



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL USO DEL RNA ANTISENIDO COMO UN METODO PARA INHIBIR LA EXPRESION DEL GEN DEF-1 EN PLANTAS DE



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JUAN MANUEL ESTEVEZ PALMAS

Director: de Tesis: Dra. Patricia León Mejía



MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule.
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
EL USO DEL RNA ANTISENTIDO COMO UN METODO PARA INHIBIR LA EXPRESION DEL GEN
DEF-1 EN PLANTAS DE Arabidopsis thaliana.

realizado por Juan Manuel Estévez Palmas.

con número de cuenta 8608911-1 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Patricia León Mejía.
Propietario
Propietario M. en C. Felipe Cruz García.
Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García.
Suplente Biol. Rosalinda Tapia López.
Suplente M. en C. Victor Manuel Valdes López.

Patricia León Mejía
Felipe Cruz García
Luis Felipe Jiménez García
Rosalinda Tapia López
Victor Manuel Valdes López

FACULTAD DE CIENCIAS
Comité Departamental de Biología
[Firma]
**COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA**

AGRADEDECIMIENTOS:

Agradezco a mis abuelos, la sra. Albertina y al hombre que más admiro al sr. Tereso Estévez Fuentes.

Agradezco a mis padres: Sra. Angela y alSr. Felipe.

Agradezco a mis tíos: el sr. Juan Estévez y al sr. Tomas Estévez.

Agradezco a la Dra. Patricia León Mejía por trabajar en su grupo y por la insistencia de escribir esta tesis.

Agradezco al Dr. Mario Rocha

Agradezco a los revisores de esta tesis:

M. en C. Felipe Cruz García.

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Biol. Rosalinda Tapia Lopez.

M. en C. Victor Valdes López.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Cristina, Ana lilia, Jacquelin, Lupina, Lidia, Lucero, Eida, Eida Patricia, Gabriela, Alejandro, Helena, Berenice, Martha

Agradezco a: Gilberto, Norberto Santillan, Guillermo, Agustín García, Cesar Hernández, Victor, Eduardo, Cristina, Gabriela, Rafael Díaz, Sergio Casas, Ricardo Grande, Gabriela Fuentes, Magdalena, por su amistad y compañerismo.

Agradezco al Sr. Eladio Estévez y a Alejandro por los caballos.

Agradezco a las secretarías Silvia y a la sr. Hernández de servicios escolares de la Facultad de Ciencias.

Agradezco a los que me faltaron, que son muchos.

INDICE:

	Pag.
RESUMEN	2
INTRODUCCION	2
FOTOSINTESIS	2
Plástidos:Cloroplasto	2
Reacciones dependientes de luz (Fase luminosa)	7
Reacciones no dependientes de luz (Fase oscura)	8
PlantasC4 y CAM	10
RNA ANTISENTIDO	11
TRANSFORMACION EN PLANTAS	13
Sistema <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
Vectores para transformación	15
Otros métodos de transformación	16
ANTECEDENTES	18
aislamiento y caracterización de la planta <i>def-1</i> .	
JUSTIFICACION	20
OBJETIVOS	21
Objetivo general.	
Objetivos particulares.	
MATERIAL	22
METODOS	25
RESULTADOS	28
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

Las plantas, algas verdes y algunas bacterias son organismos capaces de utilizar la energía luminosa para convertir el dióxido de carbono a carbohidratos durante la fotosíntesis. En plantas superiores la fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, los cuales se originan a partir de organelos indiferenciados llamados proplástidos. La diferenciación de proplástido a cloroplasto es un proceso altamente complejo, que involucra la expresión de genes tanto del genoma nuclear como del genoma plástidico en respuesta a señales de desarrollo y ambientales. Usando el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* se generó una colección de mutantes en *Arabidopsis thaliana*, de donde una mutante albina recesiva fué seleccionada y denominada *def-1*. Estudios de microscopía electrónica mostraron que esta mutante presenta un desarrollo alterado del cloroplasto. El análisis de la secuencia de aminoácidos del producto codificado por el gen *DEF-1* sugirió que este es transportado al cloroplasto. Aunque la función específica del gen *DEF-1* aún no se conoce, este gen codifica para una proteína nueva conservada en la evolución entre bacterias fotosintéticas y plantas superiores.

Es posible que la proteína DEF-1 pueda jugar un papel importante en el desarrollo del cloroplasto. Por lo que nos interesa hacer estudios en plantas silvestres, inhibiendo la expresión del gen *DEF-1* en diferentes etapas del desarrollo de la planta. La estrategia que se ha planteado utilizar es a través de la tecnología del RNA antisentido bajo la expresión de un promotor inducible por calor, proveniente de *A. thaliana*. Esta tecnología se basa en bloquear o reducir el flujo de información DNA via RNAm a proteína.

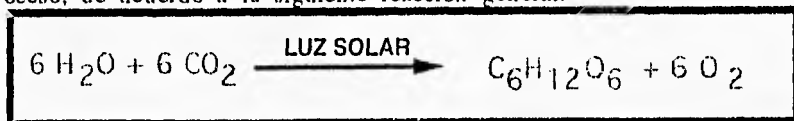
En este trabajo se presenta el análisis de plantas transgénicas que expresan diferentes regiones del cDNA del gen *DEF-1* en antisentido, bajo la expresión de un promotor constitutivo fuerte, el 35S; proveniente del virus del mosaico de la coliflor (CMV). La generación de plantas con las construcciones en antisentido en este trabajo fueron usando el sistema de transformación de raíces in *A. thaliana* (ecotipo RLD). Las plantas transgénicas generadas presentan un rango amplio de fenotipos desde plantas albinas hasta plantas casi verdes. También se observó un patrón variegado en la hoja, el cual comúnmente presentaba en el borde de la hoja un fenotipo albino. El análisis de las plantas generadas con los diferentes antisentidos muestran que regiones cortas de DNA son más efectivas para inhibir la expresión del gen *DEF-1*. Estudios preliminares de microscopía electrónica de los cloroplastos de tejido albino de las plantas transgénicas generadas muestran que los cloroplastos de estas plantas no es normal.

INTRODUCCION

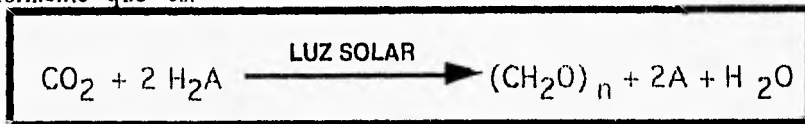
Todas las formas de vida en el universo requieren energía para su crecimiento y mantenimiento. Los organismos como las plantas superiores, las algas y cierto tipo de bacterias capturan la energía de la luz solar y la utilizan para la síntesis de alimento. Los animales obtienen la energía comiendo plantas u otros animales los cuales a veces han comido plantas. Por ende, la última fuente de toda energía metabólica en nuestro planeta es el sol, y la fotosíntesis es esencial para el mantenimiento de toda forma de vida sobre la tierra. (Hall y Rao, 1994).

FOTOSINTESIS

Fotosíntesis literalmente significa "síntesis utilizando luz" (Taiz L. y Zeiger E. 1991). Se ha definido como el proceso mediante el cual la energía luminosa es capturada y convertida en energía química. Desde el punto de vista químico, la vía principal de la fotosíntesis es la conversión de dióxido de carbono a carbohidratos y la liberación de oxígeno como producto final de tal proceso, de acuerdo a la siguiente reacción general:



Sin embargo, debido a que una gran cantidad de las bacterias fotosintéticas (bacterias verdes y púrpuras) llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica (en ausencia de oxígeno) la cual fué descrita inicialmente por Cornelis Van Niel (1935), quien con estudios comparativos percibió un patrón común y propuso una ecuación más general que la descrita anteriormente que es:



Donde H_2O es un reductor general y A su producto oxidado.

PLASTIDOS.

Los plástidos son orgánulos autoreplicables rodeados por una envoltura compredida de una membrana interna y una externa las cuales están separadas por un espacio de alrededor de 10-20 nm. Los plástidos contienen un genoma el cual aparece como fibras en una matriz libre en la región del estroma. El estroma contiene numerosos ribosomas los cuales pueden estar acomodados individualmente o en poliribosomas. Los plástidos son

probablemente el mejor nombrado de todos los orgánulos celulares, por que su nombre indica, la plasticidad tanto de su estructura y su función (Thomson y Whatley, 1980). Estos orgánulos se encuentran solamente en células de los eucariotes fotosintéticos en una variedad de tipos, tamaños, formas y función. Las funciones que adquieren dependen del tipo de célula vegetal en la cual se encuentren. Las diferencias estructurales y funcionales involucran cambios significativos en la expresión genética tanto en el genoma nuclear como en el plástidico.

Los plástidos que se han descrito se han clasificado en:

a) Etioplastos: plástidos que están presentes en las células de cotiledones y en hojas de plantas crecidas en continua oscuridad. Los etioplastos son caracterizados por tener uno o más cuerpos prolamelares cristalinos.

b) Cromoplastos: Plástidos que acumulan pigmento. Estos pueden ser de color rojo, anaranjado y amarillo debido a la presencia de carotenoides. Comúnmente se encuentran en pétalos de flores, frutos y ciertas raíces tales como zanahoria.

c) Amiloplastos: son plástidos que carecen de clorofila y contienen granos de almidón. Los amiloplastos se encuentran en muchos diferentes tipos de células, por ejemplo en tejidos de almacenamiento, cotiledones, endospermo, tubérculos y raíces. En raíces estos organelos parecen estar asociados con geotropismo (Thomson y Whatley, 1980).

d) Elaioplastos: estos plástidos se encuentran donde se sintetizan lípidos.

e) proteinoplastos o proteoplastos: se encuentran donde se sintetizan proteínas

f) Cloroplastos: A continuación se considera en detalle la estructura de los cloroplastos, porque son los organelos donde se llevan a cabo todos los procesos primarios (captación de luz, transferencia de electrones para la síntesis de NADPH y ATP, etc.) y la mayoría de los procesos secundarios (síntesis de compuestos de 3 carbonos fosforilados a partir de la incorporación de CO₂, etc.) de la fotosíntesis. En las plantas superiores, la mayoría de los cloroplastos están localizados en células del mesófilo de las hojas. El número de cloroplastos por célula varía aproximadamente entre 1 y 100 dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento, tales como la luz. Las formas típicas de estos organelos son esféricas, aplanadas o cóncavas. El tamaño aproximado de estos organelos es de 4 a 10 nm de diámetro. En la figura #1 se muestra la estructura de los cloroplastos. Estos constan de una membrana externa y una membrana interna separadas por un espacio intermembranal. Proyecciones de la membrana interna forman unas estructuras a manera de sacos aplanados llamados tilacoides, una pila de estos sacos constituyen lo que se conoce como grana. Los diferentes granas están conectados por regiones membranosas llamadas lamelas del estroma.

La membrana interna rodea al estroma el cual se encuentran las enzimas requeridas en el ciclo de Calvin.

Las membranas tilacoideas contienen la maquinaria transductora de energía: las proteínas captadoras de luz (clorofilas, etc.), los centros de reacción, las cadenas de transporte electrónico y la ATP sintetasa (Stryer, 1988).

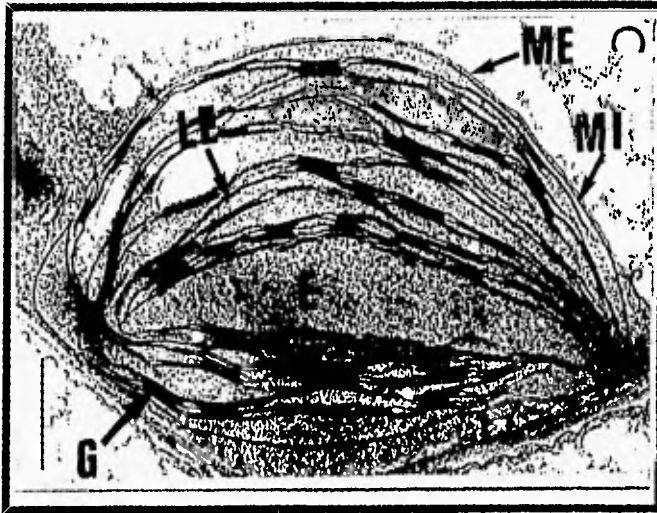


Figura #1. Esta figura muestra un cloroplasto silvestre de *A. thaliana*. ME, membrana externa; MI, membrana interna; LE, lamela del estroma; E, estroma; G, grana.

