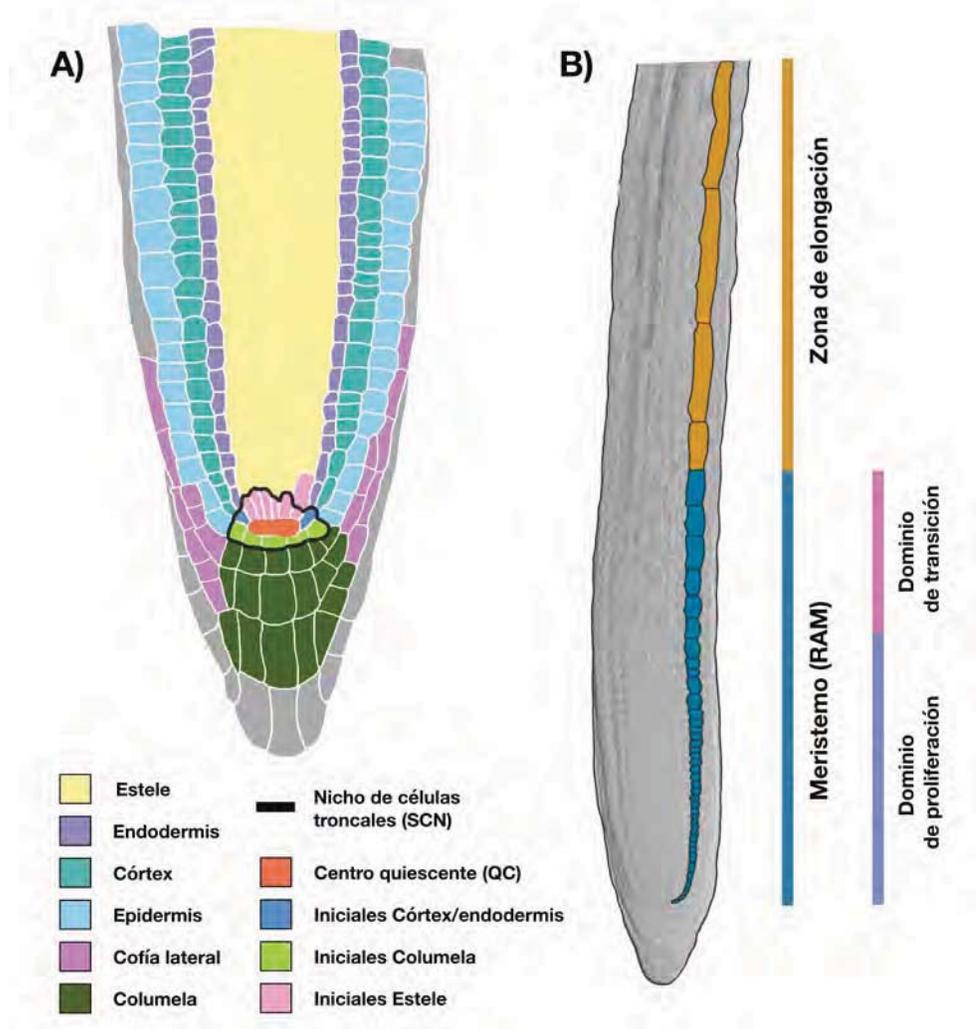


figura 5. Anatomía de la raíz de *Arabidopsis*. A) Sección del RAM donde se muestran los diferentes tejidos de la raíz remarcados en colores distintos. B) Esquema que muestra las diferentes zonas que componen a la raíz. Adaptado de Ivanov y Dubrovsky, 2013.

Aunque poco estudiado, se ha demostrado que PcG está implicado en la regulación del meristemo de la raíz. Por una parte se ha visto que las mutantes de pérdida de función de CLF presentan desregulación en la proliferación y mantenimiento del SCN, provocando

que el meristemo sea ligeramente más largo y que se encuentren mayor número de capas de células iniciales de la columela (Vega-León, 2016; Takatsuka y Umeda, 2015). Además, se ha encontrado que AtBMI1 A, B y C también pueden tener un papel en el SCN y la proliferación celular a través de la regulación de genes maestros, ya que las mutantes muestran alteraciones en la capacidad proliferativa de varios órganos, entre ellos la raíz (Merini et al., 2017).

Aunado a esto, como ya se describió anteriormente, LHP1 puede tener un papel importante en la modulación de las divisiones de la endodermis (Cui y Benfey, 2009). Estudios previos en el laboratorio muestran que las mutantes de *LHP1* tienen raíces más cortas con respecto al tipo silvestre, lo cual apunta a que la función de LHP1 va más allá de sólo modular las divisiones de los tejidos de la raíz (Sánchez, datos no publicados).

Dilucidar cómo funcionan los mecanismos de represión generados por PcG en los procesos del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* requiere de estudiar a fondo cada uno de los componentes de este complejo, y LHP1, el cual ha sido poco estudiado tanto en la parte aérea, y menos aún se ha revisado su función en el desarrollo de la raíz. LHP1 es un buen candidato para ir construyendo la función de PcG en el desarrollo de la raíz., por lo que en este trabajo se estudiará la función de LHP1 en la raíz a través del análisis morfológico de dos mutantes de pérdida de función de *LHP1*.

Hipótesis

LHP1 un componente del complejo represor PcG, participa en la regulación del mantenimiento y la morfología del meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la función de LHP1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.

Objetivos Particulares

- Estudiar la expresión de *LHP1* en la raíz de *Arabidopsis*.
- Caracterizar el fenotipo de la raíz de plantas mutantes de pérdida de función de *LHP1*.
- Generar plantas mutantes de pérdida de función de LHP1 complementadas con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP* y estudiar su complementación por medio de la observación de fenotipo aéreo.
- Generar herramientas moleculares para el estudio de los complejos epigenéticos PcG y TrxG.

Materiales y Métodos

2.1 Material biológico

Las plantas usadas en este trabajo son de la especie *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0). Las mutantes usadas de *LHP1* son *lhp1-6* (SALK_011762), una mutante de inserción de tDNA y *tfl2-2* (CS3797), una mutante de delección en la que se eliminó el gen correspondiente y fragmentos de genes aledaños (Ver anexo: figura A1).

2.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas se desinfectaron lavándolas en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex al 3 %) al 20 % y polisorbato 20 (Tween 20, Sigma Aldrich) al 0.01 %, se mantuvieron en agitación durante 15 min. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada estéril 5 veces. Se estratificaron en oscuridad a 4°C por 72 h, para sincronizar la germinación.

Después de la estratificación las semillas se sembraron en cajas petri cuadradas conteniendo medio Murashige y Skoog (MS) comercial al 0.2X (Murashige y Skoog 1962, MP Biomedicals), MES monohidratado al 0.05 % (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1 % (Sigma-Aldrich) y agar al 1 % (Becton, Dickinson & Company), pH de 5.6, ajustado con KOH 1M. Las placas se mantuvieron a 22°C en condiciones de día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad), con luz blanca, fría e intensidad aproximada de 110 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las plantas para transformación se sembraron en tierra estéril después de ser estratificadas en agua normal por 72 h y se sembraron 8 semillas por maceta. Las líneas obtenidas que contienen la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*, fueron sembradas directamente en tierra estéril después de 72 horas de estratificación o transferidas a partir de placas después de los 5dps. Para los experimentos de cinética y caracterización del fenotipo, las plantas sembradas en placa se transfirieron a tierra estéril después de los 13 y 5 dps, respectivamente.

2.3 Generación de plantas *pLHP1:LHP1:GFP* para el estudio de la expresión de *LHP1*

Se utilizó una construcción obtenida anteriormente en el laboratorio en el vector pGWB4 de sistema Gateway (Sánchez, datos no publicados) que contiene al gen *LHP1* (2,031 pb) completo con su promotor, considerando 1044 pb río arriba del gen *LHP1*, fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (*pLHP1:LHP1:GFP*). La construcción obtenida fue secuenciada y aunque el análisis mostró que la construcción tiene una mutación que se encuentra en la región promotora, se usó para los experimentos posteriores.

2.3.1 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y comprobación de las clonas obtenidas

Se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* C58 quimiocompetentes (Wise et al., 2006) con 100 ng del vector pGWB4 con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*. Las células se crecieron a 28°C con kanamicina (Km) a 50 µg/ml y rifampicina (Rif) 100 µg/ml, algunas de las colonias obtenidas se crecieron en medio LB líquido a 30°C con los mismos antibióticos manteniendo las concentraciones. Para verificar la transformación, se realizó una extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina, adicionando 1 µl de lisozima 20 mg/ml. Posteriormente, se comprobaron las muestras por PCR de punto final usando los oligonucleótidos JFS-LHP1secF3 y MP-GW-GFP (Ver anexo: tabla A1) y una clona seleccionada se mandó a secuenciar por el método Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

2.3.2 Transformación de *Arabidopsis* con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*

Se transformaron plantas tipo silvestre Col-0 (Wt), y las plantas mutantes *lhp1-6* y *tfl2-2* (anteriormente descritas) con la construcción también descrita (*pLHP1:LHP1:GFP*). Las semillas obtenidas fueron crecidas en medio MS con km a 40 µg/ml para seleccionar a las plantas que presentaran el transgen. Se obtuvieron 4 líneas resistentes a km con una sola inserción de Col-0 (Wt), 2 líneas resistentes a km con una sola inserción para *lhp1-6*, mientras que para *tfl2-2* sólo se obtuvo una línea. Por medio de autopolinizaciones, se llegó a la generación T3 con la finalidad de obtener individuos homocigotos. Una vez que se obtuvieron líneas 100 % homocigotas resistentes a km, se observaron con microscopía fluorescente para determinar la presencia de GFP.

2.3.3 Genotipado de las plantas transformadas

Para genotipar la mutante *lhp1-6* se amplificó una región del DNA genómico que incluye una parte de la inserción del tDNA y una parte del gen, las muestras que presentaron el fragmento esperado fueron consideradas como positivas. También se corroboró la presencia del transgen amplificando parte del gen *LHP1* y de la fusión a GFP. En el caso de las plantas Col-0, únicamente se comprobó la presencia del transgen, usando el mismo método anteriormente descrito. Todas las plantas fueron probadas por PCR de punto final usando los oligonucleótidos descritos en la tabla A1.

Para las pruebas de PCR se purificó de DNA genómico a partir de hoja de 5 individuos por línea. La metodología usada para la extracción de DNA genómico consistió en macerar la hoja en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se resuspendió en 500 μ l de amortiguador de extracción (100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de EDTA, 500 μ M de NaCl, 1 % de SDS y 0.07 % de β -mercaptoetanol). Seguido se incubaron las muestras durante 10 min a 65°C, finalizado este lapso se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 5M, y se incubaron las muestras en hielo por 5 min. Posteriormente, las muestras se retiraron del hielo y se adicionaron 300 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, se agitaron por inversión y se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min. y se recuperó la fase acuosa. El DNA se precipitó agregando 2 volúmenes de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M e incubando a -20°C O/N. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 15 min para obtener el botón de DNA, el cual se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 30 μ l H₂O miliQ. La cuantificación del DNA se hizo determinando su A_{260} en un Nanodrop 2000 Thermo Scientific.

2.4 Análisis morfológicos de la raíz

2.4.1 Cinéticas de crecimiento

El crecimiento de las raíces de Col-0 (Wt), *lhp1-6* y *tfl2-2* fue monitoreado durante 12 dps. Se registró la longitud de la raíz cada 24 h con una marca sobre la caja de Petri donde se observó el meristemo. Finalmente, se escanearon las placas y se midió la distancia entre cada marca con el procesador de imágenes Fiji, siguiendo el eje principal de crecimiento.

2.4.2 Análisis microscópico para el estudio morfológico del meristemo radicular

La observación de raíces al microscopio se realizó con un tratamiento previo usando una solución de hidrato de cloral al 80 % y glicerol al 10 %. Las raíces observadas fueron de 5 dps y se observaron bajo óptica Normarski en un microscopio Olympus BX60, a un aumento de 40X. El tamaño del meristemo se determinó mediante el algoritmo de Pacheco (Pacheco-Escobedo et al., 2016). Para ello se midió cada célula desde la inicial de córtex hasta una célula antes del primer pelo, usando estos datos para establecer los límites de cada zona.

Para determinar la expresión de GFP en las plantas silvestres y mutantes complementadas, se tomaron plantas de 5 dps y se observaron bajo el microscopio confocal (Olympus FV1000) de la Facultad de Química. Para ello se colocaron las raíces en un portaobjetos con 40 μ l de yoduro de propidio (ID) a 5 μ g/ml para delimitar las células como contraste y se observaron a 535 nm para el ID y 509 nm para GFP.

2.5 Generación de herramientas para el estudio de los complejos PcG y TrxG

2.5.1 Clonación y recombinación de *ATX1*

- Amplificación del gen

Se tomó una muestra de cDNA de *Arabidopsis* ecotipo Col-0, y se amplificó la región correspondiente a *ATX1* (Ver anexo: tabla A2) con una DNA polimerasa de alta fidelidad (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity).

- Purificación del producto de PCR

Se transfirió el producto de PCR a un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se le adicionaron 450 μ l de H₂O miliQ y 500 μ l de fenol/cloroformo en una proporción 1:1, posteriormente la muestra se centrifugó a 11,000 rpm por 15 min y se recuperó la fase acuosa. El paso anterior se repite una vez más. Por último, se dejó precipitando con 2 vol. de etanol al 100 % y 0.2 vol. acetato de amonio durante toda la noche. Después de la precipitación, se

recuperó el pellet, el cual es lavado dos veces con etanol al 70 % y se resuspendió en 30 μ l de H₂O miliQ. La muestra se cuantificó en un Nanodrop 2000 Thermo Scientific.

- Clonación del producto de amplificación purificado

Una vez que se purificó el fragmento producto de la amplificación por PCR, se clonó en el vector pCR™ 8/GW/TOPO™ del sistema Gateway. Para ello primero se realizó una reacción de Poli A para adicionar adeninas en los extremos romos del fragmento. Posteriormente un volumen equivalente a 46.1 ng del fragmento se mezcló con 10 ng del vector y se dejó incubando la reacción a 22°C O/N. Se transformaron células de *E. coli* DH5 α con 3 μ l de la reacción de clonación, y se crecieron en un medio LB con espectinomicina (Spect) a 100 μ g/ml, se dejaron incubando O/N.

Se tomaron las colonias resistentes a Spect, las cuales fueron transferidas a medio LB líquido con el antibiótico a 100 μ g/ml e incubadas O/N a 37°C. De estas colonias se extrajo el DNA plasmídico por Kit (ZR Plasmid Miniprep - Classic) y se corroboró la presencia del gen por medio de PCR de punto final, para lo cual se amplificó una región pequeña del gen (Ver anexo: tabla A2), así como por reacciones de digestión enzimática con enzima Xba1 (invitrogene).

- Secuenciación

A partir de las pruebas de PCR de punto final y digestión enzimática, se seleccionó una clona que se mandó a secuenciar completa. El método de secuenciación usado fue Sanger, para lo cual se hizo uso del servicio de secuenciación de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM

- Recombinación

La clona seleccionada se recombinó con el vector de destino PGWB5, el cual contiene el promotor CamV35S y la proteína fluorescente GFP. Para este procedimiento en un tubo eppendorf de 1.5 ml se adicionaron 80 ng de DNA Clona B1, 237 ng del vector de destino (PGWB5) y 1 μ l de la enzima LR clonasa. La reacción se dejó incubando O/N a 22°C. Posteriormente, se detuvo la reacción con proteinasa K y se transformaron células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes con 5 μ l de la misma reacción de recombinación. Se plaquearon en medio LB con km 50 μ g/ml y se incubaron a 37°C por 12 – 16 h. Cabe mencionar que previo a la reacción de recombinación, se verificó la integridad del vector pGWB5 por medio de una reacción de digestión con la enzima PstI (invitrogen).

Se obtuvieron varias colonias, las cuales fueron transferidas a medio LB líquido con Km 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, para posteriormente purificar DNA plasmídico con Kit (ZR Plasmid Miniprep - Classic) y comprobar la presencia del vector *35S:ATX1:GFP* por PCR de punto final. Una clona positiva fue secuenciada. El método de secuenciación usado fue el mismo descrito anteriormente.

2.5.2 Recombinación de *CLF*

La metodología usada fue similar a la del fragmento de *ATX1*. Se utilizaron 100 ng de *pCLF:CLF* (Clona2B) y 200 ng del vector de destino, pGWB4 el cual no contiene promotor y contiene la secuencia de GFP de tal manera que quedaría fusionada hacia el extremo 3' del gen de interés. El vector pGWB4 fue probado previamente por medio de digestión enzimática con la enzima Pst1 (Invitrogen) para determinar su integridad. La reacción de recombinación se dejó incubando O/N a 22°C. Posteriormente, se detuvo la reacción con proteinasa K y se procedió a transformar células *E. coli* DH5 α con 2.5 μl de la reacción de recombinación. Se plaquearon en medio LB con Km 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se crecieron a 37°C O/N.

Las colonias obtenidas fueron transferidas a medio LB líquido con Km 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se crecieron O/N a 37°C. A partir de este cultivo se realizó una extracción de DNA plasmídico con Kit (ZR Plasmid Miniprep - Classic) y se realizaron pruebas de PCR de punto final para comprobar la presencia del vector *pCLF:CLF:GFP* (Ver anexo: tabla A2). Una clona positiva fue secuenciada. El método de secuenciación usado fue el mismo descrito anteriormente.