El genoma cloroplástico en plantas es una moléculas de DNA de cadena doble y circular. Este genoma contiene una gran cantidad de adeninas y timinas alrededor de un 61-64 %, lo cual sugiere un alto contenido de secuencias no codificantes. El DNA cloroplástico no está asociado a histonas y tiene un tamaño variable; por ejemplo, en algas de 81 a 275 kb, en plantas monocotiledonias de 111 a 182 kb, y en plantas dicotiledonias de 117 a 165 kb (Lawlor, 1993). La variación principal del tamaño se debe a la presencia o ausencia de secuencias repetidas invertidas del genoma. En la mayoría de las plantas superiores la secuencia invertida repetida es 22 a 26 kb, dentro de la cual se localizan los genes para los RNA ribosomales. En plantas tales como chicharo y frijol el DNA cloroplástico carece de esta secuencia invertida repetida. Los cloroplastos son altamente poliploides, por ejemplo en trigo tiene más de 300 copias de DNA por cloroplasto. La cantidad de DNA por cloroplasto además de variar con la especie, varía con el estado de desarrollo de la hoja y del estado de desarrollo del cloroplasto.

En la actualidad se tiene la secuencia completa del DNA plastídico de tabaco y la caracterización de muchos sus genes. Los genes de estos orgánulos se ha clasificado en tres categorías:

1) genes que están involucrados en el procesamiento de la información genética, estos genes codifican para tres subunidades de la RNA polimerasa cloroplástica, RNAs ribosomales, tRNAs, proteínas ribosomales y proteínas que participan en la traducción.

2) genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis, por ejemplo la subunidad grande de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) y varias subunidades de cada complejo proteico involucrado en el transporte de electrones. (Fotosistema I y II, complejo citocromo y ATP sintetasa).

3) genes para un complejo NADH oxireductasa y 18 marcos de lectura abiertos de función no conocida (Dennis *et al.*, 1993).

El desarrollo de los plástidos es a partir de unas estructuras incoloras relativamente indiferenciadas llamadas proplástidos los cuales se encuentran en raíz, en meristemas, en embriones, en endospermo y en hojas jóvenes. La diferenciación de estos organelos es un proceso complejo, que involucra expresión coordinada de genes tanto del genoma nuclear como del genoma plastídico en respuesta a señales de desarrollo y ambientales. (Mullet, 1988; Taylor, 1889). Thomson, (1980) ha propuesto un modelo para el desarrollo del cloroplasto (Figura # 2).

PIGMENTOS FOTOSINTETICOS

La fotosíntesis empieza con la absorción de la luz por moléculas especializadas llamadas pigmentos fotosintéticos y por ende se desencadena una serie de reacciones que finalmente conducen a la formación de nuevas fuentes de carbono. Los pigmentos fotosintéticos capturan la luz en paquetes de energía conocidos como cuantos. En plantas y algas los principales pigmentos en la captación de luz son las clorofilas y en bacterias fotosintéticas son las bacterioclorofilas. Otras moléculas como los carotenoides y las ficobilinas son conocidos como pigmentos accesorios, puesto que la energía de luz absorbida puede ser transferido a clorofilas. Las clorofilas, los carotenoides y ficobilinas absorben luz entre el violeta y parte del rojo del espectro visible (400 a 700 nm). Por otro lado la bacterioclorofilas tiene picos máximos de absorbancia en el infrarrojo del espectro electromagnético de radiación. Los pigmentos absorben en diferentes partes del espectro y su combinación hace posible que un organismo pueda absorber luz de diferentes longitudes de onda. En la tabla #1, se observa que los organismos fotosintéticos contienen más de un tipo de pigmento, cada uno con una función específica.

Químicamente todas las clorofilas son caracterizadas por un anillo de porfirina. El núcleo polar de la porfirina esta compuesto de un anillo

tetrapirrólico y un átomo de magnesio, donde el átomo de magnesio ubicado en el centro del anillo esta unido a cuatro átomos de nitrógeno de los anillos pirroles. Solamente la clorofila a y b tienen fitol (un terpenoide lipofílico de cadena larga), unido al anillo de porfirina (Dennis y Turpin, 1993). La clorofila a y b difieren en un grupo sustituyente del anillo II de la porfirina, la clorofila a tiene un grupo metilo (-CH₃) mientras que la clorofila b tiene un grupo formilo (-CHO).

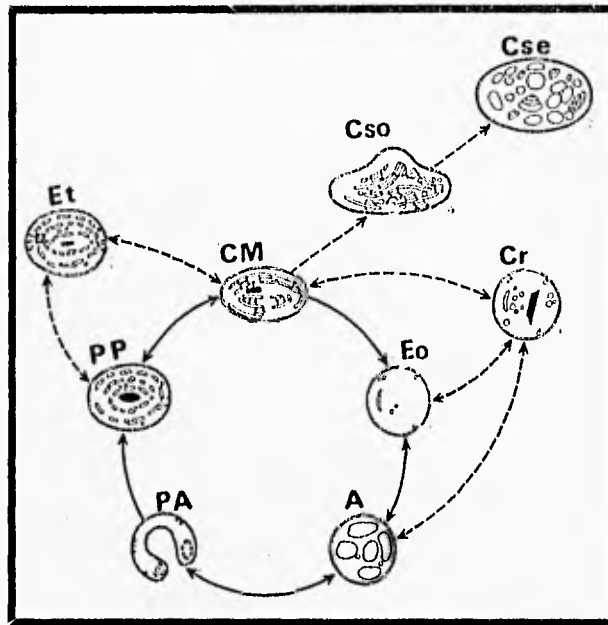


Figura #2. Modelo del desarrollo del cloroplasto. Estadios del desarrollo del cloroplasto: (1) Eo, Eoplasto; (2) A, amiloplasto; (3) PA, plástido ameboide; (4) PP, plástido pregranala; (5) CM, cloroplasto maduro, y vías interrelacionadas con el desarrollo del mismo, Et, etioplasto; Cr, cromoplasto. Cso, Cloroplasto seneciendo; Cse, Cloroplasto seneciente (tomado de Thomson y Whatley, 1980)

ORGANISMO	CLOROFILAS				BACTERIOCLOROFILAS					CAROTENOIDES	FICOBILIPROTEÍNAS		
	a	b	c	d	a	b	c	d	e			g	
EUCARIONTES													
Musgos, Helechos y plantas con semillas	+	+	-	-							+	-	
Algas verdes	+	+	-	-							+	-	
Euglenidos	+	+	-	-							+	-	
Diatomeas	+	-	+	-							+	-	
Dinoflagelados	+	-	+	-							+	-	
Algas cafés	+	-	+	-							+	-	
Algas rojas	+	-	+	+							+	-	
PROCARIONTES													
Cianobacteria	+	-	-	-							+	+	
Proclorofitas	+	+	-	-							+	-	
Bacteria púrpura sulfurosa					+	ó	+	-	-	-	-	+	-
Bacteria púrpura no sulfurosa					+	ó	+	-	-	-	-	+	-
Bacteria verde					+	-	+	ó	+	ó	+	-	-
Heliobacteria					-	-	-	-	-	-	+	+	-

Tabla #1. Distribución de clorofilas y otros pigmentos fotosintéticos. + indica presencia y - ausencia de pigmentos.

FASES DE LA FOTOSÍNTESIS

En 1905 el fisiólogo vegetal Blackman propuso que la fotosíntesis es un mecanismo de dos pasos, un primer paso que involucra reacciones fotoquímicas y un segundo paso que involucra reacciones no fotoquímicas. A partir de entonces la fotosíntesis se ha dividido en dos fases:

1- REACCIONES DEPENDIENTES DE LUZ (FASE LUMINOSA):

En la fotosíntesis denominada oxigénica (llevada a cabo en presencia de oxígeno) los eventos bioquímicos de las reacciones luminosas dan como resultado la formación de un agente reductor fuerte (NADPH₂), la generación de O₂ como producto de la ruptura del H₂O y la formación de ATP (figura#3). Este último está acoplado al flujo de electrones de H₂O y NADP⁺ a través de una cadena de transportadores de electrones localizado en la membrana del tilacoide. Los electrones son transferidos de un potencial redox suficientemente positivo para oxidar agua a un potencial redox suficientemente negativo para reducir NADP⁺. La hidrólisis del H₂O

produce H^+ y O_2 dentro del espacio tilacoidal. El transporte de electrones del Fotosistema II al Fotosistema I también ayuda a la formación de un gradiente de protones, por involucrar la molécula de plastoquinona (Q) y citocromos en el proceso. El Fotosistema I reduce $NADP^+$, usando H^+ en el estroma para producir NADPH. Como resultado, el pH del espacio tilacoidal es más bajo que el pH del estroma, llega ser tan bajo como pH 4.0 (Campbell, 1991). La formación de ATP es dirigida por una fuerza promotriz, es decir, cuando la concentración de H^+ es mas grande en el espacio tilacoidal que en el estroma (debido a la reducción del $NADP^+$), los protones tienen a salir, a través de un complejo proteico llamado ATP-sintetasa, la cual lleva la catálisis de ATP a partir de $ADP + P_i$.

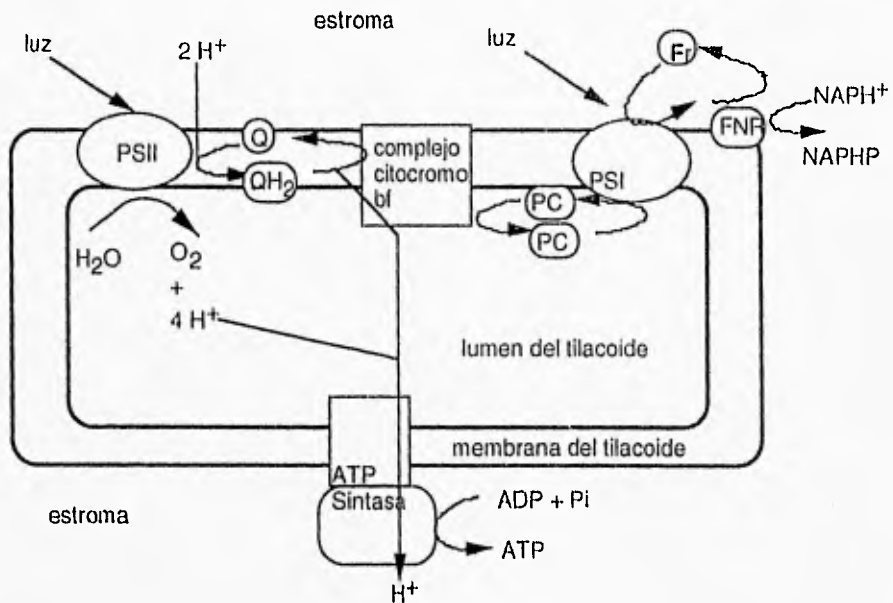


Figura 3. Resumen de las reacciones dependientes de luz que ocurren en el tilacoide. PS II, fotosistema II (absorbe longitudes de onda de 680 nm); PS I, fotosistema I (absorbe longitudes de onda de 700 nm); PC, plastocianina; Q, plastoquinona; QH_2 , plastoquinol (plastoquinona reducida); Fr, ferredoxina; FNR, ferredoxina $NADP^+$ oxidoreductasa.

2-REACCIONES NO DEPENDIENTES DE LUZ (FASE OSCURA).

La función de las reacciones no dependientes de luz es la fijación del dióxido de carbono atmosférico a una molécula aceptora para la formación de carbohidratos (u otros componentes). La formación de los hidratos de

carbono y la regeneración de la molécula aceptora, se da mediante una serie de reacciones cíclicas conocidas como ciclo de Calvin, en el cual se utiliza el ATP y el NADPH generados en las reacciones dependientes de luz, (ver figura #4A):

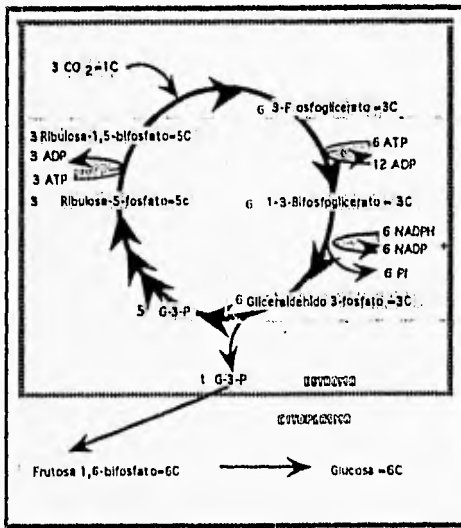
Según Hall y Rao (1994), la fijación del CO₂ hasta la formación de carbohidratos se puede considerar que se lleva en cuatro fases (figura #4 B).

1.- FASE DE CARBOXILACION: Esta fase consiste en adición de CO₂ en el segundo carbono de la ribulosa bifosfato (azúcar de 5 carbonos), para formar dos moléculas de ácido fosfoglicérico (AFG) compuesto de tres carbonos. La reacción es catalizada por la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO).

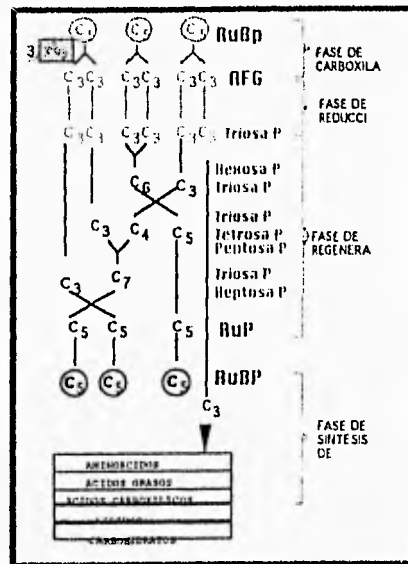
2.- FASE DE REDUCCION: Esta fase el ácido fosfoglicérico (AFG) es convertido en triosas fosfato. Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos: primero a partir de AFG se genera 1-3 difosfoglicerato, catalizada por la enzima fosfoglicerato kinasa, la cual utiliza ATP generado en las reacciones de la fase luminosa. El segundo paso es la producción de gliceraldehído 3-fosfato (G3F), a partir de 1-3 difosfoglicerato, catalizado por la enzima gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, dependiente de NADPH₂.

3.- FASE DE REGENERACION: En esta fase la molécula aceptora RuBP es regenerada a partir de las moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, mediante una serie de reacciones que involucran la formación de azúcares fosfatados de 3-, 4-, 5-, 6- y 7 carbonos.

4.- FASE DE SINTESIS DE PRODUCTOS: De las seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (G3F), producidos en la fase de reducción, 5 son usadas para la regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato. Mientras que una molécula de gliceraldehído 3-fosfato (G3F) y una molécula de DHAP pueden ser combinadas vía la enzima fructosa bifosfato aldosa, para producir fructosa-1,6 bifosfato. Esta fructosa-1,6 bifosfato es desfosforilado producir fructosa-6-fosfato (F6F) e isomerizada a glucosa-6-fosfato (G6F) y finalmente a glucosa-1-fosfato (G1F). La glucosa-1-fosfato es un precursor para la formación de polisacáridos de almacenamiento (Mathews, *et al.* 1990). Cabe mencionar que lípidos, ácidos grasos, aminoácidos y ácidos carboxílicos se ha demostrado que son sintetizados durante la fijación fotosintética de CO₂.



A



B

Figura 4. A muestra el esquema del ciclo de Kalvin, B muestra las cuatro fases de las reacciones no dependientes de luz.

PLANTAS C₄:

El proceso descrito en la sección anterior se conoce como fotosíntesis tipo C₃, debido a la formación de dos moléculas de 3 carbonos durante la asimilación inicial de dióxido carbono.

Otro tipo de fotosíntesis es la que se conoce como C₄. Las plantas que la presentan son típicas de regiones tropicales y semiaridas, tal es el caso de la caña de azúcar y maíz. En plantas C₄ la ultraestructura de las hojas es muy característica. En un corte transversal de las hojas de estas plantas se observa una extensa vascularización, con un anillo de células llamadas células del parenquima vascular rodeando cada vena y un anillo exterior de células denominadas como células del mesófilo, rodeando las células del parenquima vascular. Este arreglo anatómico se conoce como anatomía Kranz. La fijación del CO₂ en estas plantas es en dos pasos. Inicialmente, el CO₂ atmosférico es fijado en el citosol de las células del mesófilo por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) para formar una molécula de ácido dicarboxílico (oxalacetato), de cuatro carbonos (de aquí el nombre C₄). En algunas especies el oxalacetato se convierte en malato por medio de la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺. El malato se desplaza hacia las células del parenquima vascular donde se descarboxila dentro de los cloroplastos por medio de una enzima málico dependiente de NADP⁺. El

CO₂ liberado entra al Ciclo de Calvin por la reacción habitual presentado en C₃. El piruvato formado en esta reacción de descarboxilación retorna a las células del mesófilo. Por último se genera el fosfoenolpiruvato a partir de piruvato, por una reacción llevada a cabo por la enzima piruvato-Pi-diquinasa. (Stryer, 1988).

PLANTAS CAM (Metabolismo ácido de las Crasuláceas).

Estas plantas son características de regiones desérticas. Los estomas están abiertos de noche y la difusión del CO₂ atmosférico hacia los tejidos de la planta es, por tanto, exclusivamente nocturna. En estas plantas tanto la PEP carboxilasa y rubisco están presentes en todas las células que contienen cloroplastos. Las actividades de estas enzimas son reguladas en tiempo, mas que en espacio. La PEP carboxilasa es mas activa en la oscuridad, pero menos activa en la luz, mientras que la rubisco es activa unicamente en la luz. Por tanto, la fijación del CO₂ durante la noche llega hasta la formación de ácido málico y durante el día el CO₂ es incorporado al ciclo de Calvin (Dennis, *et al.*, 1990). Los eventos de carboxilación y descaboxilación de plantas C₄ y CAM son similares, pero ellos operan bajo diferentes principios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos.

RNA ANTISENTIDO

El término "RNA antisentido" en un contexto general ha sido definido como el RNA que interfiere con la expresión de otro RNA (Eguchi *et al.*, 1991). Los genes que sintetizan los RNA antisentido son designados como genes antisentidos (Green *et al.*, 1986). Los RNA antisentidos contienen una secuencia que es complementaria a RNAm de un gen blanco, y la unión de los dos RNAs puede ocurrir por apareamiento de bases, formando un duplex de RNA: RNAm afectando la expresión del gen blanco (Green, *et al.*, 1986).

Las interacciones RNA:RNA han mostrado un papel clave en roles tanto estructurales como enzimáticos en varios aspectos celulares, incluyendo la transcripción, la traducción, el procesamiento del RNA y la regulación de la replicación del DNA (Eguchi *et al.*, 1991). La regulación por antisentido fué primero descubierta durante estudios de replicación de el plásmido ColEI de *Escherichia coli*. Subsecuentemente, muchos otros ejemplos de regulación por RNA antisentido han sido observado especialmente en procariotes como son: transposición de Tn 10, la expresión de porinas, la regulación de la reproducción de fagos y autoregulación de la síntesis proteica del receptor de cAMP (Eguchi *et al.*, 1991 y Green *et al.*, 1986). En eucariotes la existencia de regulación por RNA antisentido de forma natural aún no ha sido demostrada (Green *et al.*, 1986). Sin embargo, se ha observado que células eucarióticas

contienen RNAs los cuales son complementarios a porciones de RNAs mensajeros conocidos (Van der Krol *et al.*, 1988). En trabajos hechos por Klaper *et al.*, 1989 reporta la presencia de RNAs complementarios a RNAm de la dihidrofolato timidilato-reductasa del parásito leishmania. Tosic *et al.*, 1990 ha reportado RNAs complementarios a el gen de la proteína básica mielina. Para el caso de plantas se dispone solamente de una evidencia circunstancial la presencia de que ocurra RNA antisentido de forma natural (Mol *et al.*, 1990).

La capacidad del RNA antisentido para inhibir la expresión de un gen específico de manera natural, ha conducido al desarrollo de estrategias para regular la expresión artificialmente de genes. El RNA antisentido complementario a un RNAm de un gen blanco se puede sintetizar *in vivo* y puede ser usado para inhibir la expresión del gen blanco. El uso del RNA antisentido se ha incrementado para el estudio de regulación genética y para conocer funciones de genes tanto en sistemas procarióticos como eucarióticos. Izant y Weintraub (1984), fueron los primeros en demostrar en células eucarióticas la inhibición de la expresión con construcciones en antisentido. En plantas el primer reporte de regulación de la expresión genética por RNA antisentido artificial, fué hecho por Ecker y Davis (1986); ellos reportan la inhibición transitoria de la actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en protoplastos de zanahoria por co-introducción de genes CAT en sentido y antisentido. También se ha demostrado inhibición genética estable y heredable, como el caso de la inhibición de la expresión del gene de la nopalina sintetasa (nos), en plantas de tabaco transformadas con construcciones en sentido y antisentido (Rothstein *et al.*, 1987).

Se ha estudiado el efecto de diferentes regiones de un gen en antisentido. Sandler *et al.*, (1988), reportaron que la región 3' del gen de la enzima nopalina sintetasa fué la más efectiva para tener los más altos niveles de inhibición en la actividad de la enzima. En otros casos como el reportado por Cannon *et al.*, (1990), han demostrado que con una secuencia de 41 pares de bases de la región 5' (incluye el codón de inicio la traducción) del gen de GUS (enzima β -glucoronidasa) en plantas transgénicas de *Nicotiana glauca*, es posible inhibir eficientemente la actividad de la enzima.

La tecnología del RNA antisentido ha sido aplicada para generar plantas transgénicas con reducidos niveles de enzimas claves en la fotosíntesis tanto C₃ como C₄. (Furbank y Taylor, 1995). El primer antisentido hecho en fotosíntesis, fue reportado por Rodermel *et al.* (1988), quien transformó plantas de tabaco con la secuencia completa del gen de la subunidad pequeña de rubisco en antisentido, usando un promotor constitutivo. A partir de entonces se ha incrementado el uso del RNA antisentido para inhibir o reducir la expresión de enzimas fotosintéticas, tales como la rubisco activasa (Mate *et al.*, 1983), la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Kosmann, *et al.*, 1994), gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (Price, *et al.*, 1995) fosforibulocinasa

(PRK) y la anhidrasa carbónica (Price, *et al.*, 1994). Recientemente proteínas de membrana, tales como el translocador de Pi (fosfato inorgánico) (Riesmeier, *et al.*, 1993) y proteínas de la membrana del tilacoide, como ATPasa (Price, *et al.*, 1995), y un polipéptido de 10 kD del fotosistema II han también sido manipulados por la estrategia del RNA antisentido (Stockhaus, *et al.*, 1990).

Aunque se asume que la inhibición de la expresión genética por antisentido, es debido a la formación de un duplex de RNA, aún no se conocen bien los procesos posteriores a la formación del duplex. Existen evidencias que sugieren que la inhibición de la expresión genética es debido a que no se lleva a cabo la traducción del RNAm, estas son: En muchos casos el RNA antisentido que abarca la región del inicio de la traducción de un gen, es la región más efectiva en bloquear la expresión genética, como en *E. coli* (Colman, *et al.*, 1985) y en huevos de *Xenopus laevis* (Melton, D. 1985), (en este último caso los huevos fueron microinyectados con RNA antisentido), sugirió que los ribosomas no se unen por el supuesto RNA duplex. Otra evidencia que se presentó en cultivos de células de mamíferos, es que el RNA duplex formado en el núcleo no fue transportado al citoplasma (Kim and Wold, 1985). Una tercera evidencia es la encontrada en *Dyctyostelium* donde el RNA duplex formado en el núcleo fue altamente inestable y rápidamente degradado (Crowly *et al.*, 1985).

TRANSFORMACION EN PLANTAS

Para estudios de regulación genética, ha sido de mucha importancia la generación de organismos transgénicos, esto se ha logrado mediante métodos de transferencia de genes. Estos métodos hacen factible la introducción de DNA a células vegetales y a través de ellos se ha podido hacer transformación estable (es decir, que el gen o genes introducidos a un organismo se incorpora a su genoma) y transformación transitoria (el gen o los genes introducidos no se incorporan al genoma del organismo).

Existen dos sistemas de transferencia de DNA a las células vegetales:

- a) transferencia mediada por patógenos del género *Agrobacterium* y virus.
- b) transferencia directa de genes.

TRANSFORMACION DE CELULAS VEGETALES MEDIANTE *A. tumefaciens*.

A. tumefaciens es una bacteria gram negativa que vive en el suelo. En la naturaleza esta bacteria infecta a la mayoría plantas dicotiledoneas. La infección en la forma natural se da en zonas heridas de la planta, provocando un crecimiento desordenado y la dediferenciación de las células en la región afectada, que da como resultado la formación de un tumor. Esta enfermedad es conocida como la agalla del cuello. La respuesta patogénica en

la planta es el resultado de la expresión de ciertos genes transferidos de la bacteria hacia el genoma vegetal.