Para conocer más sobre la función de algunos de los componentes de PcG y TrxG en la regulación de la diferenciación y proliferación en la raíz de *Arabidopsis*, en esta tesis se analizaron las posibles funciones que tiene LHP1 en el meristemo de dicho órgano. Se eligió estudiar a LHP1 por ser componente de PcG y por lo poco que hasta ahora se conoce sobre su función en la raíz. Por otra parte, también se generaron herramientas que permitirán continuar con el estudio de otros componentes de PcG y de TrxG, específicamente para estudiar a CLF y ATX1. Dado que ambos acercamientos implicaron ensayos experimentales diferentes, se dividió en dos partes para una mejor comprensión de los resultados. La primera parte incluye los objetivos 1-3, asociados al estudio de LHP1, y en la segunda se aborda únicamente el cuarto objetivo, que implicó la generación de herramientas para el estudio de *ATX1* y *CLF*.

Parte I

Estudio de la función de LHP1 en la raíz de Arabidopsis.

3.1 Análisis *in silico* de la expresión de *LHP1* en raíz

Antes de iniciar el estudio de *LHP1* en la raíz, se realizó una búsqueda *in silico*, que implicó un análisis de bases de datos disponibles, para determinar la expresión del gen *LHP1* en los diferentes tejidos de *Arabidopsis* y su coexpresión con otras proteínas del complejo PcG. Para ello se usó la base de datos generada a partir de muestra de protoplasto de diferentes secciones de la raíz (Birnbaum et al., 2016). Al comparar la expresión total en la raíz (figura 6A), se observa que *LHP1* tiene una expresión similar o, incluso mayor, que los componentes de PRC1, y en realidad su expresión se asemeja a *CLF* y *SWN*, que son parte de PRC2. Por otra parte, cuando se observa la expresión en cada uno de los tejidos que conforman la raíz, *LHP1* parece expresarse mayormente en el estele, córtex/endodermis y la cofia lateral, contrario a *CLF* y *SWN* que además tienen alta expresión en la epidermis (figura 6B). Al analizar solo a *LHP1* se observó que su expresión es mayor en la zona de alta proliferación, comparada con la zona de elongación y en córtex/endodermis. Esta tendencia se mantiene en todos los tejidos de la raíz (figura 6D y datos no mostrados). El patrón de expresión de *LHP1* en la raíz aporta información sobre su posible función en este órgano, sobre todo en el meristemo, ya que es la región de mayor proliferación celular y donde *LHP1* tiene una mayor expresión. Para comprobar esta posible función se realizaron análisis fenotípicos de plantas mutantes de pérdida de función en *LHP1*.

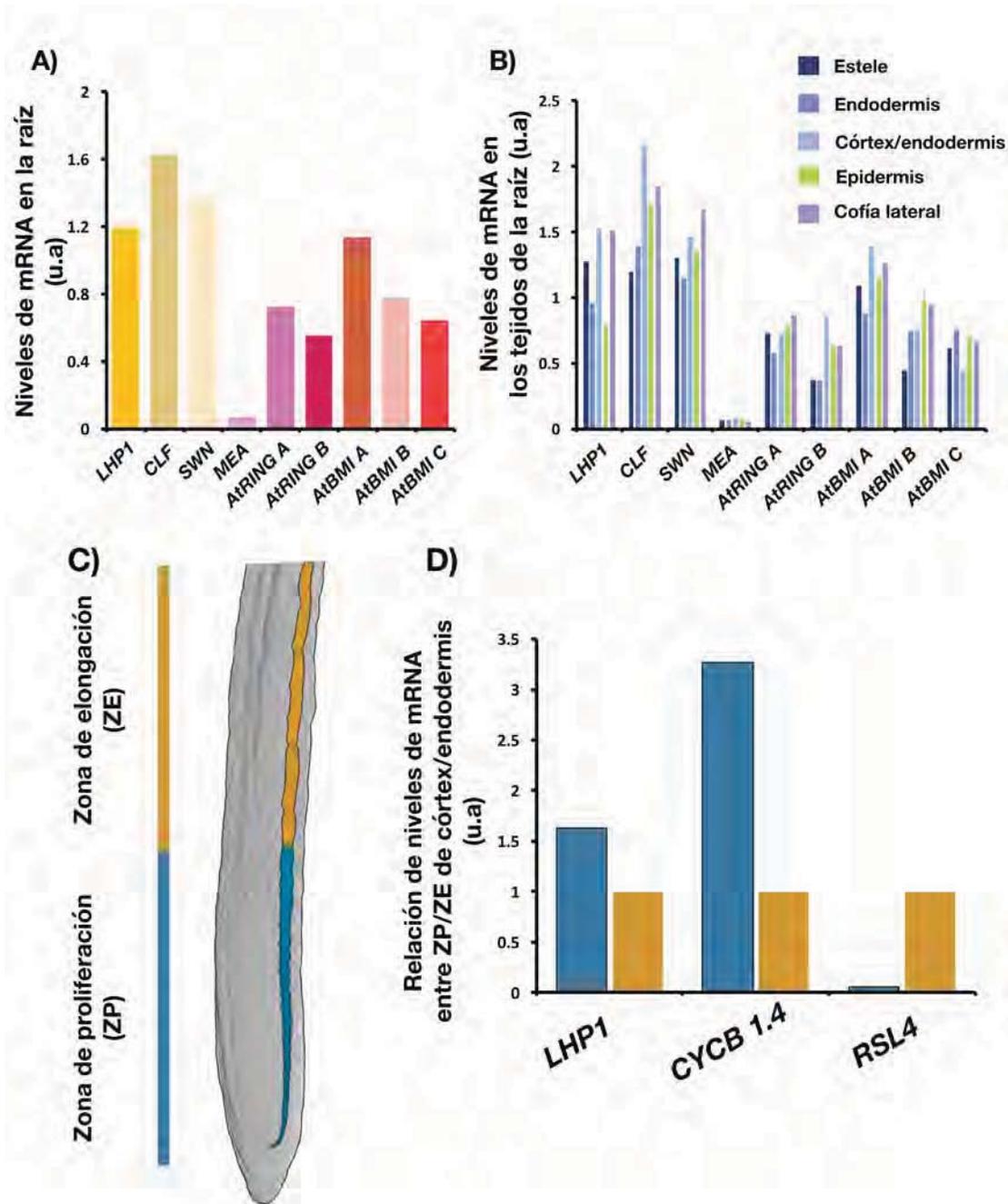


figura 6. Análisis de la expresión *in silico* del gen *LHP1* en *Arabidopsis*, comparado con otros miembros de PRC1 y PRC2. A) Coexpresión de algunos componentes de PcG en la raíz. B) Coexpresión de algunos componentes de PcG en los diferentes tejidos que componen la raíz. C) Esquema de la raíz que muestra las zonas de proliferación (ZP) y elongación (ZE). D) Expresión de *LHP1*, relación entre la ZP y ZE solo en córtex/ endodermis.

3.2 Fenotipo en raíces de las plantas mutantes de pérdida de función de *LHP1*

Para estudiar la función de *LHP1* en la raíz, se usaron dos mutantes de pérdida de función en *LHP1*: *lhp1-6*, donde el gen *LHP1* está interrumpido por un fragmento de tDNA y *tfl2-2*, en la cual se tiene una delección de un fragmento que incluye a *LHP1* y secciones de los genes aledaños (figura A1). Para analizar el fenotipo de la raíz que tienen estas mutantes se evaluaron los siguientes parámetros: i) longitud total de la raíz y su tasa de crecimiento, ii) longitud del meristemo radicular (RAM), iii) defectos en la morfología del RAM y del nicho de células troncales (SCN; por sus siglas en inglés). Los análisis de longitud de la raíz indicaron que las mutantes de *LHP1* tienden a presentar un desarrollo más lento comparado con las plantas silvestres (Wt), este fenotipo es más evidente pasados los 5dps, dando como resultado una longitud total menor (figura 7A y B). Aunque este fenotipo no es muy consistente, ya que se observó una alta variación entre los individuos (figura 7C), al hacer análisis de frecuencias, se observó que mientras que las plantas Wt se agrupan mayormente en la frecuencia D (9-10 cm), las dos mutantes de *LHP1* se encuentran en la frecuencia A (6-7 cm) para la *lhp1-6* y C (8-9 cm) para *tfl2-2* (figura 7D). La alta variabilidad observada en ambas mutantes sugiere que estas plantas no reaccionan igual a las pequeñas variaciones que pueden existir mientras están creciendo, siendo muy plásticas en su respuesta.

La longitud total de la raíz depende de la tasa de proliferación del RAM, del número de células proliferativas que se diferencian y del tamaño de las células elongadas (Ivanov y Dubrovsky, 2013), por lo que para conocer el proceso responsable que está generando una menor longitud de la raíz de las plantas mutantes, primero se evaluó la longitud del RAM medido a través del número de células que lo componen. Los resultados muestran que las mutantes de *LHP1* no tienen diferencias significativas en cuanto al número de células del meristemo (figura 8C y D), aunque parece haber una tendencia de reducción en el número total de células que forman la zona de transición (figura 8B). Por otra parte, al igual que en la longitud total de la raíz, se observó variabilidad en el número total de células del meristemo.

Al observar que el número de células en el meristemo no parece ser el factor responsable en la disminución de la longitud total de raíz, se decidió evaluar la longitud de las células del meristemo. Para ello se realizaron 15 categorías que agrupan los tamaños celulares y se realizó un análisis de frecuencias (figura 8E). Este análisis mostró que las mutantes presentan diferencias en la distribución del tamaño celular, donde *lhp1-6* se distinguió por tener dos picos claros, mismos que indican que en el dominio de proliferación contiene

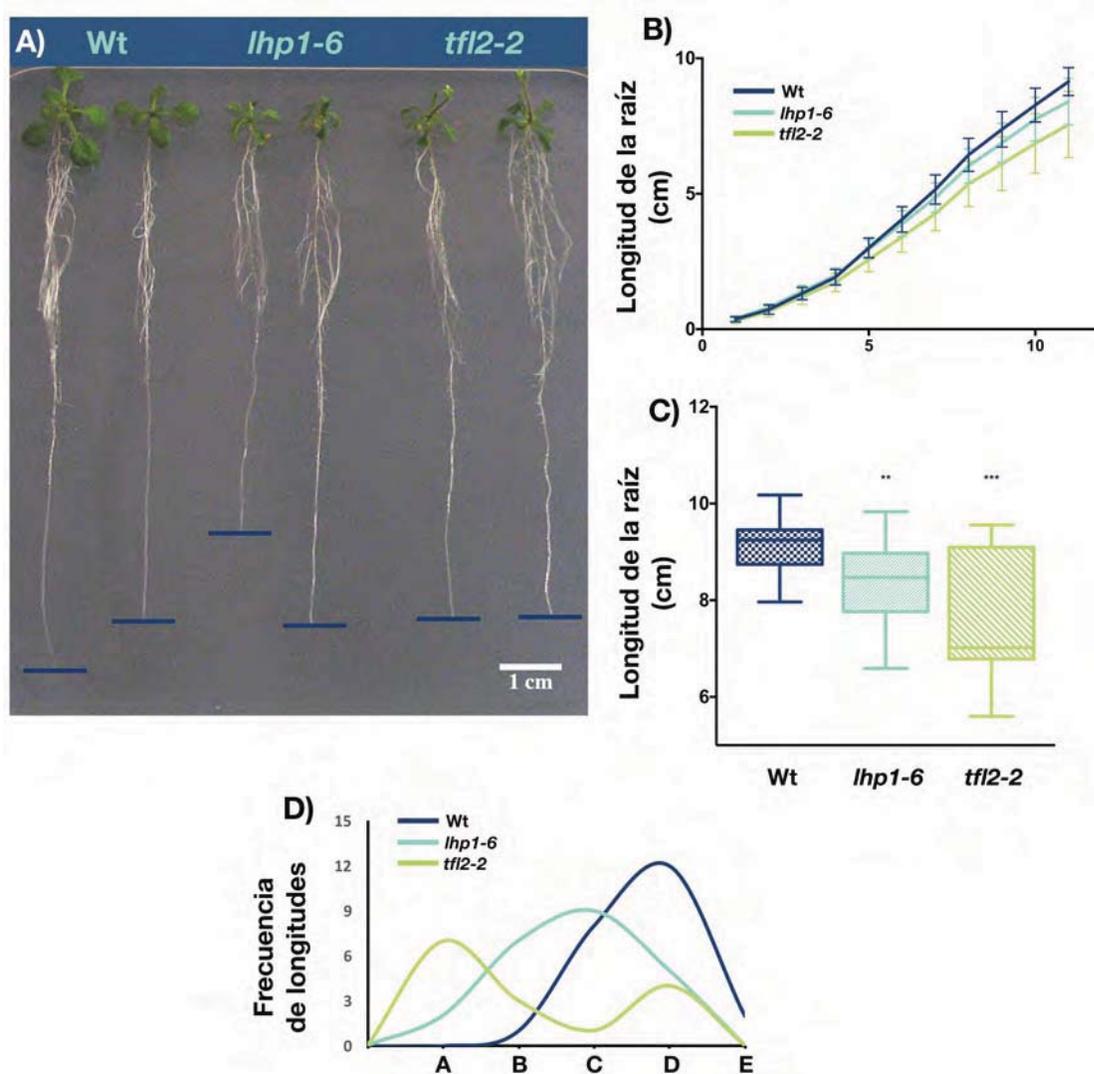


figura 7. Longitud total de la raíz. A) comparación de las raíces Wt vs mutantes de *LHP1*. B) tasa de crecimiento de las raíces Wt y de las mutantes de *lhp1-6* y *tf12-2*, mediciones de cada 24 hrs. hasta los 12 dps. C) Comparación de las medianas de los tres genotipos. D) Distribución de las frecuencias de longitud de raíz de plantas Wt y mutantes, las letras representan cada una de las categorías establecidas A=6-7, B=7-8, C=8-9, D=9-10 y E=10-11 cm. Significancia determinada con una prueba U de Mann-Whitney comparando Wt vs alguna de las mutantes, $p=0.0021$ (**) y $p=0.0002$ (***). Plantas de 12 dps, $n=30$.

poblaciones celulares de entre 8 a 10 μm y el otro de entre 11 a 12 μm , comparado con el tipo silvestre que se agrupa en un solo pico de alrededor de 10 a 11 μm . En *lhp1-6*, no solo hubo alta variación en el tamaño celular del dominio de proliferación, sino que también se observaron variaciones en el tamaño hacia el final del meristemo, como se muestra en la figura 8E en donde las oscilaciones, aunque presentes en Wt son claramente menos pronunciadas que en *lhp1-6*.

Por otra parte, en *tfl2-2* se observó un comportamiento similar al de *lhp1-6* aunque la diferencia en tamaños celulares fue menor que en *lhp1-6*, en este caso parece tener una distribución más uniforme, de igual manera presentó menos oscilaciones posteriores al dominio proliferación. A pesar de no tener la misma diferencia que tiene *lhp1-6* con respecto a Wt, tiene una mayor cantidad de células en categorías de menor tamaño (8 a 10 μm). Todo lo anterior indica que en las plantas mutantes de *LHP1* las células del meristemo, sobre todo las del dominio de transición, presentaron problemas para regular el tamaño celular con respecto al tiempo en el que se deben de dividir, resultando estas variaciones en tamaños.

El último parámetro que se evaluó para estudiar el fenotipo de la raíz de las mutantes de *LHP1*, fue observar los defectos que pudiera haber en la morfología del RAM y SCN. Se observó principalmente que hay dos afectaciones importantes en el meristemo, por un lado, se registraron divisiones ectópicas en la endodermis, resultado que concuerda con lo previamente reportado (Cui y Benfey, 2009). Por otro lado, se observó desorganización en el SCN. En primer lugar, se estudió más detenidamente el fenotipo de divisiones ectópicas en la endodermis, para ello se contó en ambas mutantes el total de raíces que presentaron estas divisiones ectópicas en ambas mutantes y se comparó con la frecuencia en la que se encontraron dichas divisiones en las plantas Wt (figura 9). A partir de estas comparaciones se obtuvo que el 40 % de las raíces de *lhp1-6* tienen divisiones ectópicas en la epidermis, mientras que en *tfl2-2*, el 42 % presenta estas divisiones (figura 9B). Además, dentro de las raíces con divisiones ectópicas, se obtuvo muy alta variación, similar a lo que también se observó en la longitud de la raíz y el tamaño celular. Por ello se categorizaron las raíces en dos grupos, aquellas que presentaron menos de 10 divisiones y aquellas que tuvieron más de 10 divisiones. Del total de raíces con divisiones, el 57 % de las raíces de *lhp1-6* se agrupó en la primera categoría, y el 60 % en el caso de *tfl2-2*. Las divisiones ectópicas en la endodermis que presentaron las mutantes de *LHP1* sugieren que esta proteína es importante durante la diferenciación celular y posiblemente en el establecimiento de la identidad de la endodermis.