La capacidad de transformación de las células vegetales se debe a la presencia de un plásmido que contiene la bacteria, llamado plásmido Ti (por inductor de tumores) de un tamaño de alrededor de 200 kb. Este plásmido tiene dos regiones involucradas en la formación de los tumores, la que constituye el segmento de DNA, que se transfiere al genoma vegetal, llamado el T-DNA y la región *vir*. El T-DNA esta delimitado por dos secuencias directas repetidas (de aproximadamente 25 bp) llamadas borde izquierdo y borde derecho, también contiene genes que codifican para factores de crecimiento vegetales, como son auxina y citoquininas. La sobreproducción de estos factores da como resultado un proliferación celular neoplásica y la formación del tumor. La región *vir* es de aproximadamente 40 kb e incluye 8 operones llamados *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*. Los genes de estos operones codifican para enzimas relacionadas con la excisión, la transferencia y probablemente para la integración del T-DNA al genoma de la célula vegetal. Por otra parte, en el genoma de la bacteria contiene los genes denominados *chv* (*chvA* y *chvB*), los cuales estan involucrados en la adhesión del *A. tumefaciens* a la pared de las células vegetales. EL gen *chvB* codifica para una proteína involucrada en la formación de un β -1,2 glucano ciclico, mientras que el gene *chvA* codifica para una proteína de transporte localizada en la superficie de la membrana que es necesaria para el transporte del β -1,2 glucano dentro del periplasma

La interacción entre la bacteria y la célula vegetal muy probablemente es a través de receptores específicos, localizados tanto en la planta como en la bacteria. Cuando una planta ha una sufrido herida, esta secreta exudados, compuestos fenólicos tales como acetosyringona (4-acetil,2,6-dimetoxifenol) y α -hidroxiacetosyringona, que son reconocidos por los productos de los genes *virA* y *virG*. Estos a su vez actúan como activadores de la transcripción del resto de los genes *vir*. El gen *virD* codifica una endonucleasa que corta en el borde derecho del T-DNA. A partir de este extremo se genera unidireccionalmente una hebra monocatenaria del T-DNA. Esta se transporta al interior de la célula vegetal, por un mecanismo que aparentemente es análogo a la conjugación en bacterias. El T-DNA transferido va recubierto de proteínas que se unen a DNA de la cadena sencilla, estas son las proteínas codificadas por el gen *virE2*, lleva covalentemente en su extremo 5' la proteína *virD2*; la cual probablemente funciona como un "piloto", dirigiendo el complejo DNA-proteína (complejo T) hacia el núcleo de la célula vegetal, sitio donde se integra el T-DNA en el genoma nuclear de la célula vegetal. Sin embargo existe un reporte de T-DNA integrado en el genoma cloroplástico. Se ha observado que la inserción del T-DNA en el genoma nuclear parece ser azarosa en una o más copias. No se ha observado que se requiera una secuencia nucleotídica específica, no obstante los sitios donde se inserta el T-DNA en el genoma nuclear son ricos en adenina y timinas.

VECTORES DE TRANSFORMACION.

A partir de la información descrita en la sección anterior se sabe que el T-DNA y no otras partes del plásmido Ti se integra al genoma de la planta, que el sistema de transferencia está determinado por los genes *vir* y genes *chl*, y que las secuencias directas repetidas de los bordes izquierdo y derecho son las únicas secuencias esenciales para transferir el T-DNA, se han desarrollado dos sistemas de vectores para la transformación de plantas utilizando el T-DNA estos son:

1- Vectores cointegrados o sistema *cis* en el cual nuevos genes son introducidos vía recombinación homóloga dentro de un T-DNA modificado presente en el Plásmido Ti.

Los vectores cointegrados son construidos a partir de un plásmido Ti, al cual se le ha deletado en el T-DNA los genes implicados en la biosíntesis de hormonas, sustituyendo por el vector bacteriano pBR322. El T-DNA en estos plásmidos modificado como es el pGV3850, solo conserva los bordes del T-DNA original y el gen de la nopalina sintetasa (*nos*), que se emplea como marcador para identificar células que adquieren el T-DNA. La inserción del pBR322 en la región T-DNA de este vector, crea un segmento de homología para que se pueda dar la cointegración (por recombinación homóloga) de cualquier vehículo derivado del pBR322 que porte el DNA de interés (vector intermediario cointegrado). De esta forma, la información genética que se desea transferir a la plantas queda convenientemente situada entre los bordes del T-DNA. Para movilizar los vectores intermedios de *E. coli* a la cepa de *A. tumefaciens* que lleva el pGV3850, se usa un sistema de conjugación bacteriana. Puesto que los vectores relacionados con el plásmido pBR322 no pueden replicarse en *A. tumefaciens* y solamente se establecen en las bacterias se se recombinan con el plásmido Ti, los exconjugantes que contienen cointegrados pueden aislarse fácilmente seleccionando para la resistencia a un antibiótico presente en el vector intermediario, pero ausente en el plásmido Ti.

2-. Sistema binario. Este sistema derivó de la observación de que el T-DNA no requiere estar físicamente unido a la región *vir* del plásmido Ti para ser transferido eficientemente a las plantas. El sistema binario consta de dos elementos: Primero un plásmido Ti auxiliar del que se ha eliminado el T-DNA y el cual porta los genes de la región *vir*, los cuales actúan en *trans* sobre el otro elemento. El segundo elemento, es una amplia gama de vectores de clonación que lleva genes marcadores de selección para bacterias y una región flanqueada por los bordes derecho e izquierdo del T-DNA dispuestos en la polaridad adecuada. Dentro de esta región se encuentran genes de selección para plantas y un región de clonación múltiple (polylinker) en cual se clonan los genes que se desean insertar en el genoma de la planta.

El sistema de vectores binarios posee varias ventajas sobre el de los vectores cointegrados. Una de ellas, tal vez la más importante, es la elevada

eficiencia con que se introducen en *A. tumefaciens* los plásmidos con las construcciones de interés, lo que contrasta con la baja eficiencia de formación de cointegrados. Otra conveniencia, es que permite construir plásmidos de tamaño relativamente pequeños facilitando las manipulaciones previas al proceso de transferencia a las células vegetales.

TRANSFORMACION DIRECTA DE DNA:

A través de los años, se han desarrollado diferentes técnicas para la introducción de DNA de forma directa. Esto es principalmente, debido a la baja susceptibilidad de las plantas monocotiledóneas de ser infectadas por el genero *Agrobacterium*. El común denominador de las técnicas de transferencia directa, es que prescinden de vectores biológicos (virus, *Agrobacterium*) para introducir información genética exógena a la células vegetales. Esto se logra por medio de vías químicas o físicas. Estas técnicas permiten la transformación de plantas tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas y el uso de cualquier vector utilizable en sistemas vegetales. Entre las técnicas desarrolladas para la transferencia directa de DNA destacan los siguientes:

Transformación Química

Se trata de un método a través de la co-incubación del DNA con la presencia de sustancias químicas como polietilenglicol (PEG). Cuando las condiciones de transformación son óptimas, las frecuencias de transformación pueden exceder el 2 % de los protoplastos totales, en especies como tabaco. Las condiciones óptimas para la transformación deben ser determinadas dependiendo de la especie vegetal del cual procedan los protoplasto

Electroporación

En este método se usa un campo eléctrico para permeabilizar de manera reversible la membrana celular. La explicación de lo más aceptado sobre este método es que la membrana actúa como un capacitor eléctrico incapáz de pasar corriente, entonces el campo eléctrico provoca q membrana se formen poros que permiten la entrada de DNA moléculas a la célula vegetal. Al parecer el cerrado de estos poros se da manera natural. Mediante este método se puede obtener una frecuencia de transformación hasta del 60 %.

Microinyección

Conceptualmente es el método más directo para la introducción de DNA en células. La microinyección en protoplastos vegetales se basa en las

técnicas de microinyección desarrolladas para células animales, sin embargo, en plantas no se ha obtenido el éxito que se esperaba. Una de las desventajas en el uso de esta técnica es que la inyección puede disminuir la viabilidad de la célula.

Transformación mediada por liposomas

Este método consiste en encapsular el DNA en membranas artificiales llamadas liposomas y su transferencia a protoplastos se realiza por un proceso de fusión de los liposomas con los protoplastos mediado por polietilenglicol. Las frecuencias de transformación en células vegetales son muy bajas (10^{-5}).

Biobalística

En este sistema el DNA es introducido al citoplasma celular a través de la pared celular, en la superficie de una partícula diminuta de metal. Esta partícula es acelerada a altas velocidades, a través de una pistola de microproyectiles lo que las hace capaces de penetrar por varias capas celulares y transformar aquella célula donde queda alojada la partícula.

INFILTRACION:

Este método consiste en lo siguiente: En un contenedor con medio líquido el cual contiene *A. tumefaciens* se embebe tejido vegetal (plantas completas, semillas), se hace vacío en el contenedor esto con el propósito de sacar el gas de los espacios intersticiales, después de un cierto tiempo se quita bruscamente el vacío, permitiendo que el medio con el *A. tumefaciens* penetre en los tejidos y así poder infectar a las células vegetales. Mediante este método se puede tener transformación estable en menos tiempo que a través del método de infección de raíces por *A. tumefaciens*, además en este método generalmente no se maneja cultivo de tejidos.

ANTECEDENTES

Usando el T-DNA de *A. tumefaciens* se generó un colección de mutantes en *Arabidopsis thaliana*. (Feldmann y Marks, 1987; Feldmann, 1991). De esta colección se ha seleccionado una planta denominada *def-1*. Esta mutante presenta las siguientes características: es recesiva, presenta un fenotipo albino (dicho fenotipo está asociado a la presencia del T-DNA). En estudios de microscopía electrónica demostraron que la mutación provoca un desarrollo anormal del cloroplasto (Figura #5).

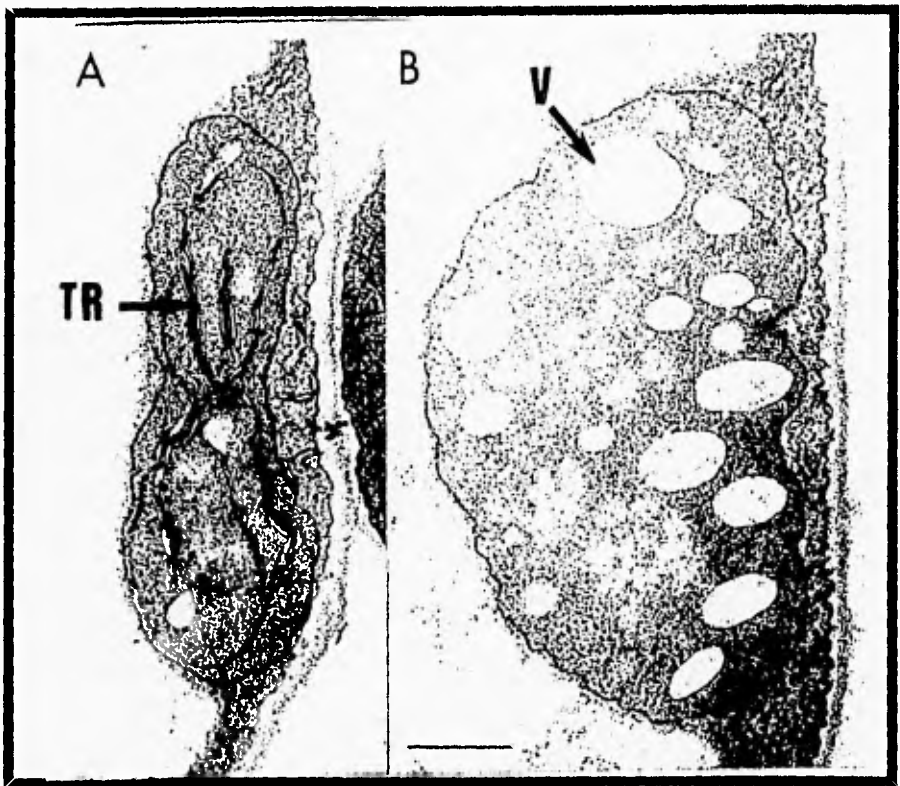


Figura 5. Microscopía electrónica de plástidos de la planta *def-1*. **A**, en este panel se observa un número reducido de tilacoides (TR). **B** este panel muestra el tipo de plástido más frecuente encontrado en las hojas, donde observa que las membranas de los tilacoides está asociada a un tipo vesículas (V).

Se ha clonado y secuenciado el gen *DEF-1* el cual codifica para un marco de lectura abierto de 717 aa, que se traduce en una proteína de 77 kd. Se ha encontrado que el producto del gen *DEF-1* cuenta con una secuencia que comparten proteínas transportadas al cloroplasto. Estas incluyen una alta frecuencia de serinas (Ser) 25% y alanina (Ala) 9% dentro de los primeros 60 aminoácidos y la presencia de la secuencia de aminoácidos "MASS" en el amino terminal. Estas características sugieren que la proteína DEF-1 pudiera ser transportada a cloroplasto.

Se ha comparado la secuencia de aminoácidos del gen *DEF-1* con el banco de secuencias encontradas en el banco de genes (Gene Bank) usando el programa GCG de la Universidad de Wisconsin. Esta comparación mostró similitud con un marco abierto de lectura denominado C2814, que se encuentra codificada en el operón fotosintético *puf* de *Rhodobacter capsulatus*. El operón *puf* es parte de un supra-operón donde esta la mayoría de los genes fotosintéticos de la bacteria *R. capsulatus*. La similitud encontrada a lo largo de estas proteínas DEF-1 y C2814 es de 54 % de identidad, lo que sugiere que estos genes tienen funciones similares. También se ha encontrado una similitud más baja con enzimas denominadas transcetolasas; enzimas que transfieren un grupo cetol a un aceptor aldeído. Estas enzimas son claves en la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato encontrada en bacterias, animales y plantas. En plantas, las transcetolasas también juegan un papel importante en la regeneración del ciclo de Calvin. La similitud encontrada entre *DEF-1* y una secuencia consenso, derivada de la comparación entre múltiples transcetolasas es de 23 % identidad en 630 a.a

Se han analizado la expresión del gen *DEF-1* bajo diferentes condiciones de luz. Los resultados de estos análisis muestran que el transcrito es positivamente regulado por luz. Sin embargo el transcrito *DEF-1* es detectado en bajas cantidades en plantas crecidas en oscuridad también se ha detectado en bajas cantidades en raíces que no han sido expuestas a la luz.

JUSTIFICACION.

El análisis de mutantes es una herramienta poderosa para identificar genes que juegan un papel importante en procesos biológicos complejos, como el desarrollo del cloroplasto. Con el análisis de la planta *def-1*, es posible contribuir al entendimiento del desarrollo del cloroplasto en plantas superiores.

Uno de los objetivos que se han planteado a futuro en la caracterización de la mutante albina *def-1*, es conocer la función de la proteína y la regulación del gen. Para ello se ha decidido hacer estudios en plantas silvestres, inhibiendo la expresión del gen *DEF-1* en diferentes etapas del desarrollo de la planta, a través de la estrategia del RNA antisentido bajo la expresión de un promotor inducible por calor. Pero se ha demostrado que existe variabilidad en la eficiencia de inhibición de la expresión genética mediante la estrategia del RNA antisentido, ya que en algunos casos ha sido posible inhibir eficientemente la expresión de un gen; sin embargo, en otros casos no se ha tan eficiente la inhibición de la expresión genética. Es por ello que en este trabajo se decidió probar la estrategia del RNA antisentido bajo la expresión de un promotor constitutivo, para saber si es posible inhibir la expresión del gen *DEF-1* eficientemente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Probar la estrategia del RNA antisentido bajo la expresión de un promotor fuerte constitutivo para inhibir la expresión del gen *DEF-1*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Hacer construcciones en antisentido con diferentes regiones del cDNA del gen *DEF-1* bajo la expresión del promotor 35S.

Estandarizar los métodos de transformación: Infección de raíces e Infiltración por vacío.

Generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con las construcciones en antisentidos

Analizar las plantas transgénicas generadas con los antisentidos

MATERIAL

El material usado en este trabajo fue el siguiente:

MEDIOS:

Medios para cultivo de bacterias:

Medio LB.

Para medio líquido	(por l)
Bacto-triptona	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
NaCl	10 g.

Para medio sólido	(por l)
Se agrega agar	15 g.
autoclavear a 120 °C por 20 minutos.	

antibióticos utilizados.

kanamicina	50 µg/ml	(sigma)
ampicilina	100 µg/ml	(sigma)

Medio YM. (Para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*)

YM sólido	11.1 g/l	(GIBCO BRL)
autoclavear a 120 °C por 20 minutos,		

antibióticos utilizados

kanamicina	50 µg/ml	(Sigma)
rifampicina	100 µg/ml	(Sigma).

Los medios para cultivo de tejidos son los siguientes:

MEDIO DE GERMINACION (GM):

1X mezcla de sales de Murashige and Skoog (MS)	(Sigma)
1 % de Sacarosa	(Sigma)
0.5 g/l de MES (ácido 2 -[N- Morfolino) etanosulfónico)	(Sigma)
1ml/l Vitaminas B-5 1000 X	

Vitaminas B-5 1000X (para 10 mls)

1 g mio-inositol
0.1 g tiamina HCl
10 mg ácido nicotínico
10 mg piridoxina HCl

ajustar pH a 5.7 con KOH 1 N

0.5% de Agarosa (Gibco BRL) ó 0.8 % de Fitagar (GIBCO)

autoclavear 20 minutos a 120°C

Para germinar semillas de plantas infiltradas por vacío se adicionó kanamicina 50 µg/ml (Sigma)

MEDIO DE INDUCCION DE CALLOS (CIM):

1X de Medio Gamborg's B5 con 2 % de sacarosa (Sigma)
0.5 g/l de MES (Sigma)
1 ml/l Vitaminas B-5 1000 X.
ajustar pH a 5.7 con KOH 1 N .
0.5% de Agarosa (Gibco BRL) ó 0.8 % de Fitagar (GIBCO)
autoclavear 20 minutos a 120 °C
a temperatura de aproximadamente 55 °C añadir:
0.5 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D).
0.05 mg/l de kinetina
0.05 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP).

MEDIO DE INDUCCION DE BROTES (SIM).

1X de Medio Gamborg's B5 con 2 % de sacarosa (Sigma)
0.5 g/l de MES (Sigma)
1 ml/l Vitaminas B-5 1000 X.
ajustar pH a 5.7 con KOH 1 N.
0.5 % de agarosa de (Gibco BRL) ó 0.8 % de Fitagar (GIBCO)
autoclavear 20 minutos a 120 °C
a temperatura de aproximadamente 55 °C añadir:
5 mg/l de (2-isopentenil) adenina (2iP).

antibióticos

kanamicina 50 µg/ml (Sigma)
claforan (Cefotaxima) 350 µg/ml

MEDIO INFILTRACION;

1/2 X sales de Murashige-Skoog
1 ó 1/2 X de vitaminas B5 1000X.
5 % de sacarosa
0.5 g/l de MES
pH 5.7 con KOH IN
0.044 µM de Benzilaminopurina.

CEPAS BACTERIANAS:

E. coli CMK Preparación (Sambrook, et al., 1989)
E. coli pRK 2013
Agrobacterium tumefaciens: cepa C58C1 (Deblaere, et al. 1985)
cepa LBA4404

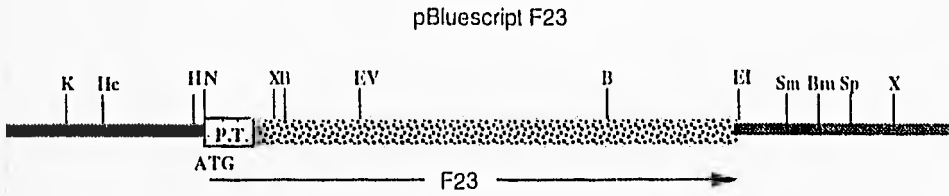


figura # 6. Esquema del plásmido pBluescriptF23. Este plásmido contiene el cDNA del gen *DEF-1*. sitios de restricción: K, Kpn I; Hc, Hinc II; H, Hind III; X, Xba I; B, Bgl II; EV, Eca RV; EI, Eco RI, S, Sma I; Bm, Bam HI. péptido de tránsito a cloroplasto (P:T). Codón de inicio de la traducción (ATG).

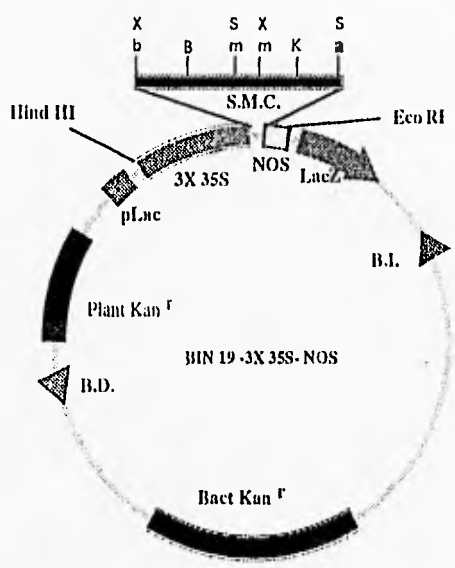


Figura # 7. Esquema del plásmido Bin19 3X35S-NOS. Este plásmido contiene el promotor 35S triplicado (3X35S), Sitio múltiple de clonación (SMC), con los sitios de restricción: Xb, Xba I; B, Bam HI; Sm, Sma I; Xm, Xma I; K, KpnI; Sa, Sac I. Nos, terminador NOS; B.I. borde izquierdo, B.D. borde derecho, genes de resistencia a kanamicina (Plant Kan^r y Bact Kan^r).

PLASMIDOS

pBluescript23
B19 3X35S-NOS

ENZIMAS y AMORTIGUADORES

(Distribuidas por Boheringer)

Enzimas de restricción.

Kpn I
Xba I
Spe I
Eco RV
Eco RI
Sma I
Hind III
Hinc II
Bgl II
Bam HI
otra enzimas.
Klenow
ligasa

MARCADOR DE PESO MECULAR.

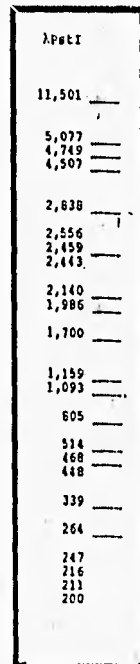
lambda Pst I.

(Figura# 6)

(Figura # 7)

Amortiguadores

L
H
H
B
H
A
B
reactivo 2
H
B



SUSTRATO INHERTE PARA CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.
Metro-Mix 350

SEMILLAS.

Ecotipos de *A. thaliana* WS y RLD

CUARTO DE CRECIMIENTO

Condiciones: Fotoperíodo 18 hrs luz, 6 hrs oscuridad. Temperatura 24°C.
6000 luxes.

CUARTO DE CULTIVO:

Condiciones: Fotoperíodo 18 hrs luz, 6 hrs oscuridad. Temperatura 24°C.
6000 luxes.

MÉTODOS

MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

REACCIONES DE DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las digestiones de DNA fueron hechas en un volumen de 20 µl de la siguiente manera:

DNA	(cantidad variable)
RNAsa (10 mg/ml)	0.5 µl (Preparación ver Sambrook <i>et.al.</i> 1989)
Buffer 10X	1/10 de volumen
Enzima	5 a 10 unidades
H ₂ O	volumen variable

REACCION DE POLIMERIZACION:

Para polimerizar los extremos cohesivos de DNA, se hizo una reacción de polimerización con la enzima Klenow, en un volumen de 40 µl.

DNA digerido	cantidad variable
Buffer 10X	1/10 de volumen
dNTPs (10mM)	5 µl
Klenow	1 unidad

se incubó a 37 °C por una hora. Después se hizo una extracción con fenol-cloroformo. El DNA se precipitó con con 1/10 de acetato de sodio 3 M

pH 5.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, temperatura de -20 °C por dos horas. El DNA se obtuvo por centrifugación 1400 rpm durante 10 minutos. Este se resuspendió en agua.

REACCIONES DE LIGACION.

Las ligaciones fueron hechas de la siguiente manera:

vector	ligación cantidad variable (100-500 ng)	control misma cantidad que en la ligación.
fragmento de DNA	exceso de 5 a 10 moles de veces que el vector.	-----
amortiguador 5X	1/10 del volumen final	1/10
ligasa	1 unidad	1 unidad
agua	volumen variable	volumen variable
volumen final	20 µl	20 µl

Las reacciones se incubaron a 14°C toda la noche.

MINIPREPARACIONES DE DNA.

Las minipreparaciones de DNA fueron hechas por el método descrito por Sambrook *et al.*, 1989.

ELECTROFORESIS:

Para checar el DNA digerido se hicieron geles de agarosa al 1%. Los fragmentos de DNA para las clonaciones se purificaron en geles de agarosa bajo punto de fusión.

Ambos tipos de geles se preparan con el amortiguador TAE (Tris-acetato/EDTA) 0.5 X (Sambrook *et al.*, 1989).

TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES POR CLORURO DI CALCIO:

Se tomaron 10 µl de la reacción de ligación, se añadió 90 µl de amortiguador de transformación 2X. Se descongelaron 100µl de células competentes en hielo, a las cuales se les añadió los 100 µl de la mezcla de ligación. Esta mezcla se dejó en hielo por 40 minutos, posteriormente se pasa a temperatura ambiente por 10 minutos. Se diluyeron las células en 1 ml de medio LB (sin antibióticos), se incubó 60 minutos a 37 °C. Se plaquearon 100 µl de cultivo en medio LB sólido con antibiótico. Las cajas se incuban a 37 °C toda la noche.