Como ya se mencionó, además de las divisiones en la endodermis, se observó desorganización en el SCN en las mutantes de *LHP1*. Aún no existe un método estandarizado para

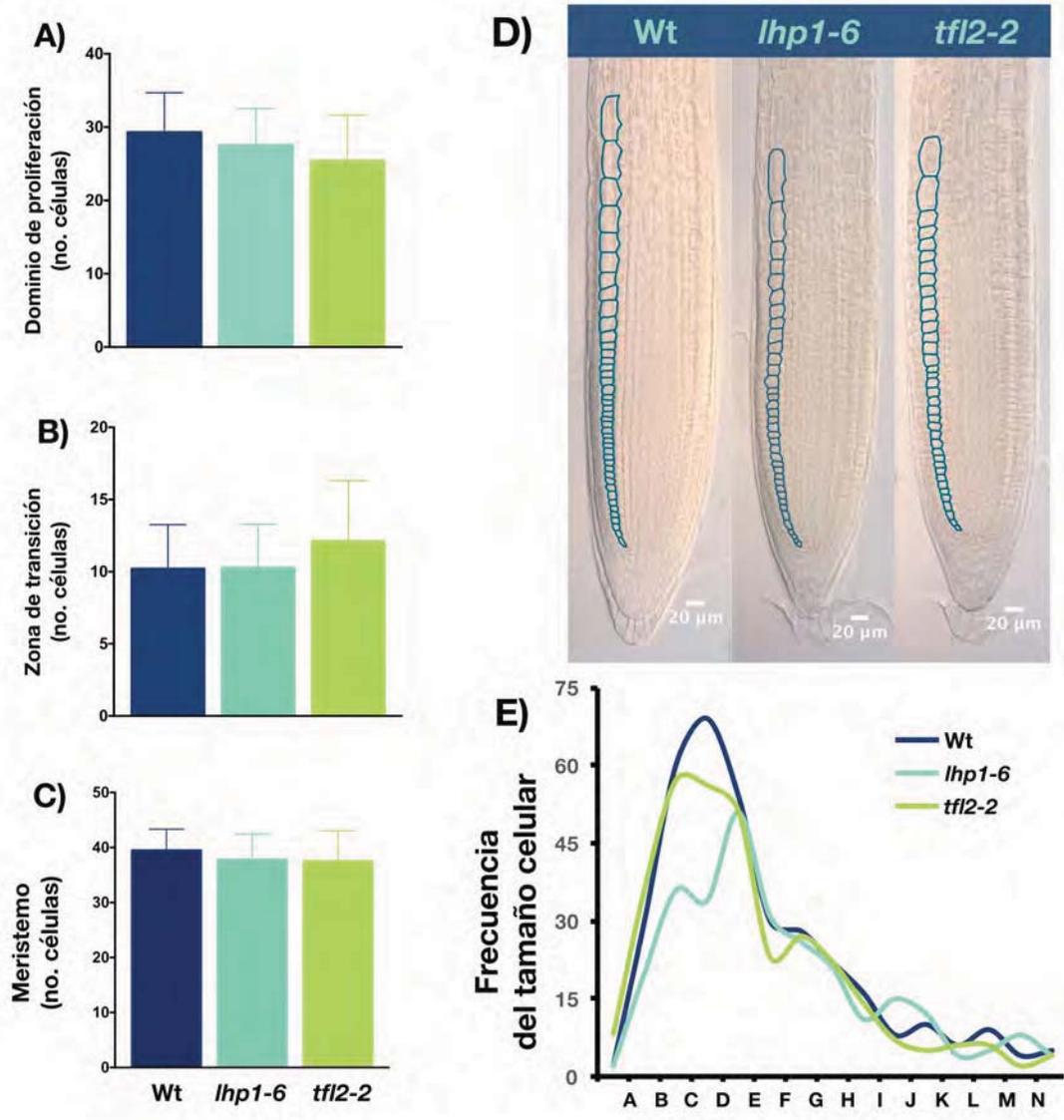


figura 8. Mediciones del meristemo de la raíz. A) comparación del número de células del dominio de proliferación del RAM. B) Comparación del número de células del dominio de transición del RAM. C) Número total de células del meristemo. D) Meristemos de las plantas Wt y mutantes de *LHP1*, se marcó el córtex para mostrar el número de células del meristemo. E) Frecuencia de longitud de las células del córtex, las letras representan categorías de longitud; 4-6, 6-8, 8-10, 10-11, 11-12, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24, 24-26, 26-28, 28-30, 30-32 y 32-34 μm respectivamente. Se realizó un Anova de una vía seguida de una prueba de Tukey para determinar diferencias entre los grupos. Plantas de 5 dps, n=30.

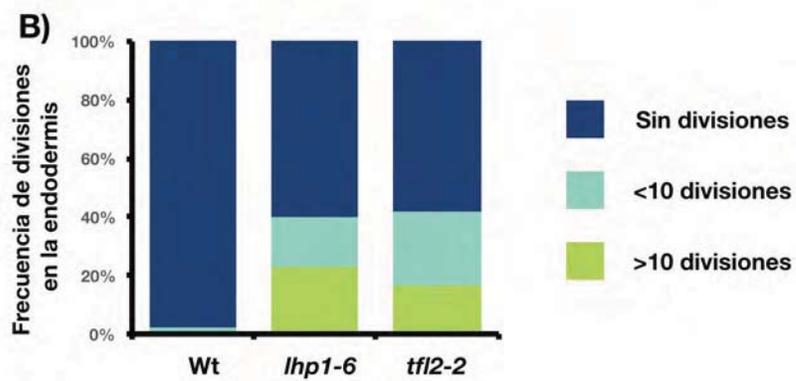
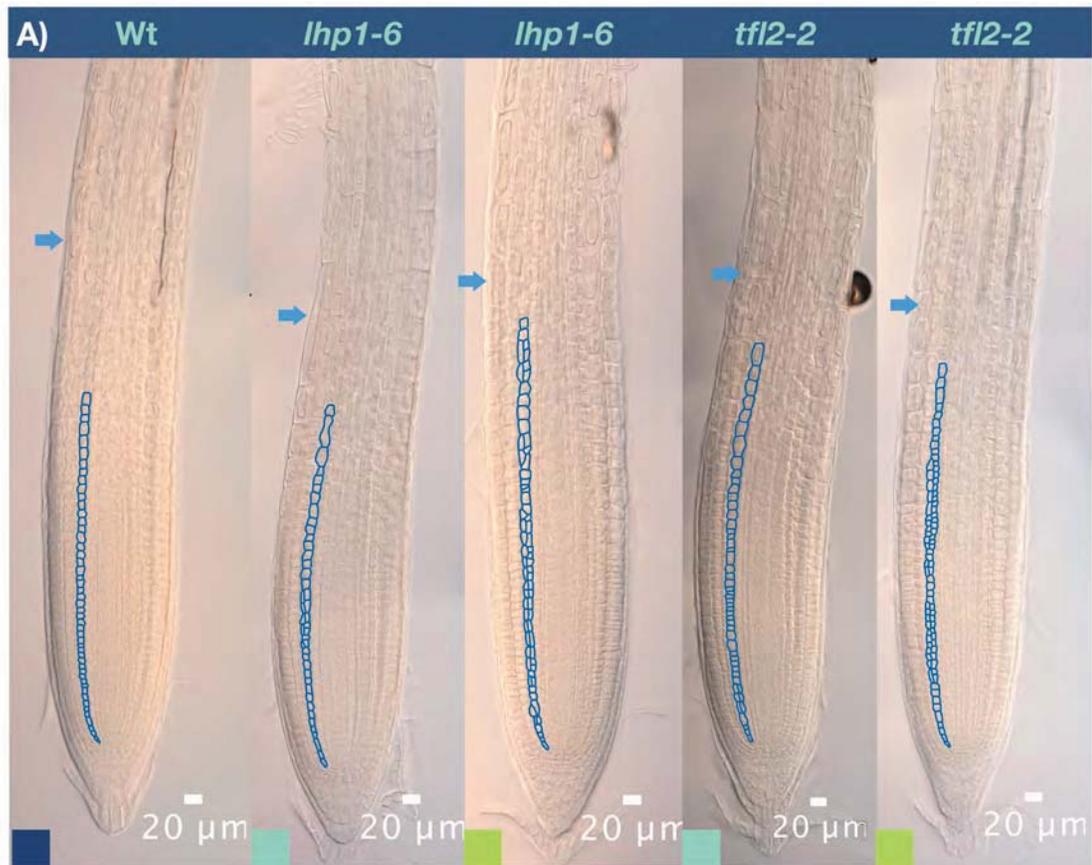


figura 9. Divisiones ectópicas en la endodermis del RAM de las mutantes de *LHP1*. A) Raíces de Wt, *lhp1-6* y *tf12-2* a las cuales se les marcó la endodermis, las fotos de las mutantes de *LHP1* corresponden a los dos fenotipos encontrados. B) Frecuencia en la que se encontraron cada uno de los fenotipos. Raíces de plantas de 5dps. Las flechas marcan el final del meristemo, n=20.

medir las variaciones que tiene esta región de la raíz, es por eso que en este caso para evaluar el grado de desorganización del SCN, se establecieron 4 categorías. La primera (0) indica que la raíz es normal, la segunda (1) agrupa a las raíces con desarreglo en alguna de las capas de células iniciales, ya sea de córtex/endodermis o columela, la tercera (2) agrupa al desarreglo de todas las iniciales, pero donde el QC se mantiene intacto y la cuarta (3) incluye a los SCN completamente anormales, donde el QC ya no es regular (figura 10). En *lhp1-6* la gran mayoría de raíces (41 %) se agrupó en la categoría 1, mientras que el resto (59 %) en las categorías 0, 2 y 3 (figura 10A y D), de este porcentaje, la mayoría tiene un desarreglo total de SCN (categoría 3). Por otra parte, en *tfl2-2* no se encontró ninguna raíz normal, siendo que se encontró una cantidad similar de raíces categorías 1, 2 y 3 (figura 10C y D). Es importante mencionar que en las plantas Wt, también se observó desorganización correspondiente a las categorías 2 y 3; sin embargo, el número de raíces en estos grupos fue mucho menor que en las mutantes. En conjunto, las afectaciones en la endodermis y SCN, pueden estar asociadas a la desregulación de un gran número de proteínas o modificaciones en el mecanismo de represión.

Ya se han estudiado algunos de los componentes que subyacen las divisiones ectópicas en la endodermis, y es poca la información sobre el posible papel de LHP1 (Cui y Benfey, 2009); sin embargo, la desorganización de SCN no ha sido abordada. Es por esto que se decidió profundizar en el origen de la desorganización del SCN en las mutantes de *LHP1*. La estrategia que se siguió fue analizar la expresión de *WOX5* por medio de GFP. *WOX5* es un factor de transcripción importante para el mantenimiento de las células del QC, así como para regular las divisiones de éstas para general las células iniciales que componen el SCN (Limin Pi et al., 2015). Para estudiar la expresión de *WOX5* en las plantas mutantes de *LHP1*, se hicieron cruza entre las plantas *lhp1-6* y las plantas que tienen la fusión transcripcional *pWOX5:GFP*, que fueron generadas previamente en el laboratorio (Sánchez, datos no publicados). Se observó que en la mutante *lhp1-6*, no se observó aparente de la señal de GFP del marcador ni tampoco en cuanto a su distribución (figura 11). De manera interesante no hubo cambios aparentes en la expresión de *WOX5* cuando se comparó una raíz con SCN normal y una con desorganización (figura 11C y D). El hecho de que la expresión de *WOX5* se mantuviera inalterada muestra que el fenotipo desorganizado del SCN en las plantas mutantes de *LHP1* no se debe a una desregulación de *WOX5*, sino que sugiere la participación de otros componentes que mantienen el SCN, como puede ser SCR, AGL42, entre otros.

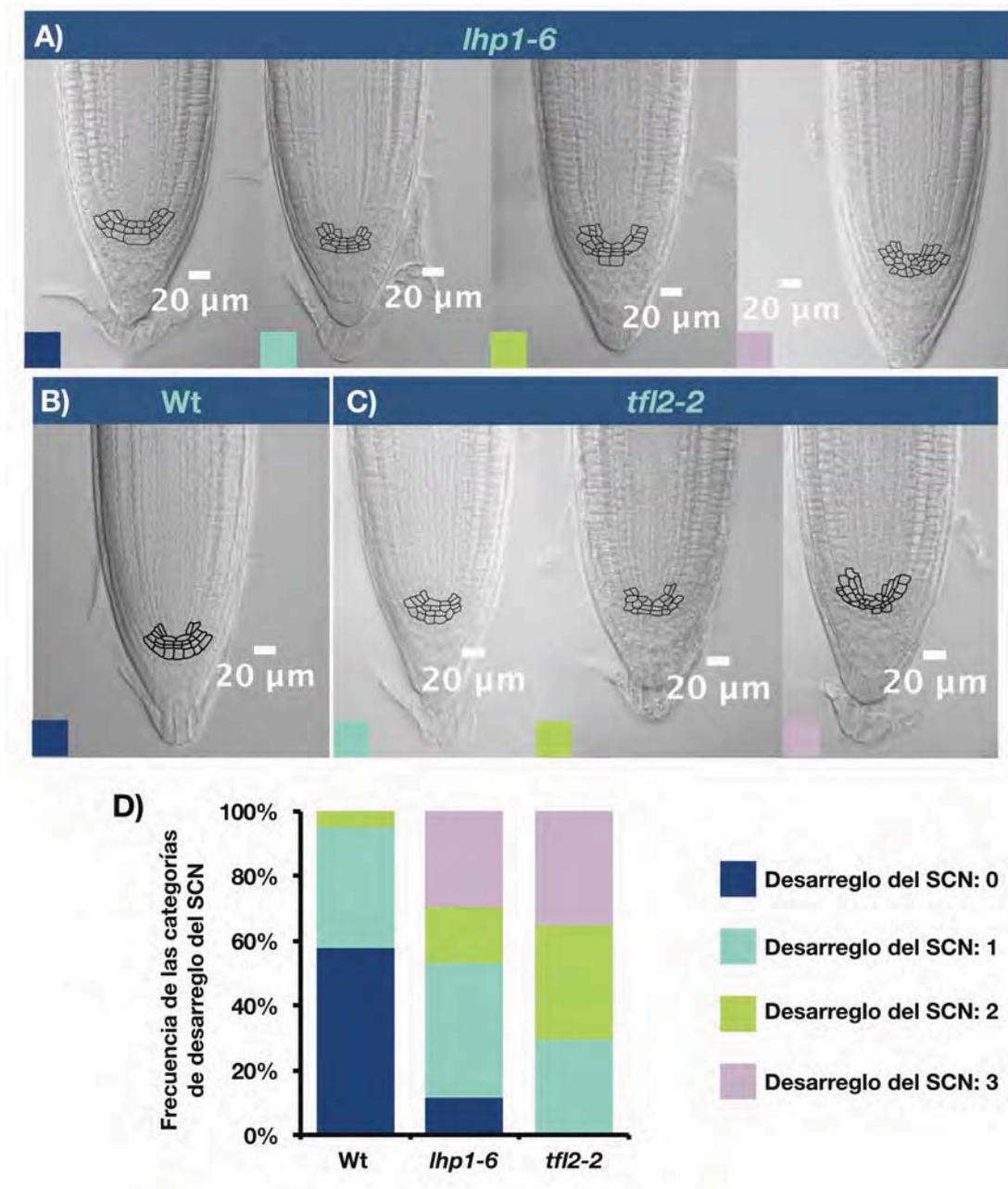


figura 10. Morfología del SCN. A) Fenotipos del SCN encontrados en *lhp1-6*. B) Fenotipo del SCN de plantas Wt. C) Fenotipos del SCN encontrados en *tf12-2*. D) Frecuencias de los fenotipos en las que se encontró cada una de las categorías establecidas para determinar la desorganización del SCN. Plantas de 5dps, n=20.

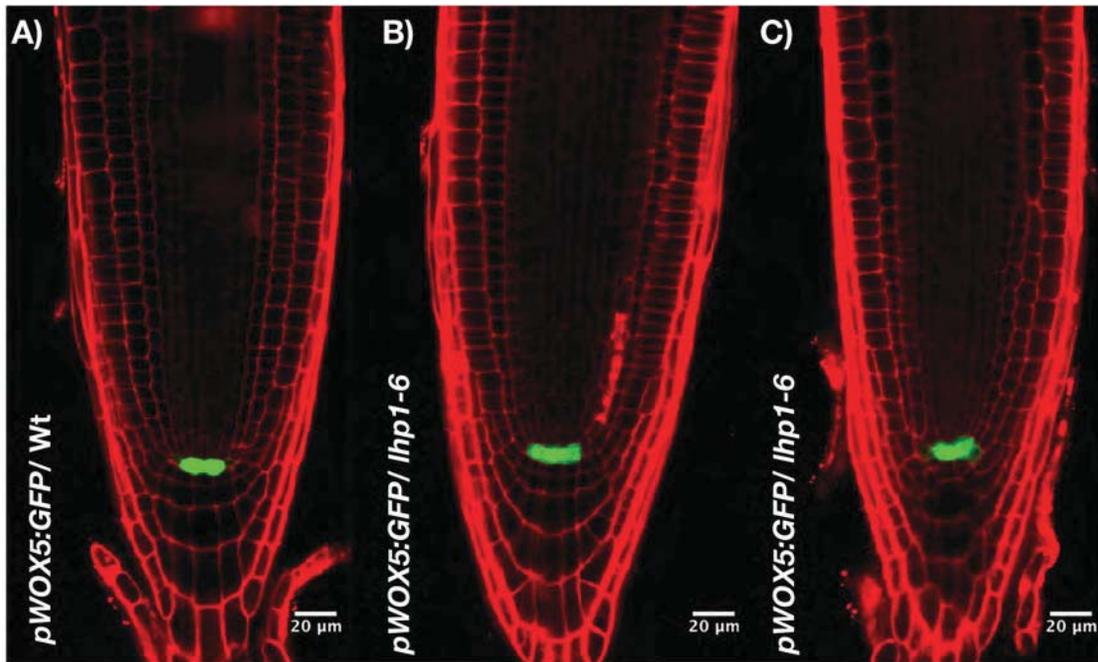


figura 11. Expresión de *pWOX5:GFP*. A) Expresión de *WOX5* en la planta Wt B) Expresión de *WOX5* en plantas mutantes *lhp1-6* con SCN normal y C) anormal. n=10

3.3 Expresión de *LHP1* en la raíz de Arabidopsis

Además de caracterizar el fenotipo en raíz de las mutantes de *LHP1*, se decidió determinar cuál es el patrón de expresión de la proteína *LHP1* en la raíz de Arabidopsis. El patrón de expresión puede dar información sobre en qué tejidos se localiza la proteína e incluso puede mostrar la distribución espacial dentro del núcleo. Para esto, se transformaron plantas con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*, la cual contiene al gen *LHP1* además de una región como posible promotor, que comprende 1,000 pb y que abarca justo la región intergénica entre *LHP1* y su gen adyacente, todo fusionado a la proteína reportera GFP. Las plantas transformadas fueron seleccionadas con kanamicina y segregadas hasta obtener plantas homocigotas para la resistencia al antibiótico. Al estudiar la expresión de *LHP1* mediante la visualización del reportero de GFP, se localizó en el núcleo formando pequeñas agregaciones que se observan como puntos (figura 12D), estos puntos probablemente correspondan a los sitios donde la cromatina está más compacta, parecido a la distribución de HP1 en animales (Dialynas et al., 2007). Por otra parte, en la raíz, la señal de GFP se puede encontrar principalmente en la zona del meristemática y, en particular, en la epidermis (figura 12A y B). En la zona de elongación, parece que su expresión se restringe únicamente a la epidermis y es importante notar que *LHP1* se encuentra en el QC; sin embargo, su expresión es muy baja (figura 12E). Resulta interesante que *LHP1*

tenga una mayor expresión en el RAM donde su pérdida de función resulta en cambios en su morfología.