AMORTIGUADOR DE TRANSFORMACION 2X:

KCl	200 mM
MgCl	100 mM
CaCl	60 mM
Polietilenglicol (PEG)	al 3 % P/V

CRUZA TRIPARENTAL:

La introducción de los plásmidos a cepas de *A. tumefaciens* se hizo a través de cruza triparentales. Debido que estas cepas no tienen los genes de transferencia, se utilizó la cepa ayudadora de *E. coli* 2013.

- *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404 y C58C1) cepa receptora
- *E. coli* (CMK) cepa donadora
- *E. coli* pRK 2013. cepa ayudadora

Se cultiva cada una de las cepas en medio LB líquido (con sus respectivos antibióticos). En una caja con medio LB sólido sin antibiótico, se coloca una gota (5 μ l) del cultivo de la cepa pRK 2013 y sobre esta se colocó otra gota (5 μ l) de cultivo la cepa CMK se deja secar, posteriormente se incubó a 37°C por dos horas. Después añadir una gota (5 μ l) de cultivo de *A. tumefaciens* se sobre las cepas de *E. coli*, deja secar y se incubó a 30°C durante 2 horas. Las células que crecieron en la caja se rasparón con una asa de siembra y se hizo una dilución en un ml de medio LB. De esta dilución se tomaron 100 μ l para plaquear en una caja con medio LB sólido con los antibióticos Kanamicina 50 μ g/ml y Rifampicina 100 μ g/ml. las caja se incubaron a 30 °C, por dos días para obtener colonias aisladas. Una vez obtenida las colonias se hicieron minipreparaciones de DNA.

ESTERILIZACION DE SEMILLAS

Las semillas se pusieron en agua destilada al menos 10 minutos. Después se quitó el agua y se agregó etanol 100 % un minuto. Posteriormente se quitó el etanol y se agregó hipoclorito de Sodio (Cloralex) al 50 % con una gota de Triton durante 5 minutos en agitación constante. Por último las semillas se lavarón con agua destilada al menos 6 veces.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de este trabajo en el siguiente orden:

1.- CONSTRUCCIONES EN ANTISENTIDO

CONSTRUCCION EN ANTISENTIDO DE UN ANTISENTIDO CON EL cDNA DEL GEN *DEF-1*.

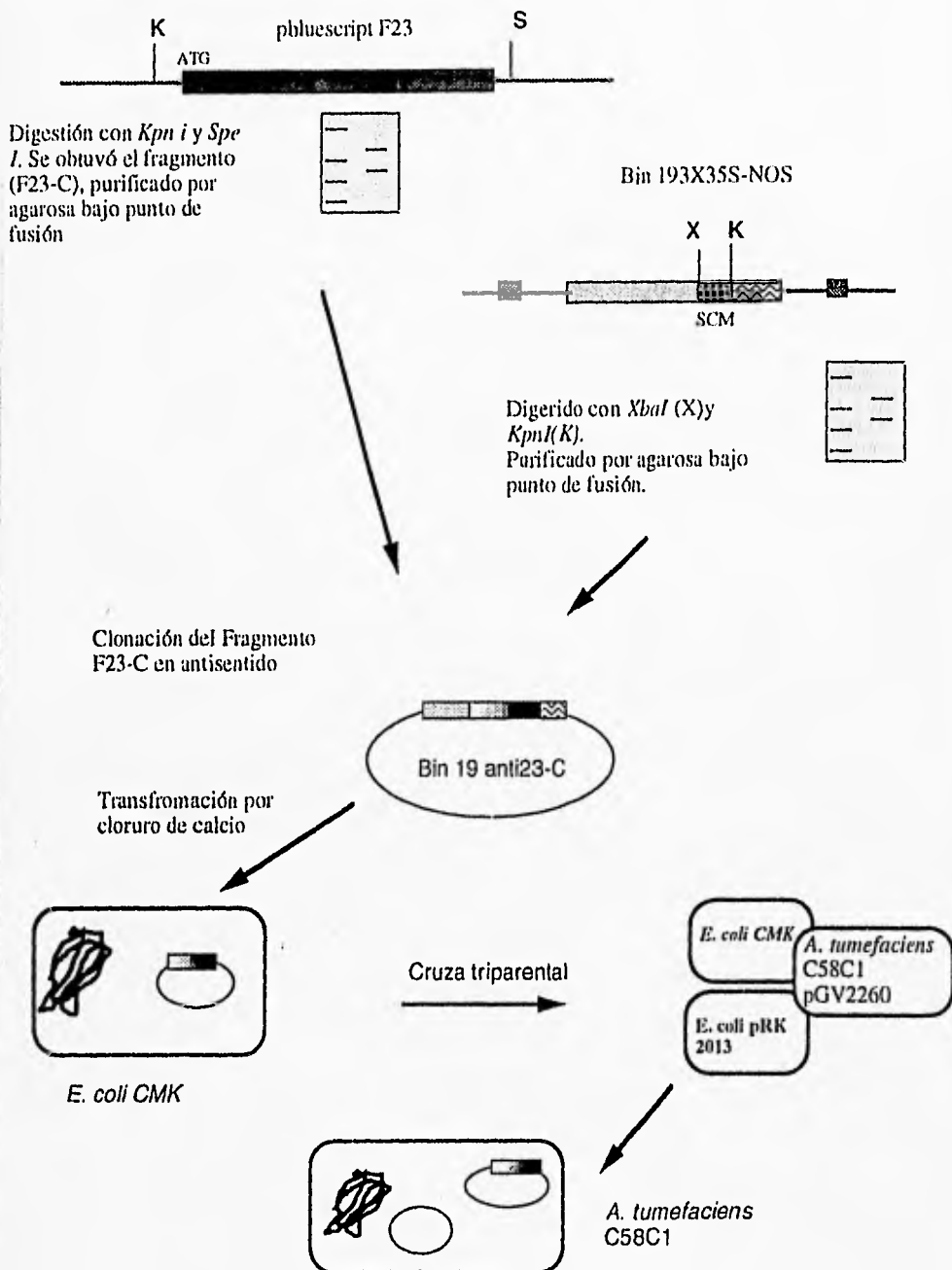
En la figura #8 Muestra de manera resumida la estrategia que se siguió para construcción del antisentido con el cDNA completo del gen *DEF-1*. A continuación se explica con más detalle los resultados obtenidos. En la figura #9 se muestra los patrones de digestiones obtenidos en la construcción del antisentido antes mencionado. El plásmido pBluescript F23 se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *SpeI*, a través de esta digestión se obtuvieron dos fragmentos: un fragmento de 2300 pb, cual corresponde al de cDNA (F23-C) del gen *DEF-1*, el otro fragmento de 3000 pb corresponde al vector pBluescript (Figura 9A).

Para clonar el fragmento F23-C en antisentido en el vector Bin 19 3X35S-NOS, este se digirió con las enzimas de restricción *Xba I* y *Kpn I*. En la figura 9B se muestra el vector digerido.

Una vez linearizado el vector binario se hizo la reacción de ligación con el fragmento F23-C. Para saber si el fragmento F23-C se ligó en el vector binario en antisentido, se aisló DNA de plásmido (Sambrook, *et al.*, 1989) de las transformantes. El DNA se digirió con las enzimas *Hind III* y *Eco RI*. En la figura 9 C, se muestra el DNA digerido y las clona posibles. En algunos clones se observa una banda de 2300 pb, la cual corresponde al fragmento F23-C que ha sido ligado en antisentido, las otras dos bandas corresponden al vector (10000 pb) y al promotor 35S (1100 pb) . El plásmido que lleva el fragmento F23C en antisentido se ha denominado Bin19 antiF23-C (la figura 14A.)

El plásmido Bin19 antiF23-C se introdujo a la cepa de *A. tumefaciens* C58C1, a través de una crucea triparental. Algunas veces los plásmidos introducidos *A. tumefaciens* tienen rearreglos. Para checar la integridad del plásmido introducido se aisló DNA de plásmido de *A. tumefaciens*, con el cual se transformó células competentes. De las transformates se hicieron minipreparaciones DNA, el cual fue digerido con las enzimas *Hind III* y *Eco RI*. En la figura #9 D, muestra el DNA digerido donde se observa la banda esperada de 2300 pb que corresponde al fragmento F23-C, es sugiere que el fragmento clonado en antisentido no ha sufrido rearreglos.

FIGURA # 8. ESTRATEGIA SEGUIDA EN LA CONSTRUCCION DEL UN ANTISENTIDO CON cDNA COMPLETO DEL GEN DEF-1.



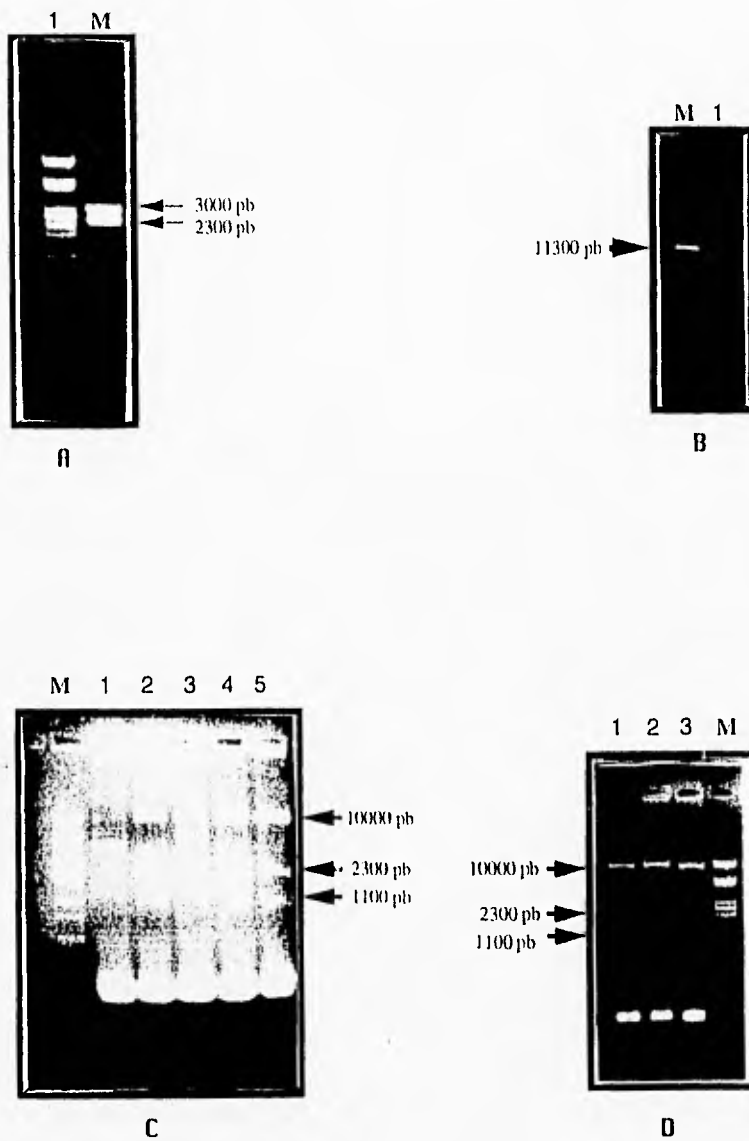


Figura #9. Muestra los patrones de las digestiones obtenidos en la construcción del antisentido con el cDNA del gen *DEF-1*. A (1), plásmido pBluescript F23 digerido con *Kpn I* y *Spe I*. B (1), plásmido Bin 193X355-NOS digerido con *Kpn I* y *Xba I*. C (1-5) DNA digerido con *Hind III* y *Eco RI* obtenido de miniprepaciones en la ligación del fragmento F23-C y el vector binario. D(1), plásmido Bin19 antiF23-C digerido con *Hind III* y *Eco RI*. M, marcador λ Pst I.

CONSTRUCCION EN ANTISENTIDO DEL CON EL FRAGMENTO DE 750 pb DE LA REGION 5' DEL cDNA DEL GEN *DEF-1*.

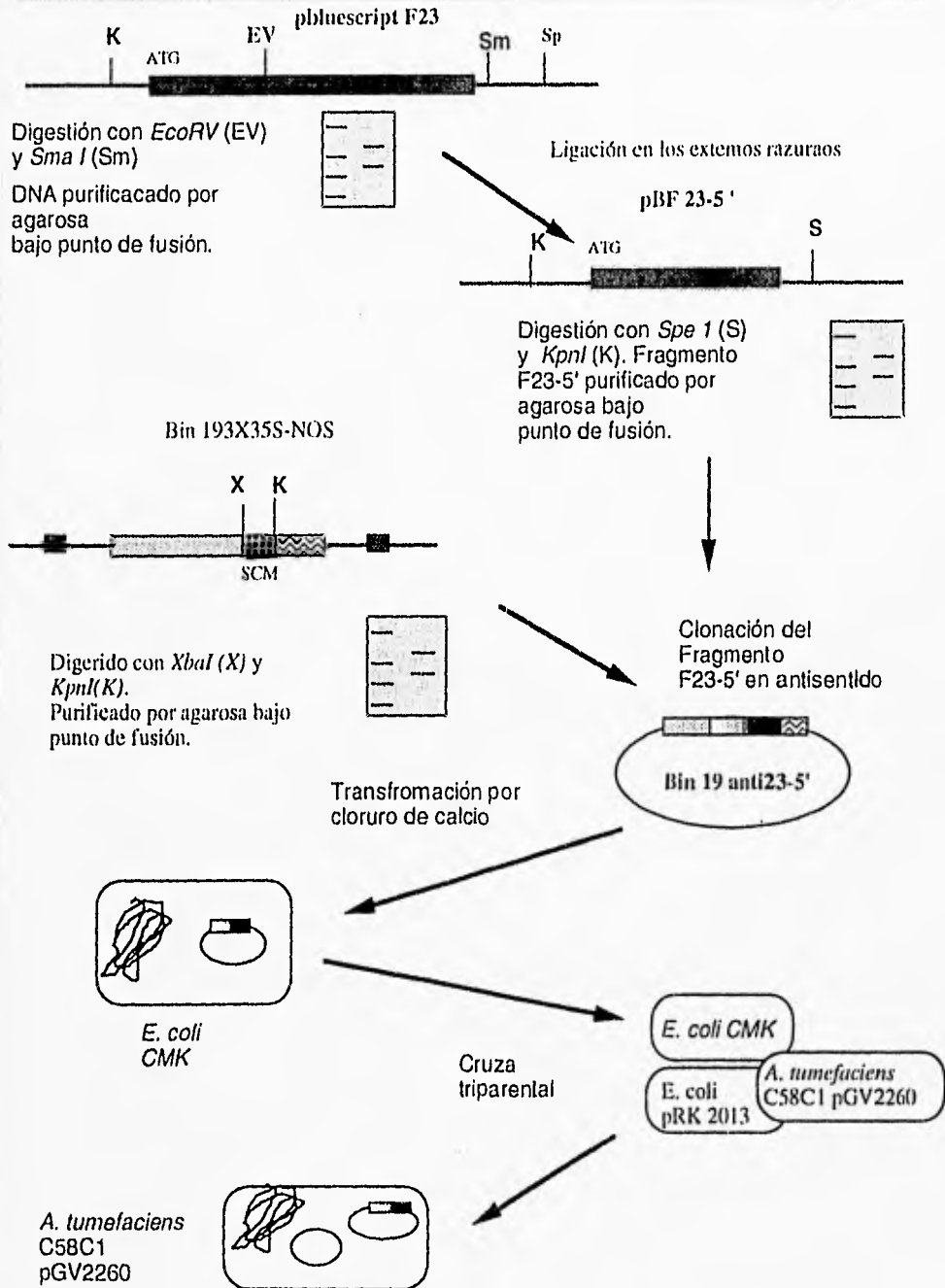
En la figura #10 se muestra una manera resumida la estrategia que se siguió para la construcción del antisentido de la región 5' del gen *DEF-1*. A continuación se describe con más detalle los resultados. En la figura #11 se muestran los patrones de las digestiones obtenidos en la construcción antes mencionada. Para obtener la región 5' (F23-5'), el plásmido pBluescript F23 se digirió con las enzimas de restricción *Eco RV* y *Sma I*. Esta digestión liberó dos fragmentos: un fragmento de 3750 pb (en el cual se encuentra los 750 pb de la región 5') y un fragmento de 1550 pb corresponde al resto del cDNA del gen *DEF-1*. En la figura 10 A, se muestran los resultados antes mencionados.

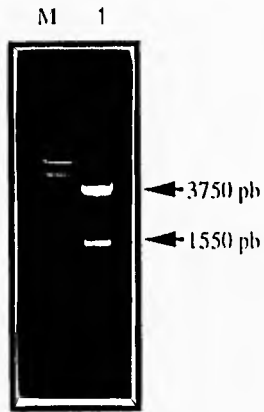
Para subclonar la región F23-5' en los sitios *Xba I* y *Kpn I* del vector binario, el fragmento de 3750 pb se religó sobre si mismo. A partir de células transformantes se aisló DNA (Sambrook, *et al.* 1989), este se digirió con las enzimas *Hind III* y *Bam III*. En la figura 11 B se muestra el DNA digerido, donde se observa una banda de aproximadamente 3000 pb que corresponde al vector pBluescript y una segunda banda de 750 pb corresponde al fragmento F23-5'. El plásmido pBluescript que contiene los 750 pb de la región 5' en sentido, se ha denominado pBF23-5'

El plásmido pBF23-5' se digirió con las enzimas *Kpn I* y *Spe I* (el sitio de restricción de *Spe I* es compatible con el sitio de restricción de *Kpn I*). Una vez obtenido el fragmento F23-5', se hizo una reacción de ligación para clonar el fragmento F23-5' al vector binario digerido con *Kpn I* y *Xba I*. A partir de células transformantes, se aisló DNA de plásmido (Sambrook, *et al.* 1989), el cual se digirió con la enzima *Hind III*. En la figura 11 C, se muestra las dos bandas esperadas una de ellas corresponde al vector binario y el terminador nos de un tamaño aproximado de 10250 pb y una segunda banda de un tamaño de 1850 pb, la cual contiene el promotor 35S tres veces y la región F-25'. Estos resultados corroboran que el fragmento F23-5' se clono en antisentido. El plásmido generado con con la región 5' del cDNA del gen *DEF-1* en antisentido se ha denominado Bin 19 antiF23-5' (figura #14B).

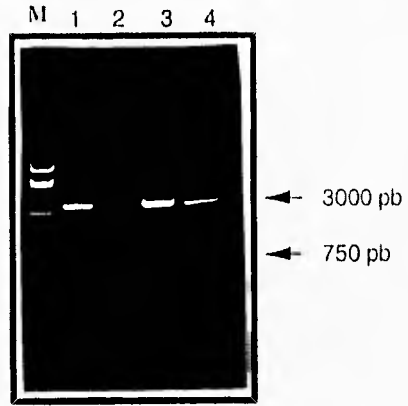
Posteriormente con el plásmido Bin19 antiF23-5' se transformó a la cepa de *A. tumefaciens* C58Cl a través de una crucea triparental. Para corroborar que la construcción no haya sufrido rearrreglos se aisló plásmido contenido en *A. tumefaciens*, el cual se transformó células competentes. A partir de las transformante se hicieron minipreparaciones de DNA (Sambrook, *et al.* 1989), este DNA se digirió con la enzima *Hind III*. En la figura 11 D, se muestra el gel donde se corrió el DNA digerido. Se observan dos banda una de un tamaño de 1850 pb, la cual corresponde al fragmento F23-5' y al promotor 35S, lo que sugiere que no hubo reaglos en el plásmido

Figura # 10. ESTRATEGIA SEGUIDA EN LA CONSTRUCCION DEI ANTISENTIDO CON LA REGION 5' DEL cDNA DEL GEN DEF-1.

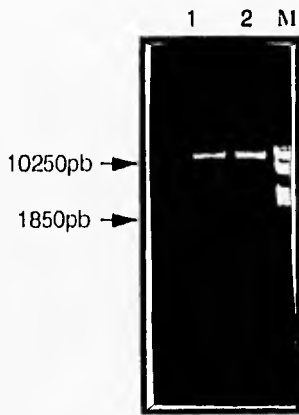




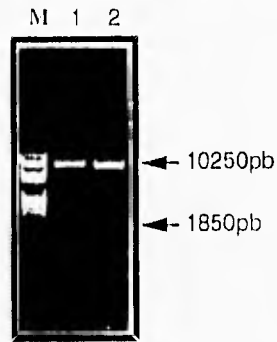
A



B



C



D

Figura #11. Muestra los patrones de las digestiones obtenidos en la construcción del antisentido con la región 5' del cDNA del gen *DEF-1*. A (1), plásmido pBluescript F23 digerido con *Kpn I* y *Spe I*. B (1-4), DNA digerido con *Hind III* y *Bam HI* obtenido de miniprepaciones en la ligación del fragmento pBF23-5'. C (1-2) DNA digerido con *Hind III* obtenido de miniprepaciones en la ligación del fragmento F23-5' y el vector binario. D(1-2), plásmido Bin19 antif23-5' digerido con *Hind III*. M, marcador lambda Pst I.

CONSTRUCCION DE UN ANTISENTIDO CON LA REGION 3' (650 pb) DEL cDNA GEN DEL *DEF-1*.

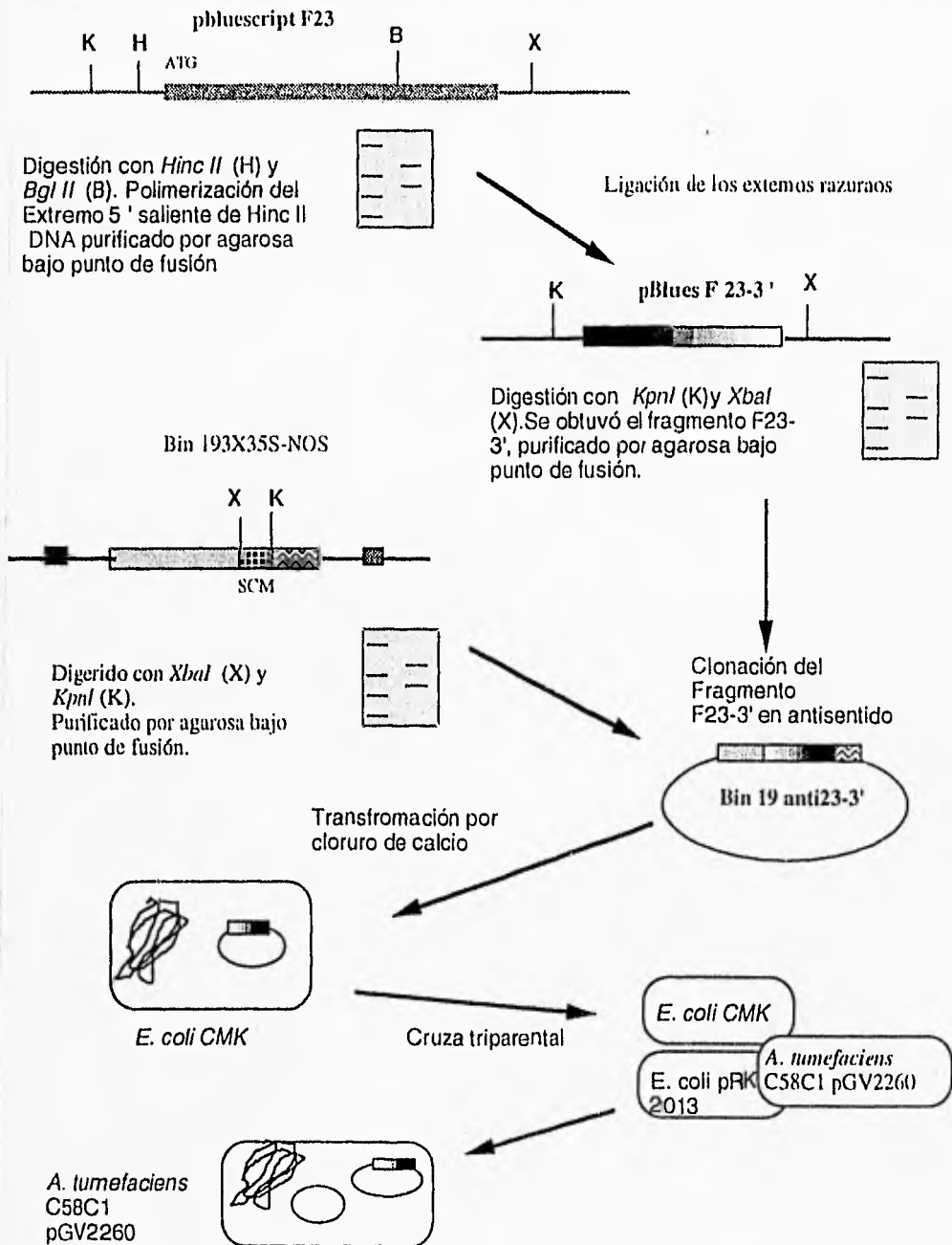
En la figura #12, se resume la estrategia que se siguió para la generación del antisentido hecho con la región 3' del gen *DEF-1*. En la figura #13, se muestra los patrones de digestión obtenidos en la construcción antes mencionada. El plásmido pBluescript F23 se digirió con las enzimas *Hinc II* y *Bgl II*. La digestión se checó en un gel (figura 13A), donde se observan dos bandas: una banda de 3650 pb, la cual contiene al vector pBluescript y a la región 3' (F23-3') del cDNA del gen *DEF-1*, la otra banda corresponde a un fragmento de 1650 pb el cual contiene al resto del cDNA del gen *DEF-1*.