Además, se generaron plantas *lhp1-6* complementadas con la misma construcción antes mencionada (*pLHP1:LHP1:GFP*) y se obtuvieron 2 líneas con expresión diferencial. La línea 8.3 parece tener una mayor expresión de *LHP1* con respecto a las plantas Wt (figura 12F y G); sin embargo, al observar el fenotipo aéreo, las plantas tienen una complementación casi total (figura 13 y 14), aunque, existe mayor variación intrapoblacional cuando las plantas son transferidas de placa a tierra (figura 13A y B). De manera interesante, siendo que la línea 9.8, que tiene menor expresión (figura 14) sigue siendo muy similar a la Wt, lo que indica que, al menos en la parte aérea, la dosis no tiene un efecto significativo. A pesar de que las plantas complementadas tienen expresión diferencial de la proteína, el patrón de distribución se mantiene igual a la del tipo Wt.

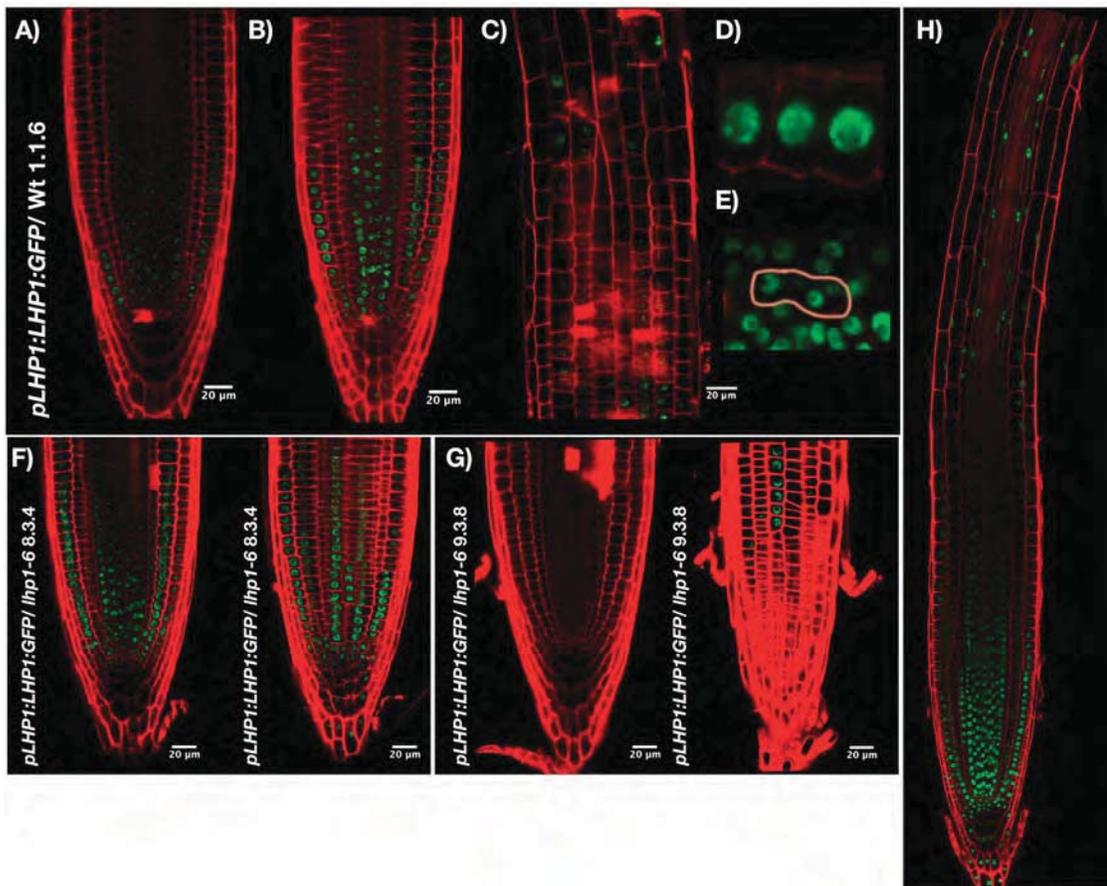


figura 12. Expresión de *LHP1* en la raíz de Arabidopsis. A) Plano medio de la raíz WT. B) Epidermis de la raíz WT. C) Zona de transición de la raíz. D) Localización de *LHP1* en el núcleo. E) expresión de *LHP1* en el QC, el círculo marca las dos células del QC. F) Plano medio y epidermis, respectivamente, de la línea *lhp1-6 8.3*. G) Plano medio y epidermis, respectivamente, de la línea *lhp1-6 9.8*. n=10.

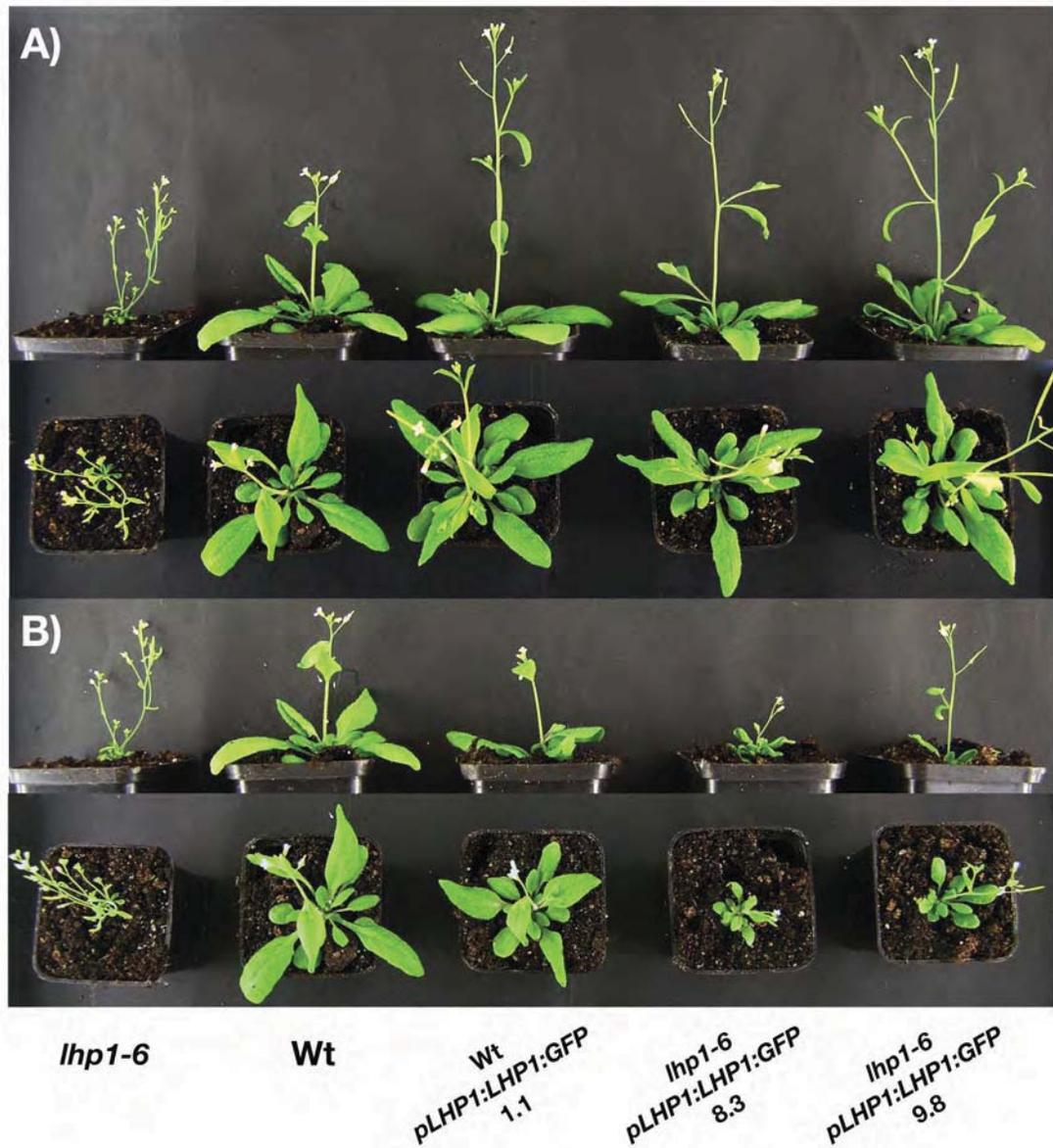


figura 13. Fenotipo aéreo de las líneas *Wt* y mutantes *lhp1-6* transformadas con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*. Se muestran dos fenotipos para cada línea A) y B) para ejemplificar la variación entre los individuos. Plantas germinadas en medio MS y transplantadas a los 9dps a tierra.



figura 14. Fenotipo aéreo de las líneas Wt y mutantes *lhp1-6* transformadas con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*. Se muestran dos fenotipos para cada línea para ejemplificar la variación entre los individuos. Plantas sembradas directamente en tierra.

Parte II

Generación de herramientas moleculares para el estudio de TrxG y PcG

3.4 Clonación y recombinación del gen *ATX1*

El gen *ATX1*, que codifica una de las metiltransferasas de TrxG, está compuesto por 26 exones y 23 intrones que, en conjunto, generan un fragmento de 6,910 pb. Este gran tamaño hace complicada su amplificación y clonación completa, ya que si se considera además la longitud del promotor, el fragmento resultante es de 8,732 pb. Para solucionar este problema se decidió clonar la región codificante que contiene únicamente los exones y que es de 3,189 pb, y fusionarla a un promotor de expresión constitutiva como lo es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, además del reportero GFP. Lo anterior se puede lograr mediante el uso del sistema de recombinación GATEWAY, en el cual se inserta el fragmento amplificado de interés en un vector abierto (pCR™8/GW/TOPO™), contiene las secuencias necesarias para recombinarse con un vector de destino (PDEST) (figura A4). Este vector de destino puede contener fusiones a diversos tipos de proteínas reporteras, además de que puede o no contener el promotor 35S.

El fragmento de *ATX1* codificante se amplificó a partir de una muestra de cDNA Wt obtenido por RT-PCR de muestras de RNA de tejido de raíz, posterior a la amplificación se procedió a purificar el producto de la amplificación y se insertó en el vector pCR™8/GW/TOPO™ mediante la reacción de la topoisomerasa asociada al mismo. Con el plásmido obtenido se transformaron bacterias de *E. coli* y se obtuvieron varias clonas de las cuales se seleccionaron 3 para hacer una purificación de DNA plasmídico por Kit. Del DNA extraído de la clonas, nombradas B1, B2 y B3, se realizó un ensayo de digestión con la enzima de restricción Xba1 y todas la clonas presentaron los fragmentos de 5,147 pb y 856 pb esperados (figura 15A y B), por lo que se procedió a secuenciar las tres clonas; de la clona B2 y B3 se obtuvo una secuencia parcial que reveló la presencia de varias mutaciones. Por otra parte, la clona B1 se obtuvo la secuencia completa, misma

que además no mostró ninguna mutación, por lo que esta fue la clona usada para ensayos posteriores (figura A5).

Posterior a la clonación, se realizó la reacción de recombinación con el vector de destino pGWB5, que contiene tanto al gen que codifica la GFP como el promotor constitutivo 35S. Se obtuvo únicamente una clona a partir de este ensayo, la cual se creció para realizar una extracción de DNA plasmídico. Se corroboró la presencia del vector con la construcción *35S:ATX1:GFP* mediante un ensayo de digestión enzimática con la enzima de restricción Pst1, obteniendo los fragmentos esperados (figura 15B). Para corroborar la recombinación, se mandó a secuenciar la construcción. En este caso la región secuenciada fue la que comprende una parte de la fusión con GFP y la región 3' del gen de *ATX1*, de tal manera que se corroboró que estuvieran en marco de lectura y no ocurriera un error en la traducción y así obtener la proteína de fusión ATX1-GFP. La secuencia obtenida se alineó con la secuencia teórica del vector y del gen, mostrando que la proteína reportera se encuentra en marco de lectura con respecto a la región 3' del gen.

La clona final *35S:ATX1:GFP* (figura 15D) es una herramienta que se está usando para obtener plantas que expresen esta proteína de fusión y aunque se trate de una construcción sin el promotor nativo del gen, las líneas sobreexpresoras fusionadas a GFP se usarán para estudiar los genes que son regulados por *ATX1* mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

3.5 Recombinación del gen CLF

CLF es una de las metiltransferasas del grupo PcG, a diferencia de *ATX1*, el gen que la codifica no es tan extenso, su región codificante es de alrededor de 4,545 pb, es por eso que en este caso se clonó la región genómica del gen más una región de 1,000 pb, que fue considerada como región promotora, ya que a falta de datos que delimiten esta región, hasta lo que corresponde al inicio del gen adyacente. El proceso de clonación en el vector pCR[™]8/GW/TOPO[™] fue realizado con anterioridad en el laboratorio (Sánchez, datos no publicados). Ese plásmido se recombinó, en este caso, por el hecho de que contiene el gen junto con su promotor, al vector destino pGWB4, el cual contiene únicamente el gen que codifica a GFP (figura 16). Después de varios intentos de recombinación se obtuvieron varias colonias que se probaron por PCR de punto final a partir de colonia (figura 16B). Sólo se seleccionó una clona para la secuenciación, la cual fue realizada como se describió anteriormente para *ATX1*. La secuencia obtenida se comparó con el vector teórico y se determinó que la fusión de GFP se encuentra en el marco de lectura correcto. Al igual que el plásmido generado para *ATX1*, esta construcción se está usando para complementar

plantas mutantes en *CLF*, para determinar la expresión de esta proteína en los diferentes tejidos de la raíz y eventualmente se usará para determinar los blancos de *CLF*.

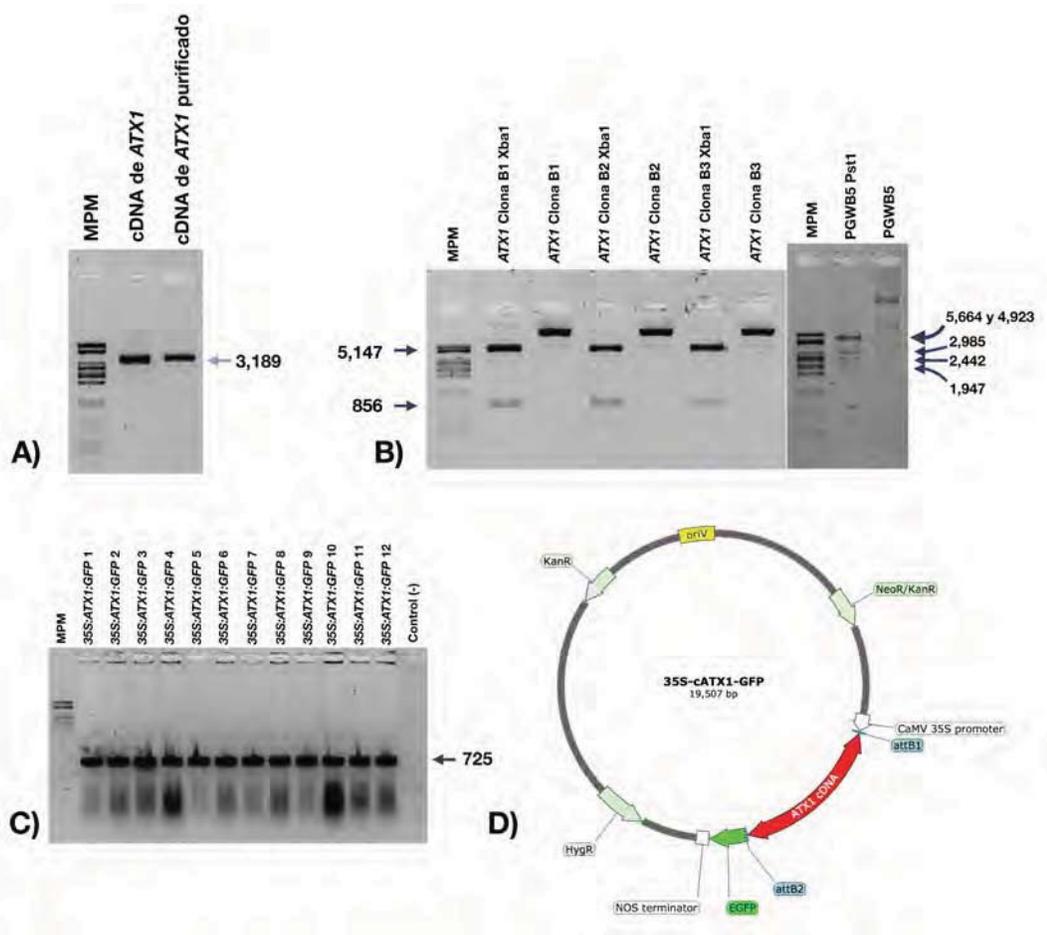


figura 15. Clonación y recombinación de *ATX1*. A) Gel de la amplificación de la región codificante de *ATX1* B) Geles del ensayo de digestión enzimática de la clona de *ATX1* en pCR™ 8/GW/TOPO™ digerida con la enzima *Xba1*, las flechas marcan las bandas esperadas. C) Gel de PCR de punto final a partir de colonia, de las clonas obtenidas posterior a la recombinación en el vector de pGWB5. D) Esquema gráfico de la construcción *35S:ATX1:GFP* obtenida.

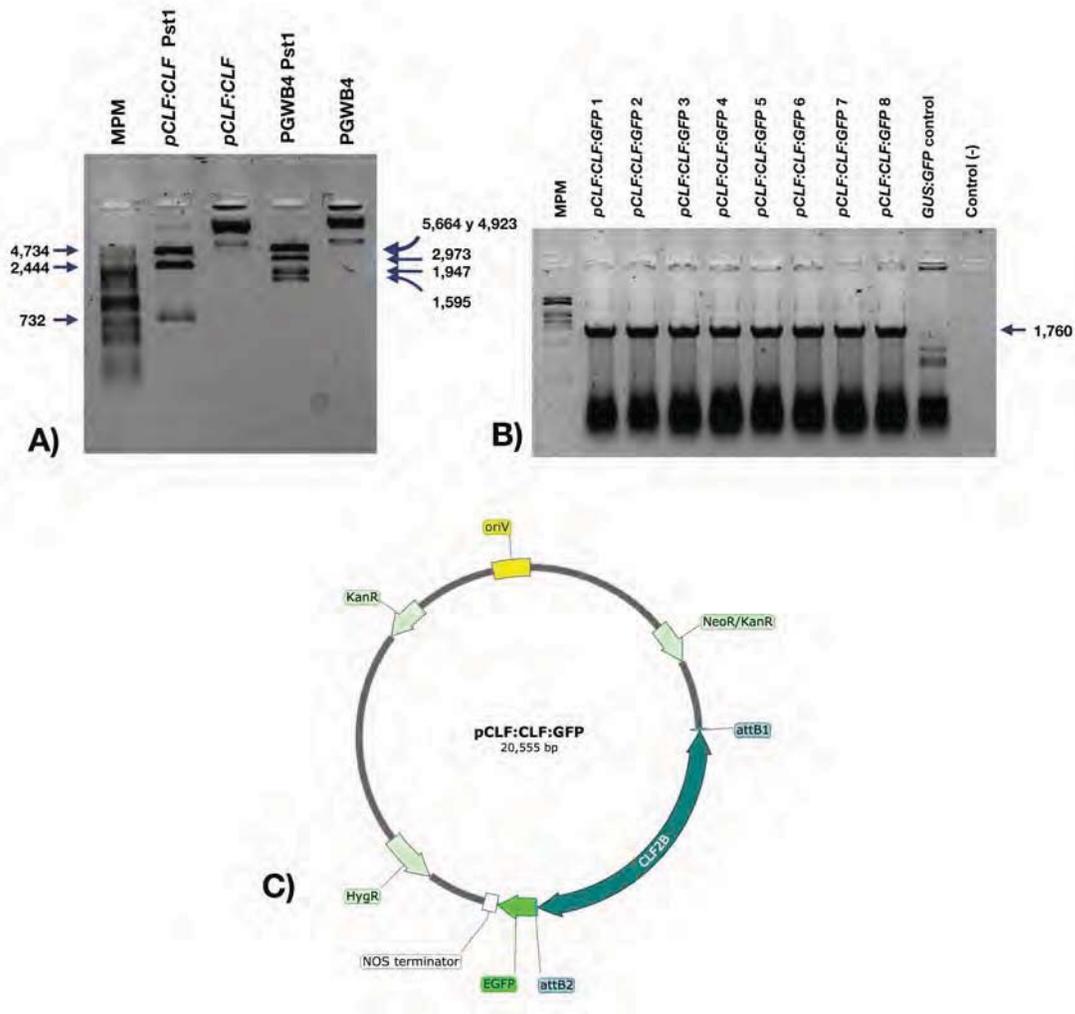


figura 16. Análisis de las clonas de *CLF* obtenidas a partir de su recombinación con el vector *pGWB4*. A) Gel del ensayo de digestión enzimática de *pCLF:CLF* en *pCRTM8/GW/TOPOTM* y del vector de destino *pGWB4*, digeridos con la enzima *Pst1*, las flechas marcan las bandas esperadas. B) Gel de PCR de punto final a partir de colonia, de las clonas obtenidas posterior a la recombinación, la flecha marca la banda esperada. C) Esquema gráfico de la construcción *pCLF:CLF:GFP*.

La gran cantidad de estudios que existen sobre PcG, muestran que tiene un papel importante en el desarrollo de *Arabidopsis*, participando en varias etapas de su ciclo de vida y estando presente en varios de sus órganos. A pesar de esto se ha estudiado muy poco su función en el desarrollo de la raíz. Una forma de estudiar a los componentes epigenéticos que pueden participar en este proceso, como son CLF del grupo PcG y ATX1 de TrxG, es a través de su clonación para generar herramientas que ayuden a definir su expresión en los diferentes tejidos de la raíz, así como su unión a las regiones regulatorias de sus genes blanco. Por lo cual en este trabajo se hizo uso del sistema Gateway para clonar estos genes en vectores específicos.

La ventaja del uso de este sistema, es que a partir de un solo evento de clonación se obtiene una construcción que puede ser recombinada con una gran variedad de vectores destino, permitiendo cambiar el marcador molecular de manera sencilla. Esto agiliza los tiempos empleados para la construcción de las herramientas moleculares necesarias para el estudio de ciertos genes. Es importante mencionar que el sistema Gateway maneja dos tipos de vectores de entrada. En este trabajo se hizo uso de la versión no dirigida, lo que implica que durante la clonación, el fragmento puede insertarse en cualquier dirección. Aunque, existe el vector de entrada dirigido, experimentos previos en el laboratorio mostraron que con este vector se obtenía un menor rendimiento de clonación y en algunas ocasiones el proceso de inserción del fragmento no era exitoso. La generación de herramientas para el estudio de genes permitirá obtener información a partir del seguimiento de la expresión por la detección de GFP u otros marcadores, así como realizar inmunoprecipitaciones, ensayos de ChIP, entre otros, que seguramente revelarán más detalladamente el mecanismo de regulación de PcG y otros grupos como TrxG.

Adicionalmente, en este trabajo se decidió profundizar en la posible función de PcG a través del estudio de mutantes de la proteína LHP1, que es un componente del sub complejo PCR1. Como primer acercamiento a este objetivo, se analizó la expresión de algunos de sus componentes en la raíz de *Arabidopsis*, a través del uso de bases de datos disponibles (Birnbaum et al. 2016). Es interesante que los ensayos *in silico* sobre la expresión de *LHP1* parece ser más similar a *CLF* y *SWN* que a los componentes del subcomplejo al cual pertenece. De manera similar, los patrones de expresión en cada tejido, tienden a ser semejantes a *CLF* y *SWN*, exceptuando la epidermis y parece ser que

LHP1 tiene una expresión preferencial en la zona de proliferación de todos los tejidos del meristemo.

Al hacer el análisis de la expresión de la proteína de *LHP1* determinada por las plantas generadas con la construcción (*pLHP1:LHP1:GFP*), se observó un comportamiento similar al obtenido *in silico* y aunque en algunos tejidos es ligeramente diferente, probablemente esto se deba a que la expresión del gen difiere un poco respecto a la expresión de la proteína. La proteína se expresa en todos los tejidos del meristemo pero se restringe preferencialmente a la zona de proliferación, patrón que coincide con lo reportado por (Cui y Benfey, 2009). De manera interesante, se observó que la expresión de *LHP1* no sólo es exclusiva de células con alta proliferación, sino que también se expresa, aunque en menor proporción, en las células del centro quiescente cuya actividad mitótica es muy baja, así como en las células iniciales que componen el SCN y en las células de la epidermis totalmente diferenciadas. Esto sugiere que *LHP1* está implicado en la regulación de diferentes procesos tanto de proliferación y diferenciación para el correcto desarrollo de la raíz.

Otra cuestión importante relacionada con la expresión de *LHP1* es su distribución granular o moteada en el núcleo. Se ha descrito anteriormente que HP1 de animales, la proteína que comparte homología estructural pero no funcional con *LHP1* (Zeng et al., 2010) tiene una distribución granular en el núcleo, parecida a la distribución de *LHP1*, que corresponde con las zonas heterocromáticas (Dialynas et al., 2007), lo cual sugiere que estas proteínas homólogas, pueden cumplir funciones similares en la heterocromatinización de la cromatina aunque por marcas epigenéticas distintas. En el caso de la variante HP1 de animales, se ha observado que tiene una asociación atípica a regiones de activación transcripcional (Vakoc et al., 2005) y además las tres variantes en mamíferos se han visto relacionadas con la vía de reparación de DNA mediada por ATM, en ausencia de H3K9me3, marca que reconocen estas proteínas (Ball et al., 2009). Estas funciones emergentes de HP1 y el hecho de que su homólogo en plantas *LHP1* no siempre actúan como lector de la marca H3K27me3, hacen pensar que podrían tener implicación en diferentes procesos que no involucran a PcG.

Ya se ha comprobado que PcG es importante en varios procesos del desarrollo. Particularmente en *Arabidopsis* existe evidencia sobre participación en la floración, desarrollo embrionario y desarrollo vegetativo, algunos de estos datos se han obtenido a través de la caracterización de fenotipo de mutantes para componentes de PcG. Se ha observado que las mutantes *clf-29*, la principal metiltransferasa que coloca la marca de H3K27me3 en los procesos de floración y desarrollo vegetativo, presentan floración temprana, pocas silicuas, roseta con hojas pequeñas y curvadas, además de un escape elongado (Goodrich

et al. 1997), mientras que las mutantes de *SWN*, homólogo de *CLF*, al no presentar fenotipo aéreo aparente se le ha considerado como un alelo débil. En el caso de los posibles componentes de *PRC1*, *LHP1* parece tener un fenotipo diferente al encontrado en la mutante de *CLF*, siendo que presentan floración temprana, flores terminales y una roseta pequeña, pero su escapo se mantiene pequeño (Mylne et al., 2006). Estos datos son sugerentes de que *LHP1* podría tener funciones independientes a *CLF*. Esto queda más evidenciado con los estudios en raíz, ya que se ha descrito que mientras que las mutantes *clf-29*, presentan una raíz más larga comparado al *Wt*, y que tiene un meristemo con mayor número de células (Vega-León, Datos no publicados). Las dos mutantes de *LHP1* estudiadas en este trabajo (*lhp1-6* y *tfl2-2*) tiene una raíz más corta que las plantas *Wt* y el tamaño de las células del meristemo es ligeramente más pequeño. Estos datos sugieren que *LHP1* está involucrado en procesos diferentes a los que tiene *CLF* o incluso *PcG*, en el desarrollo de la raíz. De igual manera, esto no excluye la posibilidad de que *LHP1* esté formando parte de variantes de *PRC1* o reclutando a variantes de *PRC2* que no contengan a *CLF*.

El tamaño de la raíz depende del balance entre el número de celular del meristemo que se están generando y el número de células que se están diferenciando, además del tamaño de las células diferenciadas (Ivanov y Dubrovsky 2013). Aunque en este trabajo no se evaluó el tamaño de las células diferenciadas, sí se encontró que la longitud de la raíz de las mutantes *lhp1-6* y *tfl2-2* puede explicarse parcialmente por el tamaño ligeramente menor de las células del meristemo, en contraste a lo que ocurre en las mutantes de *CLF* cuya longitud de raíz se explica parcialmente porque tienen un meristemo con más número de células. Aunque el tamaño celular observado en ambas mutantes de *LHP1* es más pequeño, la alta variación que se observó en ambas mutantes sugiere que *LHP1* está implicado en acoplar el tamaño celular con la división celular y, en su ausencia, las células no son capaces de establecer correctamente en qué momento deben dividirse generando variación en el tamaño celular.

El hecho de que las plantas mutantes en *LHP1* tengan fenotipos altamente variables, a diferencia de otras mutantes de factores transcripcionales u otros complejo, puede estar asociado con un incremento en la plasticidad generada por la pérdida de *LHP1*, sugiriendo un papel de *LHP1* en la integración de señales ambientales. De manera interesante, *lhp1-6* y *tfl2-2* presentan variación en su crecimiento cuando se germinan en medio *MS* respecto a cuando se germinan directamente en tierra, siendo esta condición mejor para el crecimiento, efecto que no se observa en otras mutantes. Este comportamiento refuerza la idea de que *LHP1* puede ser importante en la integración de señales ambientales. En el caso del grupo *PcG* ya se ha descrito su importancia en la integración de señales

ambientales para regular la floración y algunos procesos de estrés (Ding et al., 2012; Berry y Dean, 2015).

Por otro lado, el efecto que tiene PcG en la desorganización de los tejidos del RAM y del SCN de la raíz, es importante porque permitirá evaluar la dinámica de los mecanismos epigenéticos en células quiescentes indiferenciadas y células diferenciadas de varios linajes celulares. En el caso de las divisiones ectópicas en la endodermis que presenta las mutantes de *LHP1*, ya se ha descrito que *LHP1* junto con *SCR* participan en la regulación de estas divisiones asimétricas que dan origen al córtex medio (Cui y Benfey, 2009). Las divisiones en este tejido, como se describió en los resultados, es variable, y se observaron raíces donde las divisiones eran consecutivas y parecían formar una capa nueva de células, que posteriormente se corrige en un par de células y de nuevo se presentan dos capas. Lo anterior parece indicar que en algún punto el programa original del tejido se recupera. Además, este fenotipo no se encuentra en la totalidad de las raíces, lo que puede indicar que *LHP1* no se requiere en todos los casos para regular esta vía o que existan otras vías independientes de *LHP1* que actúan en estos casos.

Además de las divisiones asimétricas encontradas en la epidermis, en este trabajo se observó un desarreglo en el SCN. Al igual que con las divisiones en la endodermis, el fenotipo del desarreglo del SCN es variable, teniendo raíces con SCN normal y otras en el extremo opuesto. Hasta ahora se han descrito varias proteínas que participan en la red que modula el mantenimiento del SCN, entre ellas están *SCR*, *SHR*, *PLTs*, *SMB* y *FEZ* (Willemsen et al., 2008; Sabatini et al., 2003; Aida et al., 2004), que están implicadas en dar identidad a cada una de las capas celulares que componen el nicho y promover las transiciones a células diferenciadas. Por otra parte, se ha descrito que *WOX5*, *AGL42* y *SCR* son proteínas importantes en el mantenimiento de la identidad del QC y del SCN (Petricka et al., 2012). De manera interesante, aunque, las mutantes de *LHP1* presentan una desorganización en el SCN, la ausencia de *LHP1* no parece tener repercusiones en la expresión de *WOX5* en el QC. Un análisis similar realizado con el mutante *clf-29*, muestra que *WOX5* disminuye su expresión en la ausencia de *CLF*, lo que sugiere que *CLF* podría estar regulando de manera indirecta a *WOX5* e independiente de *LHP1*, lo cual concuerda con las diferencias fenotípicas observadas entre las mutantes de *LHP1*, y la mutante de *CLF* que no presenta desorganización en el SCN (Vega-León, datos no publicados). En contraste a lo encontrado con los miembros de PcG, se ha observado que *TrxG*, a través de *ATX1* y *ULT1*, parece estar involucrado en la regulación positiva de *WOX5* (Vega-León y Ornelas, datos no publicados; Petrone, 2015) y en los mutantes de estos dos miembros de *TrxG* también se observa una desorganización del SCN. Estos datos indican que la desorganización del SCN generada por los factores epigenéticos puede incidir en diferentes factores de transcripción implicados en la red de regulación

del SCN y que no necesariamente se regulan antagónicamente por PcG y TrxG y más aún que LHP1 puede regular algún proceso de esta red transcripcional independientemente de CLF. Es posible que LHP1 no sólo sea requerido para regular genes a través de PcG, sino que también sea capaz de reconocer de manera independiente secuencias o regiones específicas. Al respecto, se ha descrito que LHP1 se une a secuencias GAGA que contienen un cierto número de genes, y puede ser que por medio de estas secuencias sea capaz de regular la expresión independiente de la marca H3K27me3 que cataliza PRC2 (Hecker et al., 2015). Evaluar cuál es el comportamiento del resto de las proteínas que regulan el SCN en las mutantes *lhp1-6* y *tfl2-2* será importante para establecer los mecanismos en los cuales LHP1 está participando en su mantenimiento.

Otros componentes importantes en la regulación de la diferenciación y mantenimiento del SCN en la raíz son las hormonas. En este caso en particular el flujo de auxinas tiene un papel fundamental. El transporte de estas se modula a través de proteínas llamadas PIN (Kovrizshnykh et al., 2015). Uno de los genes MADS-box que está involucrado en la regulación de los PIN, es *XANTAAAL 2 (AGL14)* y sus mutantes, de manera interesante, no parecen tener afectada la expresión de *WOX5* en el QC; sin embargo, tiene problemas en la organización de las iniciales y de las células diferenciadas de la columela (Garay-Arroyo et al., 2013). Será interesante evaluar si la similitud en el fenotipo del SCN entre la mutante de *AGL14* y *LHP1* tiene características similares también en su mecanismo de acción, quizá mediando el posicionamiento de los PIN a través de *XAL2*. Esta hipótesis también se puede sustentar por un estudio que muestra la participación de LHP1 en la regulación de PINOID, a través de un RNA no codificante (Ariel et al., 2014).

De manera interesante, datos preliminares muestran que LHP1 regula a *AGL14* y, por otra parte, ya se ha comprobado en el laboratorio que en la mutante *clf-29*, *AGL14* aumenta su expresión (Petrone, datos no publicados; Vega-León, datos no publicados). Lo anterior indica que, en este caso, *AGL14* está siendo regulado por un mecanismo que involucra la presencia de LHP1 y una variante de PRC2 que contiene a CLF. Sería interesante determinar si este mecanismo corresponde al canónico descrito en *Drosophila* o sólo se requiere de la represión mediada por la H3K27me3.

Para determinar que los fenotipos descritos en este trabajo se dan por la ausencia de LHP1, como primer paso se generaron plantas *lhp1-6* y *tfl2-2* complementadas con la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*. El análisis fenotípico de la parte aérea reveló una complementación casi total, aunque con algunas diferencias entre las líneas obtenidas. Es interesante que de las dos líneas obtenidas una presenta menor expresión de *LHP1* que la otra, a pesar de eso no se observan diferencias claras en la complementación entre estas líneas, indicando que la dosis de LHP1, al menos en la parte aérea, no tiene importancia.

Por otra parte, es necesario realizar pruebas para determinar que la complementación también se observa en la raíz, por lo que se esperaría una desaparición de las divisiones ectópicas en la endodermis y un fenotipo normal de SCN.

Los datos generados en este trabajo muestran que LHP1 tiene una función en el desarrollo de la raíz, lo cual no ha sido abordado anteriormente. Se demostró que en las mutantes existen desregulaciones en el RAM, sin embargo es necesario realizar más ensayos para explicar las mismas. Por otra parte, es importante tomar en cuenta otros componentes de PcG para poder generar un modelo que muestre el o los mecanismos por los cuales este complejo regula al SCN, esto se puede abordar a través de la construcción de *CLF* generada en este trabajo. Además, integrar esta información con la que se pueda generar de TrxG, a través del estudio de *ATX1*, puede mostrar cómo es la dinámica de activación y represión que dan origen a las células quiescentes e iniciales de SCN y diferenciadas, en la raíz de *Arabidopsis*.

A partir de los datos generados a través del estudio de dos mutantes de *LHP1*, se pueden generar las siguientes conclusiones:

- La función de *LHP1* es importante para el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*.
- *LHP1* puede estar participando en la plasticidad de la raíz a través de la integración de señales ambientales.
- La expresión de *LHP1* se da en la zona de proliferación del RAM, localizándose en el núcleo, formando gránulos.
- La represión de las divisiones en la endodermis está mediada por *LHP1*.
- Es importante la función de *LHP1* para la organización y/o el mantenimiento del SCN.
- La ausencia de *LHP1* no afecta la expresión de *WOX5*
- El fenotipo observado en las mutantes, se explica por la ausencia de *LHP1*.

Referencias

- Aida, M. et al., 2004. The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell*, 119(1), pp.109–120.
- Alvarez-Venegas, R., 2010. Regulation by polycomb and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*, 8, p.e0128.
- Alvarez-Venegas, R. & Avramova, Z., 2001. Two Arabidopsis homologs of the animal trithorax genes: a new structural domain is a signature feature of the trithorax gene family. *Gene*, 271(2), pp.215–221.
- Ariel, F. et al., 2014a. Noncoding Transcription by Alternative RNA Polymerases Dynamically Regulates an Auxin-Driven Chromatin Loop. *Molecular Cell*, 55(3), pp.383–396.
- Ball, A.R., Yokomori, K. & Yokomori, K., 2009. Revisiting the role of heterochromatin protein 1 in DNA repair. *The Journal of cell biology*, 185(4), pp.573–5.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), pp.381–95.
- Basta, J. & Rauchman, M., 2015. The nucleosome remodeling and deacetylase complex in development and disease. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 165(1), pp.36–47.
- Baumbusch, L.O. et al., 2001. The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Research*, 29(21), pp.4319–4333.
- Bemer, M. & Grossniklaus, U., 2012. Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(5), pp.523–529.
- Berr, A., Shafiq, S. & Shen, W.-H., 2011. Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA):Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(10), pp.567–576..
- Birnbaum, K. et al., 2016. A Gene Expression Map of the Arabidopsis Root Published by: American Association for the Advancement of Science Stable. 302(5652), pp.1956–1960.
- Blackledge, N.P. et al., 2014. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell*, 157(6), pp.1445–59.
- Calonje, M. et al., 2008. EMBRYONIC FLOWER1 participates in polycomb group-mediated AG gene silencing in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20(2), pp.277–91.
- Carles, C.C. & Fletcher, J.C., 2009. The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants service The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. , (510), pp.2723–2728.
- Cederholm, H.M., Iyer-Pascuzzi, A.S. & Benfey, P.N., 2012. Patterning the primary root in Arabidopsis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), pp.675–691.
- Chen, L.Q. et al., 2017. ATX3, ATX4, and ATX5 Encode Putative H3K4 Methyltransferases and Are Critical for Plant Development. *Plant physiology*, 174(3), pp.1795–1806.

- Cui, H. & Benfey, P.N., 2009. Interplay between SCARECROW, GA and LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 in ground tissue patterning in the Arabidopsis root. *Plant Journal*, 58(6), pp.1016–1027.
- Deans, C. & Maggert, K.A., 2015. What do you mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199(4), pp.887–896.
- Derkacheva, M. et al., 2013. Arabidopsis MSI1 connects LHP1 to PRC2 complexes. *The EMBO journal*, 5(14), pp.1–13.
- Derkacheva, M. & Hennig, L., 2014. Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), pp.2769–2784.
- Dialynas, G.K. et al., 2007. Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 120(19), pp.3415–3424.
- Ding, Y. et al., 2012. ATX1-Generated H3K4me3 Is Required for Efficient Elongation of Transcription, Not Initiation, at ATX1-Regulated Genes G. P. Copenhaver, ed. *PLoS Genetics*, 8(12), p.e1003111.
- Ding, Y., Avramova, Z. & Fromm, M., 2011. Two Distinct Roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at Promoters and within Transcribed Regions of ATX1-Regulated Genes. *The Plant Cell*, 23(1), pp.350–363.
- Ding, Y., Fromm, M. & Avramova, Z., 2012. multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3.
- Exner, V. et al., 2009. The chromodomain of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 is essential for H3K27me3 binding and function during arabidopsis development. *PLoS ONE*, 4(4), pp.1–10.
- Filion, G.J. et al., 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell*, 143(2), pp.212–24.
- Fransz, P. & de Jong, H., 2011. From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information. *The Plant Journal*, 66(1), pp.4–17.
- Garay-Arroyo, A. et al., 2013. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *The EMBO journal*, 32(21), pp.2884–95.
- Gaudin, V. et al., 2001. Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 128(23), pp.4847–58.
- Goodrich, J. et al., 1997. A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. *Nature*, 386(6620), pp.44–51.
- Guo, L. et al., 2010. SET DOMAIN GROUP2 is the major histone H3 lysine [corrected] 4 trimethyltransferase in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), pp.18557–62.
- He, X.-J., Chen, T. & Zhu, J.-K., 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, 21(3), pp.442–465.
- Hecker, A. et al., 2015. The Arabidopsis GAGA-Binding Factor BASIC PENTACYSSTEINE6 Recruits the POLYCOMB-REPRESSIVE COMPLEX1 Component LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 to GAGA DNA Motifs. *Plant physiology*, 168(3), pp.1013–24.
- Hennig, L. & Derkacheva, M., 2009. Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? *Trends in Genetics*, 25(9), pp.414–423.

- Ivanov, V.B. & Dubrovsky, J.G., 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: Conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), pp.237–243.
- Jablonka, E. & Lamb, M.J., 2002. The Changing Concept of Epigenetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 981, pp.82–96.
- Jablonka, E., Raz, G. & Press, C., 2009. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84(2), pp.131–176.
- Jackson, J.P. et al., 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416(6880), pp.556–560.
- Jackson, J.P. et al., 2004. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, 112(6), pp.308–315.
- Jiang, D. et al., 2011. *Arabidopsis* COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genetics*, 7(3).
- Jørgensen, S., Schotta, G. & Sørensen, C.S., 2013. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic acids research*, 41(5), pp.2797–806.
- Kovrizhnykh, V. V. et al., 2015. “The Key Role of PIN Proteins in Auxin Transport in *Arabidopsis Thaliana* Roots.” *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 5 (3). Pleiades Publishing: 279–85.
- Li, E. & Zhang, Y., 2014. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), p.a019133.
- Li, Y. et al., 2016. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature*, 530(7591), pp.447–52.
- Limin Pi, A. et al., 2015. Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Developmental Cell*, 33, pp.576–588.
- Liu, X. et al., 2015. Long Non-coding RNAs and Their Biological Roles in Plants. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(3), pp.137–147.
- Lodha, M., Marco, C.F. & Timmermans, M.C.P., 2013. The ASYMMETRIC LEAVES complex maintains repression of KNOX homeobox genes via direct recruitment of Polycomb-repressive complex2. *Genes and Development*, 27(6), pp.596–601.
- Merini, W. et al., 2017. The *Arabidopsis* Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) Components AtBMI1A, B, and C Impact Gene Networks throughout All Stages of Plant Development. *Plant physiology*, 173(1), pp.627–641.
- Merini, W. & Calonje, M., 2015. PRC1 is taking the lead in PcG repression. *Plant Journal*, 83(1), pp.110–120.
- Molitor, A. & Shen, W.H., 2013. The Polycomb Complex PRC1: Composition and Function in Plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(5), pp.231–238.
- Mylne, J.S. et al., 2006. LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), pp.5012–5017.
- Pacheco-Escobedo, M.A. et al., 2016. Longitudinal zonation pattern in *Arabidopsis* root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany*, 118(4), pp.763–776.

- Petricka, J.J., Winter, C.M. & Benfey, P.N., 2012. Control of Arabidopsis root development. *Annual review of plant biology*, 63, pp.563–90.
- Petrone, E., 2015. Función del gen *atx1* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pikaard, C.S. et al., 2014. Epigenetic Regulation in Plants *Epigenetic Regulation in Plants*, pp.1–31.
- Rizzardi, K. et al., 2011. TFL2/LHP1 is involved in auxin biosynthesis through positive regulation of YUCCA genes. *Plant Journal*, 65(6), pp.897–906.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A. & Riggs, A.D., 1996. Preface/Front Matter. *Cold Spring Harbor Monograph Archive; Volume 32 (1996): Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*.
- Sabatini, S. et al., 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes & development*, 17(3), pp.354–8.
- Sánchez, M. & Gutierrez, C., 2009. Arabidopsis ORC1 is a PHD-containing H3K4me3 effector that regulates transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), pp.2065–70.
- Sánchez, M. et al., 2015. The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytologist*, 208(3), pp.684–694.
- Schubert, D. et al., 2006. Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO Journal*, 25(19), pp.4638–4649.
- Schuettengruber, B. et al., 2011. Trithorax group proteins: Switching genes on and keeping them active. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(12), pp.799–814.
- Schwartz, Y.B. & Pirrotta, V., 2013. A new world of Polycombs: Unexpected partnerships and emerging functions. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), pp.853–864.
- Sequeira-Mendes, J. et al., 2014. The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *The Plant Cell*, 26(6), pp.2351–2366.
- Simon, J. a & Kingston, R.E., 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(10), pp.697–708.
- Van Speybroeck, L., 2002. From Epigenesis to Epigenetics, The Case of C. H. Waddington. *Annals New York Academy of Sciences*, 981, pp.61–81.
- Takatsuka, H. & Umeda, M., 2015. Epigenetic Control of Cell Division and Cell Differentiation in the Root Apex. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Trievel, R.C., 2004. Structure and function of histone methyltransferases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 14(3), pp.147–69.
- Vakoc, C.R. et al., 2005. Histone H3 Lysine 9 Methylation and HP1 γ Are Associated with Transcription Elongation through Mammalian Chromatin. *Molecular Cell*, 19(3), pp.381–391.
- Vega- León, M. del R., 2016. Estudio de la función antagónica de los factores epigenéticos CLF y ATX1 en *Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Veluchamy, A. et al., 2016. LHP1 Regulates H3K27me3 Spreading and Shapes the Three-Dimensional Conformation of the Arabidopsis Genome. *PLoS ONE*, 11(7), pp.1–25.

- Waddington, C.H., 2012. The epigenotype. 1942. *International journal of epidemiology*, 41(1), pp.10–13.
- Willemsen, V. et al., 2008. The NAC Domain Transcription Factors FEZ and SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in Arabidopsis Root Stem Cells. *Developmental Cell*, 15(6), pp.913–922.
- Wise, A.A., Liu, Z. & Binns, A.N., 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into Agrobacterium. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 343, pp.43–53.
- Wu, C.T. & Morris, J.R., 2001. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science*, 293(5532), pp.1103–1105.
- Xiao, J., Lee, U.S. & Wagner, D., 2016. Tug of war: adding and removing histone lysine methylation in Arabidopsis. *Current opinion in plant biology*, 34, pp.41–53.
- Xiao, J. & Wagner, D., 2015. Polycomb repression in the regulation of growth and development in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 23, pp.15–24.
- Xu, L. & Shen, W. H., 2008. Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis. *Current biology: CB*, 18(24), pp.1966–71.
- Yun, M. et al., 2011. Readers of histone modifications. *Cell research*, 21(4), pp.564–78.
- Zemach, A. et al., 2006. Different domains control the localization and mobility of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 in Arabidopsis nuclei. *The Plant cell*, 18(1), pp.133–45.
- Zeng, W. et al., 2010. HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics*, 5(4), pp.287–92.
- Zhang, T., Cooper, S. & Brockdorff, N., 2015. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO reports*, 16(11), pp.1467–1481.
- Zhang, X. et al., 2007. The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nature structural & molecular biology*, 14(9), pp.869–71.
- Zhou, Y. et al., 2017. H2A monoubiquitination in Arabidopsis thaliana is generally independent of LHP1 and PRC2 activity. *Genome biology*, 18(1), p.69.

Lista de abreviaturas

H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H2AK121ub	Ubiquitinación de la lisina 121 de la histona H2A
H3K36me3	Trimetilación de la lisina 36 de la histona H3
sRNA	small noncoding RNA
lncRNA	long noncoding RNA
PRC2	Polycomb Repressive complex 2
PRC1	Polycomb Repressive complex 1
PcG	Polycomb
TrxG	Tritorax
dps	días pos siembra
SCN	nicho de células troncales
RAM	meristemo apical de la raíz
QC	centro quiescente

Nombre del Primer	Secuencia	Condiciones	Experimento
Plantas transformadas con pLHP1:LHP1:GFP			
JFS-LHP1secF3	GTTATAAACTCGGTTGTGAAAGG		
MP-GW-GFP	CTACCCCGACCACATGAAGC	TM 55°C, 35 ciclos	Genotipado de líneas Wt/pLHP1:LHP1:GFP GFP y primers usados para comprobar GFP en las líneas <i>lhp1-6</i>
LHP1-tDNA-R	CCAACACATGGGAGCCTTTAG		
Lcb1	CCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCC	TM 58°C, 35 ciclos	Genotipado de líneas <i>lhp1-6</i> /pLHP1:LHP1:GFP GFP
jp2-tfl22_MA F	CGGAATGTTGGCTGGAGTTG		
jp2-tfl22_MA R	CAGCCTGAGCGATGTAACCA	TM 55°C, 35 ciclos	Genotipado de líneas <i>tfl2-2</i>

tabla A1. Lista de primers usados en el genotipado de las líneas Wt, *lhp1-6* y *tfl2-2*.

Nombre del Primer	Secuencia	Condiciones	Experimento
Comprobación de clonaciones y recombinaciones			
MP-ATX1cDNA-F	ATGGCGTGTTTTTCTAACGAAACC	TM 55°C, 35 ciclos	Amplificación del fragmento de <i>ATX1</i>
MP-ATX1cDNA-R	GATCTAATAGACTGGACCGCAGAA		
MP-ATX1pcr-F	GGCGGGAGATATGATGATTGAA	TM 55°C, 35 ciclos	Comprobación de la presencia de <i>ATX1</i> en los vectores
MP-ATX1pcr-R	GCATATCCCTAAATGGGAAGA		
CLF-tDNAF	GTCCTGGCGGAAGTAGCAAGT	TM 55°C, 35 ciclos	Comprobación de la presencia de <i>CLF</i> en los vectores
CLF-tDNAR	aATGGCGTCAGAAGCTTCG		
CLF-Sec-F	AACCAAGTGAGGAGAAGGTCAA	TM 55°C, 35 ciclos	Comprobación de la presencia de <i>GFP</i> en los vectores
MP-GW-GFP	CTACCCCGACCACATGAAGC		

tabla A2. Lista de primers usados durante la clonación y recombinación de *ATX1* y *CLF*.

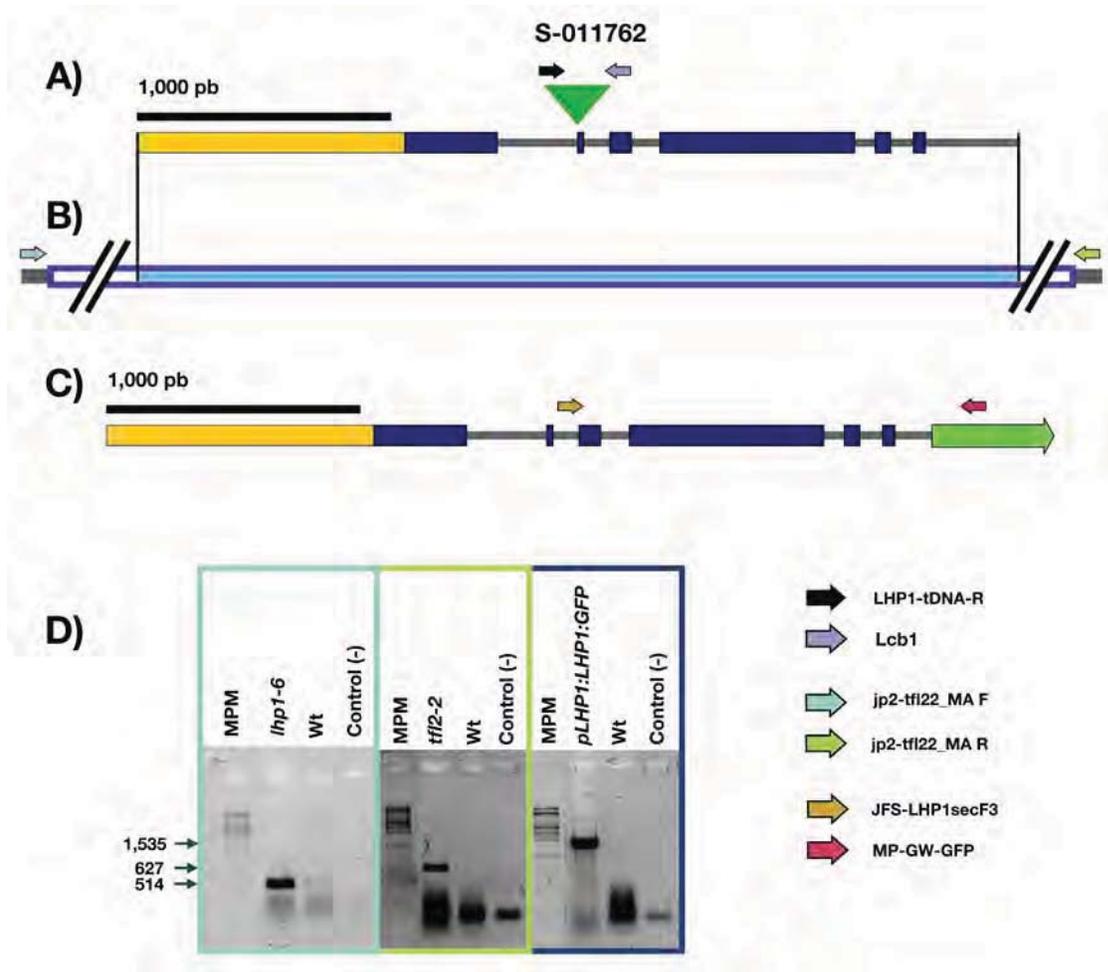
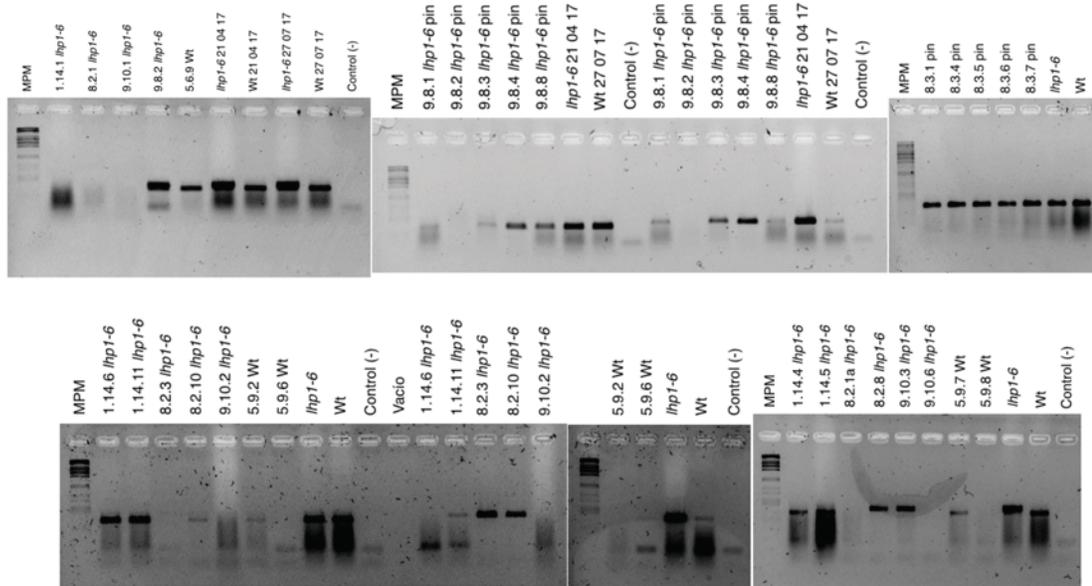


figura A1. Estructura del gen *LHP1* en las mutantes. A) esquema de *lhp1-6* donde se muestra la posición de la inserción de tDNA. Las flechas marcan los primers usados para el genotipado. B) Esquema de *tfl2-2*, donde se muestra la delección, que incluye a *LHP1*. Las flechas marcan los primers usados para el genotipado. C) Esquema del gen *LHP1* con la fusión a GFP, las flechas marcan los primers para el genotipado de las líneas complementadas y de la Wt transformada con la construcción. D) Electroforesis que muestran los fragmentos esperados en cada mutante y la construcción *pLHP1:LHP1:GFP*.

A)

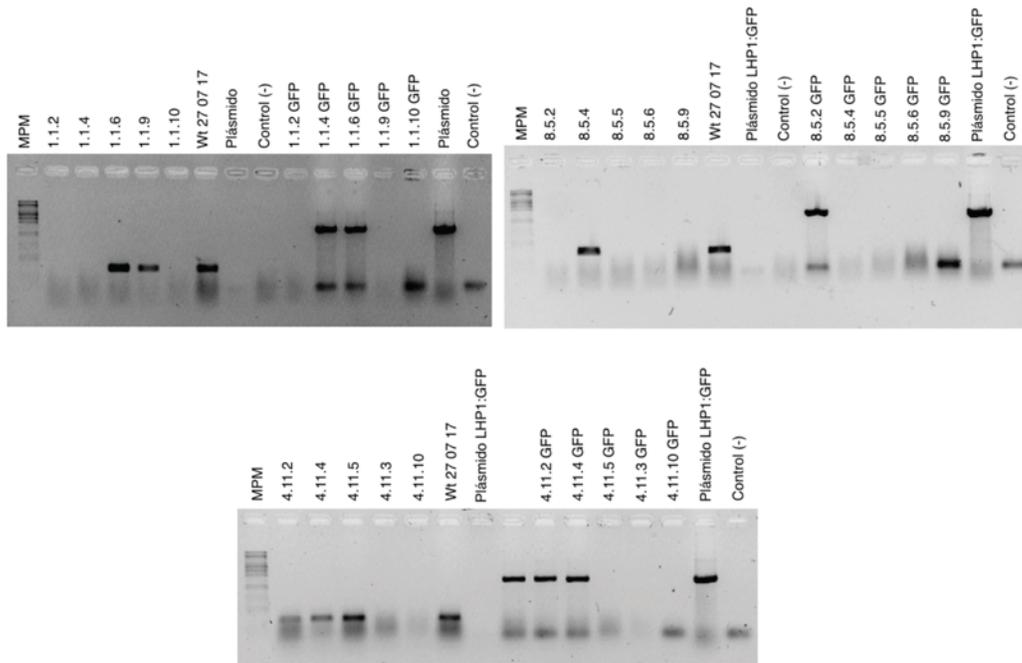


B)

Muestra	Pin	tDNA	Resumen	Observaciones finales
8.2.1	-	-	-	Con tres plantas positivas de 5, la línea se toma como positiva y es candidata para su posterior uso.
8.2.12	-	-	-	
8.2.8	+	+	+	
8.2.3	-	+	+	
8.2.10	+	+	+	
9.8.1	-	+	+	Con tres plantas positivas de 5, la línea se toma como positiva y es candidata para su posterior uso.
9.8.2	-	-	-	
9.8.3	+	+	+	
9.8.4	+	+	+	
9.8.8	+	-	-	
9.10.5	+	+	+	Solo una positiva, se deberán hacer mas extracciones para determinar si se puede usar o no.
9.10.6	-	-	-	
9.10.2	-	-	-	
9.10.1	+	+	+	Datos complementarios, las Línea 9.10 es positiva
9.10.7	+	+	+	
8.3.1	+	-	?	Se concluye que esta línea es positiva
8.3.4	+	-	?	
8.3.5	+	+	+	
8.3.6	+	-	?	
8.3.7	+	-	?	

figura A2. Genotipado de las plantas mutantes complementadas *lhp1-6*. A) Electroforesis de las líneas obtenidas, mostrando la amplificación de *Pin3* para determinar la integridad del DNA y la presencia de la inserción de tDNA, la línea 5.9 corresponde a plantas *Wt/pLHP1:LHP1:GFP*. B) Tabla que muestra el resumen de los resultados obtenidos a partir de las electroforesis.

A)



B)

Muestra	Pin	GFP	Resumen	Observaciones finales
5.9.6	+	N	+	Línea tomada como positiva aun que no se tenga GFP
5.9.7	+	N	+	
5.9.8	-	-	-	
5.9.2	+	N	+	
5.9.16	-	-	-	
1.1.2	-	-	-	Línea tomada como positiva
1.1.4	-	+	+	
1.1.6	+	+	+	
1.1.9	+	-	-	
1.1.10	-	-	-	Línea tomada como positiva
8.5.2	-	+	+	
8.5.4	+	-	+	
8.5.5	-	-	-	
8.5.6	-	-	-	
8.5.9	-	-	-	Línea tomada como positiva
4.11.2	+	+	+	
4.11.4	+	+	+	
4.11.5	+	-	+	
4.11.3	-	-	-	
4.11.10	-	-	-	

figura A3. Genotipado de las plantas Wt/*pLHP1:LHP1:GFP*. A) Electroforesis de las líneas obtenidas, mostrando la amplificación de *Pin3* para determinar la integridad del DNA y la presencia de la GFP. B) Tabla que muestra el resumen de los resultados obtenidos a partir de las electroforesis.

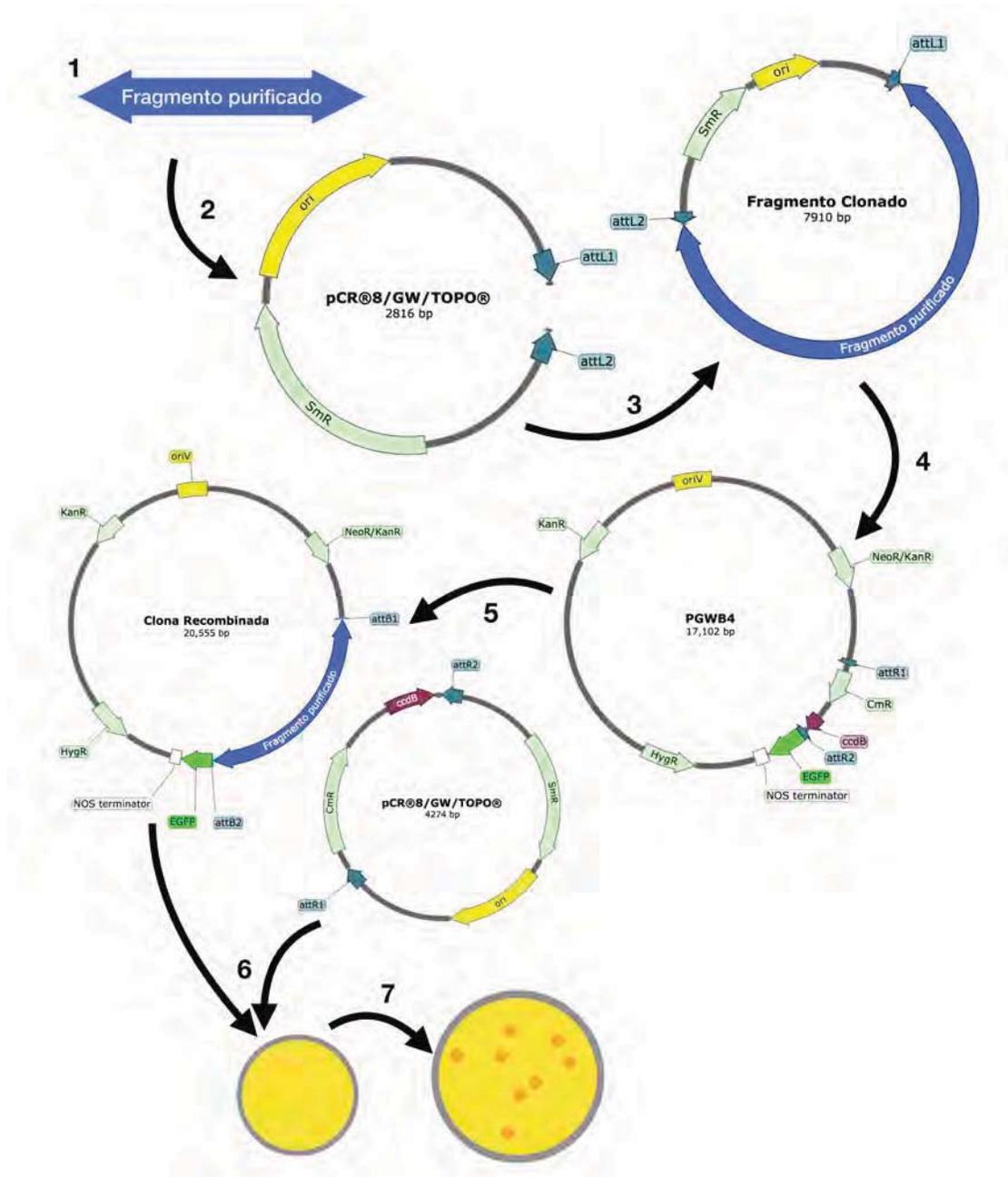


figura A4. Esquema del funcionamiento del sistema GATEWAY. 1. Amplificación del fragmento que se desea clonar. 2. reacción de clonación con el vector pCR™8/GW/TOPO™ que se encuentra abierto. El sitio de clonación está flanqueado por topoisomerasas que impiden que se cierre el vector. Una vez que el fragmento se encuentra en la cercanía del vector, este se inserta en los extremos libres, liberando a las topoisomerasas en el proceso. 3. La reacción se transforma en bacterias *E. coli* DH5α y se seleccionan por resistencia a espectomicina. 4 y 5. el vector con el fragmento deseado es mezclado con el vector de destino, se adiciona una enzima que es capaz de reconocer los sitios attL2/1 y attB1/2 y los intercambia durante la reacción de recombinación. 6. Células normales DH5α se transforman con la reacción de recombinación. 7. Solo crecen colonias que contengan el vector recombinado.

Alignment of Sequence_1: [CorrectaClonaB1-ATX1-PCR8TOPO-Secuenciada] with Sequence_2: [ATX1cDNA.xdna]

Similarity : 3233/3415 (94.67 %)

```

Seq_1 1      GCAATATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAAT 60
Seq_2 1      ----- 0

Seq_1 61      GCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTATGGCGT 120
Seq_2 1      -----ATGGCGT 7

Seq_1 121     GTTTTCTAACGAAACCAGATCGAAATTGATGTCCACGATCTAGTGAAGCTCCGATTTC 180
Seq_2 8      GTTTTCTAACGAAACCAGATCGAAATTGATGTCCACGATCTAGTGAAGCTCCGATTTC 67

Seq_1 181     GCTACGATTCTATTGAGAGTATCTACTCTATTCCCTTCATCGGCATTGTGCTGTGTTAATG 240
Seq_2 68     GCTACGATTCTATTGAGAGTATCTACTCTATTCCCTTCATCGGCATTGTGCTGTGTTAATG 127

Seq_1 241     CCGTTGGTTCACAGTCTGATGTCTAAGAAGGTTAAGGCCAGAAAGCTCCGATGATTG 300
Seq_2 128    CCGTTGGTTCACAGTCTGATGTCTAAGAAGGTTAAGGCCAGAAAGCTCCGATGATTG 187

Seq_1 301     AGCAATTCGAGATTGAAGGTAGCGGTGTTAGTGCTAGTGACGATTGTTGTCGTTCCGGATG 360
Seq_2 188    AGCAATTCGAGATTGAAGGTAGCGGTGTTAGTGCTAGTGACGATTGTTGTCGTTCCGGATG 247

Seq_1 361     ATTATAAGTTGCCGATTACAGCGTCTGAGATTGTTCCGCTCTACTATCGTCGCCGTAAGA 420
Seq_2 248    ATTATAAGTTGCCGATTACAGCGTCTGAGATTGTTCCGCTCTACTATCGTCGCCGTAAGA 307

Seq_1 421     GGCCGCTACGGGAGTGTACTAGATCAGCGGTGGCTGTGAAGACTGAAAGTGTGGAGC 480
Seq_2 308    GGCCGCTACGGGAGTGTACTAGATCAGCGGTGGCTGTGAAGACTGAAAGTGTGGAGC 367

Seq_1 481     TTGATGAAATTGATTGTTTTGAGGAGAAGAAGAGAAGGAAGATTGGTAATTGTGAGTTGG 540
Seq_2 368    TTGATGAAATTGATTGTTTTGAGGAGAAGAAGAGAAGGAAGATTGGTAATTGTGAGTTGG 427

Seq_1 541     TGAATCGGGTATGGAGTCGATTGGTTTAAAGAAGGTGTAAGGAAAACAATGCGTTTAGTG 600
Seq_2 428    TGAATCGGGTATGGAGTCGATTGGTTTAAAGAAGGTGTAAGGAAAACAATGCGTTTAGTG 487

Seq_1 601     GGAATAAGCAAAATGGGTCATCCCGAAGGAAGGGGCTTCTAGCAAGAATCAGGACAAGG 660
Seq_2 488    GGAATAAGCAAAATGGGTCATCCCGAAGGAAGGGGCTTCTAGCAAGAATCAGGACAAGG 547

Seq_1 661     CGACTCTGGCTTCTCGTTCAGCTAAGAAATGGGTCAGGTTGAGTTATGATGGTGTGGATC 720
Seq_2 548    CGACTCTGGCTTCTCGTTCAGCTAAGAAATGGGTCAGGTTGAGTTATGATGGTGTGGATC 607

Seq_1 721     CTACAAGTTTCATAGGGCTGCAATGCAAGGTTTTTTGGCCGCTGGACGCTCTTTGGTATG 780
Seq_2 608    CTACAAGTTTCATAGGGCTGCAATGCAAGGTTTTTTGGCCGCTGGACGCTCTTTGGTATG 667

```

Seq_1	781	AAGGTTCCATTGTTGGATATAGTGCAGAGAGAAAAGCGTTACACTGTCAAATATAGGGATG	840
Seq_2	668	AAGGTTCCATTGTTGGATATAGTGCAGAGAGAAAAGCGTTACACTGTCAAATATAGGGATG	727
Seq_1	841	GATGTGATGAGGATATAGTTTTTGATCGTGAAATGATCAAATTTTTGGTTTCTCGTGAAG	900
Seq_2	728	GATGTGATGAGGATATAGTTTTTGATCGTGAAATGATCAAATTTTTGGTTTCTCGTGAAG	787
Seq_1	901	AGATGGAGCTATTACATCTGAAGTTTGTACTAGTAATGTGACTGTCGATGGCCGTGATT	960
Seq_2	788	AGATGGAGCTATTACATCTGAAGTTTGTACTAGTAATGTGACTGTCGATGGCCGTGATT	847
Seq_1	961	ACGATGAGATGGTTGTATTGGCAGCTACTTTGGACGAATGCCAAGATTTTGAGCCTGGAG	1020
Seq_2	848	ACGATGAGATGGTTGTATTGGCAGCTACTTTGGACGAATGCCAAGATTTTGAGCCTGGAG	907
Seq_1	1021	ACATTGTATGGGCGAAACTAGCTGGTCATGCTATGTGGCCAGCAGTTATTGTAGACGAAT	1080
Seq_2	908	ACATTGTATGGGCGAAACTAGCTGGTCATGCTATGTGGCCAGCAGTTATTGTAGACGAAT	967
Seq_1	1081	CCATTATCGGAGAGCGGAAAGGCTAAACAACAAGGTATCTGGAGGAGGATCACTCTTGG	1140
Seq_2	968	CCATTATCGGAGAGCGGAAAGGCTAAACAACAAGGTATCTGGAGGAGGATCACTCTTGG	1027
Seq_1	1141	TCCAATTTTTTGGAACTCATGATTTTGTCTAGAATAAAAAGTAAAGCAAGCAATCTCATTTA	1200
Seq_2	1028	TCCAATTTTTTGGAACTCATGATTTTGTCTAGAATAAAAAGTAAAGCAAGCAATCTCATTTA	1087
Seq_1	1201	TCAAAGGGCTTCTTTTCGCCATCTCACCTGAAGTGCAAAACAACCTCGGTTTGAAGAGGGCA	1260
Seq_2	1088	TCAAAGGGCTTCTTTTCGCCATCTCACCTGAAGTGCAAAACAACCTCGGTTTGAAGAGGGCA	1147
Seq_1	1261	TGCAGGAAGCAAAAATGTATCTGAAGGCACACAGGCTTCCAGAAGAATGAGTCAACTTC	1320
Seq_2	1148	TGCAGGAAGCAAAAATGTATCTGAAGGCACACAGGCTTCCAGAAGAATGAGTCAACTTC	1207
Seq_1	1321	AAAAGGGAGCTGATTCTGTTGATTCCGATATGGCTAATAGTACAGAAGAGGGAACCTCGG	1380
Seq_2	1208	AAAAGGGAGCTGATTCTGTTGATTCCGATATGGCTAATAGTACAGAAGAGGGAACCTCGG	1267
Seq_1	1381	GTGGTGATCTTCTTAATGATGGAGAAGTGTGGTTGAGACCAACAGAACATGTAGACTTCC	1440
Seq_2	1268	GTGGTGATCTTCTTAATGATGGAGAAGTGTGGTTGAGACCAACAGAACATGTAGACTTCC	1327
Seq_1	1441	GGCATATAATAGGGGATCTGCTAATAATAAATCTTGGAAAGTTGTGACAGACTCTCAGT	1500
Seq_2	1328	GGCATATAATAGGGGATCTGCTAATAATAAATCTTGGAAAGTTGTGACAGACTCTCAGT	1387
Seq_1	1501	TTTTCAAGGATGAGAATCATATTTGGCCTGAAGGTTATACGGCGATGAGAAAGTTCACAT	1560
Seq_2	1388	TTTTCAAGGATGAGAATCATATTTGGCCTGAAGGTTATACGGCGATGAGAAAGTTCACAT	1447
Seq_1	1561	CACTCACAGATCATAGTGCATCTGCCTTGTACAAGATGGAAGTGCTCAGAGATGCCGAGA	1620
Seq_2	1448	CACTCACAGATCATAGTGCATCTGCCTTGTACAAGATGGAAGTGCTCAGAGATGCCGAGA	1507

Seq_1	1621	CAAAGACTCATCCGCTGTTTATAGTGACTGCAGATAGTGGAGAGCAGTTCAAAGGGCCTA	1680
Seq_2	1508	CAAAGACTCATCCGCTGTTTATAGTGACTGCAGATAGTGGAGAGCAGTTCAAAGGGCCTA	1567
Seq_1	1681	CTCCATCGGCCTGCTGGAACAAAATATATAATAGGATAAAAAAGGTCAGAAATCTGACA	1740
Seq_2	1568	CTCCATCGGCCTGCTGGAACAAAATATATAATAGGATAAAAAAGGTCAGAAATCTGACA	1627
Seq_1	1741	GTCTTAATATTTGGGTGAAGAACTAAATGGATCTGGTACAGACATGTTGGTCTCTCCA	1800
Seq_2	1628	GTCTTAATATTTGGGTGAAGAACTAAATGGATCTGGTACAGACATGTTGGTCTCTCCA	1687
Seq_1	1801	ACCCAGAAGTCATTAAACTTGTACAGGATTTATCAAATCCAGACCATCGTCCCATGTTT	1860
Seq_2	1688	ACCCAGAAGTCATTAAACTTGTACAGGATTTATCAAATCCAGACCATCGTCCCATGTTT	1747
Seq_1	1861	CCATGTGCAAAAATAGTTTGGGAAGGCATCAAATCAGCCTACTGGTTACCGACCTGTCC	1920
Seq_2	1748	CCATGTGCAAAAATAGTTTGGGAAGGCATCAAATCAGCCTACTGGTTACCGACCTGTCC	1807
Seq_1	1921	GTGTTGACTGGAAAGATCTCGATAAGTGCAATGCTGCCACATGGATGAGGAGTATGAGA	1980
Seq_2	1808	GTGTTGACTGGAAAGATCTCGATAAGTGCAATGCTGCCACATGGATGAGGAGTATGAGA	1867
Seq_1	1981	ACAATTTGTTCTCTGCAATGTGATAAATGTAGAATGATGGTCCATGTAAATGCTATGGAG	2040
Seq_2	1868	ACAATTTGTTCTCTGCAATGTGATAAATGTAGAATGATGGTCCATGTAAATGCTATGGAG	1927
Seq_1	2041	AGTAGAACCCCTGTGATGGTCTTTGTGGTTATGCAACTTATGTCGTCCTGGTCTCCTG	2100
Seq_2	1928	AGTAGAACCCCTGTGATGGTCTTTGTGGTTATGCAACTTATGTCGTCCTGGTCTCCTG	1987
Seq_1	2101	ATATGCCTCCACGGTGTGTCTTTGTCTGTAGTAGGGGGTGTATGAAGCCGACAACCTG	2160
Seq_2	1988	ATATGCCTCCACGGTGTGTCTTTGTCTGTAGTAGGGGGTGTATGAAGCCGACAACCTG	2047
Seq_1	2161	ATGGTCGCTGGGCTCATCTGGCTTGCTATATGGATCCAGAAACATGTTTATCTGATG	2220
Seq_2	2048	ATGGTCGCTGGGCTCATCTGGCTTGCTATATGGATCCAGAAACA ¹ GTTTATCTGATG	2107
Seq_1	2221	TCAAGAAGATGGAACCTATTGATGGGGTGAATAAAGTCAGCAAGGATCGTTGGAATTAA	2280
Seq_2	2108	TCAAGAAGATGGAACCTATTGATGGGGTGAATAAAGTCAGCAAGGATCGTTGGAATTAA	2167
Seq_1	2281	TGTGCACCATCTGCGGGTATCTTATGGAGCTTGATCCAATGTTCAAACAATTCTTGTC	2340
Seq_2	2168	TGTGCACCATCTGCGGGTATCTTATGGAGCTTGATCCAATGTTCAAACAATTCTTGTC	2227
Seq_1	2341	GCGTGGCATATCATCCACTCTGCGCGCGAGCTGCTGGTCTCTGTGTTGAGCTTGAGAATG	2400
Seq_2	2228	GCGTGGCATATCATCCACTCTGCGCGCGAGCTGCTGGTCTCTGTGTTGAGCTTGAGAATG	2287

Seq_1	2401	ACATGTCAGTGGAGGGTGAAGAAGCAGATCAGTGTATCCGCATGCTTTCATTCGCAAGC	2460
Seq_2	2288	ACATGTCAGTGGAGGGTGAAGAAGCAGATCAGTGTATCCGCATGCTTTCATTCGCAAGC	2347
Seq_1	2461	GACATCGACAACATCAACTGCCTGCCTAGGATCAGAAGACAGGATCAAATCCGCTACTC	2520
Seq_2	2348	GACATCGACAACATCAACTGCCTGCCTAGGATCAGAAGACAGGATCAAATCCGCTACTC	2407
Seq_1	2521	ATAAACTTCTGAGTATCTCCACCACCTAATCCATCTGGCTGTGCTCGGACAGAGCCTT	2580
Seq_2	2408	ATAAACTTCTGAGTATCTCCACCACCTAATCCATCTGGCTGTGCTCGGACAGAGCCTT	2467
Seq_1	2581	ATAATTGTTTTGGCAGAAGAGGGCGAAAGGAACCTGAAGCTCTTGCTGCTGCTTCTTCAA	2640
Seq_2	2468	ATAATTGTTTTGGCAGAAGAGGGCGAAAGGAACCTGAAGCTCTTGCTGCTGCTTCTTCAA	2527
Seq_1	2641	AGCGGTTATTTGTTGAGAATCAGCCATATGTTATTGGTGGTTACTCTAGACTTGAGTTTT	2700
Seq_2	2528	AGCGGTTATTTGTTGAGAATCAGCCATATGTTATTGGTGGTTACTCTAGACTTGAGTTTT	2587
Seq_1	2701	CAACGTACAAAAGCATTACGGATCCAAGGTGTCACAGATGAATACTCCAAGCAACATTC	2760
Seq_2	2588	CAACGTACAAAAGCATTACGGATCCAAGGTGTCACAGATGAATACTCCAAGCAACATTC	2647
Seq_1	2761	TTTCTATGGCTGAGAAATATAGATACATGAGGGAAACATACAGGAAGAGATTAGCATTTG	2820
Seq_2	2648	TTTCTATGGCTGAGAAATATAGATACATGAGGGAAACATACAGGAAGAGATTAGCATTTG	2707
Seq_1	2821	GGAAATCAGGAATTCATGGTTTTGGCATTTTTGCAAAGCTTCCTCACAGGGCGGAGATA	2880
Seq_2	2708	GGAAATCAGGAATTCATGGTTTTGGCATTTTTGCAAAGCTTCCTCACAGGGCGGAGATA	2767
Seq_1	2881	TGATGATTGAATATACCGGAGAACTTGTTAGACCGTCAATAGCTGACAAAAGAGAACAA	2940
Seq_2	2768	TGATGATTGAATATACCGGAGAACTTGTTAGACCGTCAATAGCTGACAAAAGAGAACAA	2827
Seq_1	2941	TCATCTACAATTCAATGGTGGGTGCAGGGACTTACATGTTTAGAATCGATGATGAGCGAG	3000
Seq_2	2828	TCATCTACAATTCAATGGTGGGTGCAGGGACTTACATGTTTAGAATCGATGATGAGCGAG	2887
Seq_1	3001	TCATAGATGCTACAAGGACAGGAAGCATGCTCACCTGATTAATCATTCATGTGTGCCCA	3060
Seq_2	2888	TCATAGATGCTACAAGGACAGGAAGCATGCTCACCTGATTAATCATTCATGTGTGCCCA	2947
Seq_1	3061	ATTGCTATTCTCGAGTCATCACTGTTAATGGAGATGAGCACATTATCATATTCGCAAAGA	3120
Seq_2	2948	ATTGCTATTCTCGAGTCATCACTGTTAATGGAGATGAGCACATTATCATATTCGCAAAGA	3007
Seq_1	3121	GGCATATCCCTAAATGGGAAGAGCTGACCTATGACTATAGGTTCTTTTCAATCGGGGAGC	3180
Seq_2	3008	GGCATATCCCTAAATGGGAAGAGCTGACCTATGACTATAGGTTCTTTTCAATCGGGGAGC	3067
Seq_1	3181	GCCTTTCATGTTTCGTGTGGCTTCCAGGGTGTGAGGTGTTGTTAATGATACAGAAGCTG	3240
Seq_2	3068	GCCTTTCATGTTTCGTGTGGCTTCCAGGGTGTGAGGTGTTGTTAATGATACAGAAGCTG	3127

```

Seq_1 3241 AAGAACAACATGCAAAAATATGTGTTCCCTCGTGTGATCTAATAGACTGGACCGCAGAA- 3299
          |||
Seq_2 3128 AAGAACAACATGCAAAAATATGTGTTCCCTCGTGTGATCTAATAGACTGGACCGCAGAA 3187
          |||

Seq_1 3300 -----AGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTTGTA 3327
          |
Seq_2 3188 AAGCGACTAAAACGTAGTTAGTAACAATCATCCCTTTATAATGTTGTAG-C-TCCTTAT 3245
          |||

Seq_1 3328 CAAAGTTGGCATTATAAAAAATAATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACAT 3387
          |||
Seq_2 3246 AATGAGAGAGCATCTGTGTTTAGTTTGGCCACAATCCATTTTTTTGTACAGATACTAAT 3305
          |||

Seq_1 3388 CAGTCAAAAATAAATCATATGCATCACA----- 3415
          |||
Seq_2 3306 TAGTGAGTAGTAAACTACACGGATCACAGAGTGGTAAAGCAACAGTACAATTCTCTTTT 3365
          |||

```

```

Features [Seq_1]:
ATX1 cDNA : [1 : 3415]

```

```

Features [Seq_2]:
MP_ATX1pcrF : [2757 : 2778]
MP_ATX1pcrR : [3008 : 3029]
ATX1-cDNAF : [1 : 24]
ATX1-cDNA : [3163 : 3186]
STOP : [3187 : 3189]
ATX1-RI genotip : [2791 : 2811]
EP-ATX1pcrF1 : [1412 : 1431]
EP-ATX1pcrR1 : [1546 : 1565]
mut : [2095 : 2095]
ATX1_RV_qF : [2112 : 2132]
ATX1_RV_qR : [2194 : 2214]
MUT3 : [1454 : 1456]
Mut2 : [1354 : 1354]

```

figura A5. Secuencia completa de la *ATX1* en pCR™8/GW/TOPO™, clona B1. En color azul se marca a secuencia problema y en negro la secuencia teórica obtenida en <https://www.arabidopsis.org/>.