Para clonar el fragmento F23-3' en los sitios de restricción *Kpn I* y *Xba I* del vector binario. Se religo el fragmento de 3650 pb, el cual fue polimerizado en los extremo 5' salientes de *Bgl II*, para obtener extremos razadarados. Para saber si se religo el plásmido en los extremos razadarados *Hinc II* y *Bgl II* (polimerizado), se aisló DNA de las clonas obtenidas de la transformación con las ligaciones. EL DNA se digirió con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Xba I*. En la figura 13 B, muestra que efectivamente hubo ligación sobre si mismo del plásmido, ya que se observan las dos bandas esperadas, una que corresponde a F23-3' de un tamaño de 650 pb y la otra banda de un tamaño de aproximadamente 3000 pb corresponde al vector pBluescript. El plásmido bluescript que contiene la clona F23-3' en sentido se ha denominado pB F23-3'.

Para introducir la región 3' del gen *DEF-1* en el vector BIN 193X35S-NOS (linearizado con las enzimas *Xba I* y *Kpn I*), el plásmido pB F-23-3' fue digirió con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Xba I* de tal digestión se obtuvo el fragmento de 650 pb. Se hizo la reacción de ligación. De las transformantes obtenidas con las ligaciones se aisló DNA, dicho DNA se digirió con las enzimas *Hind III* y *Eco RI*. De tales digestiones, como puede verse en la figura 13 C. puede hay clonas que presentan las dos bandas esperadas, una de ellas con un tamaño de 1750 que corresponde al fragmento F23-3' y al vector. Estos datos corroboran que el fragmento F23-3' se clono en antisentido. El plásmido generado se ha denominado Bin19 antiF23-3' (Figura #14).

Una vez hecha la construcción Bin 19 antiF23-3', esta se paso a través de una crucea triparental, a la cepa de *A. tumefaciens* C58 CI. Para checar la integridad de la construcción una vez dentro de *A. tumefaciens*, se aisló DNA plásmido, con el cual fué transformado en células competenes. A partir de las transformantes obtenidas se hicieron minipreparaciones de DNA de plásmido, el cual fué digirió con las enzimas *Hind III* y *Eco RI*. En la figura 13 D, se observa el patrón de la digestión en donde se observan las dos bandas esperadas. Una de 1750 pb que corresponde al fragmento F23-3' y el promotor 35S y otra banda que corresponde al vector binario. Estos resultados demostraró que no hubo rearreglos.

Figura # 12. ESTRATEGIA SEGUIDA EN LA CONSTRUCCION DEL ANTISENTIDO CON LA REGION 3' DEL cDNA DEL GEN DEF-1



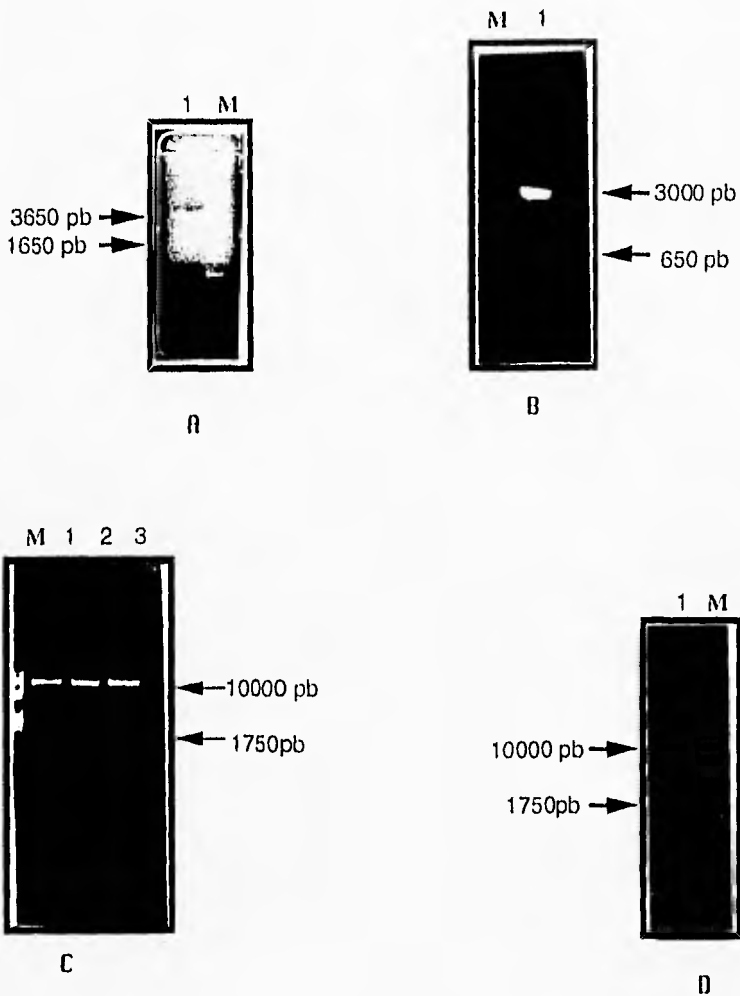


Figura #13. Muestra los patrones de las digestiones obtenidos en la construcción del antisentido con la región 3' del cDNA del gen *DEF-1*. A (1), plásmido pBluescript F23 digerido con *Kpn I* y *Xba I*. B (1), DNA digerido con *Kpn I* y *Xba I* obtenido de miniprepaciones en la ligación del fragmento pBF23-3'. C (1-3) DNA digerido con *Hind III* y *Eco RI* obtenido de miniprepaciones en la ligación del fragmento F23-3' y el vector binario. D(1), plásmido Bin19 antiF23-5' digerido con *Hind III* y *Eco RI* M, marcador lambda Pst I.

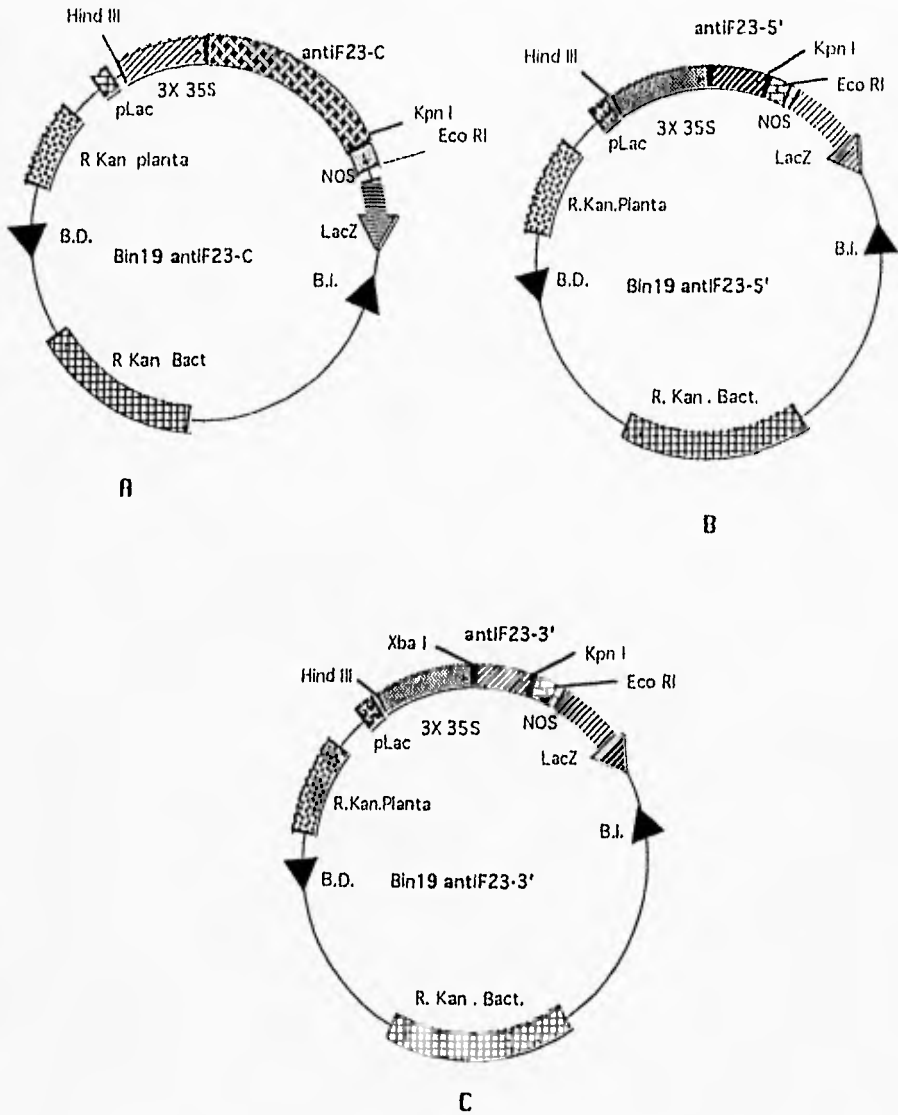


Figura #14. Muestra esquemas de los plásmidos binarios que contienen las diferentes construcciones en antisentido. A, El plásmido Bin19 antiF23-C tiene clonado el fragmento F23-C(2.3 Kb) en antisentido; B, plásmido Bin19 antiF23-5' tiene clonado la región 5' (750 pb) del gen *DEF-1* en antisentido y C, plásmido Bin19 antiF23-3' tiene clonado la región 3'(650 pb) del gen *DEF-1* en antisentido. B.D. borde derecho; B.I. borde izquierdo. 3X35S promotor 35S triplicado, R. Kan . Bact y R.Kan.Planta, resistencia a kanamicina, terminador NOS

2. ESTANDARIZACION DE LOS METODOS DE TRANSFORMACION.

INFECCION DE RAICES:

En los primeros ensayos de transformación de *A. thaliana* ecotipo WS, con las construcciones en antisentido y el vector Bin 19 3X35S-NOS utilizado como control. Se utilizó un protocolo de transformación modificado al desarrollado por Valvekens *et al.*, (1998). Con el seguimiento de este protocolo no se logro obtener transformación. A partir de entonces se decidió modificar parámetros al protocolo de transformación utilizado. Los parámetros modificados así como los resultados obtenidos se describen a continuación:

EL CAMBIO DE FITAGAR A AGAROSA.

Las siguientes comparaciones fueron hechas a dos semanas de crecimiento de las plantas. En las primeras transformaciones se utilizaba fitagar a una concentración del 0.8 %, bajo estas condiciones las raíces crecían largas (aproximadamente de 6 a 7 cm) y delgadas. Estas raíces se transformaron y no hubo regeneración de brotes. Cuando se hizo el cambio a agarosa (BIO-RAD) a una concentración de 0.7 %, la eficiencia de germinación fue baja, las raíces eran muy cortas (entre 1 y 2 cm) y con muchas vellosidades, además de la parte foliar era muy amarillosa. Esto posiblemente se debió a que la agarosa de esta marca no es óptima para cultivo de tejidos por las impurezas. Entonces, se decidió utilizar agarosa de marca Gibco BRL a una concentración de 0.5 %, en estas condiciones la raíces crecieron aproximadamente de 4 a 5 cm, la parte foliar ya no era amarillosa, además las raíces crecían gruesas. Con con estos cambios se obtuvo regeneración de plantas, a partir de entonces se decidió utilizar agarosa para los medios CIM y SIM.

EL CAMBIO DE CEPA DE *Agrobacterium tumefaciens*:

En los primeros ensayos de transformación la cepa de *A. tumefaciens* que se utilizaba para infectar las raíces de *A. thaliana* fue la LABA4404, con esta cepa no se logro obtener transformación. Cuando se utilizó la cepa C58 Cl se logró obtener transformación de las plantas.

EL CAMBIO DE ECOTIPO DE *Arabidopsis thaliana*:

Inicialmente se había decidido transformar el ecotipo WS, pues es el ecotipo de donde se generó la planta *def-1*. Cuando se infectaron raíces de plantas WS, unicamente se logro una baja eficiencia de transformación, algunas veces solo se obtenía la regeneración de callos pero una muy baja formación de brotes y mucho menos la regeneración de plantas transgénicas. Dado este

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE KANAMICINA:

Uno de los pasos críticos en la regeneración de brotes fue la concentración de kanamicina, inicialmente se utilizó una concentración de 50 µg/ml. Con esta concentración no se logró la regeneración de brotes, por lo que se decidió bajar la concentración a 30 µg/ml, lográndose así obtener regeneración de brotes y plantas transgénicas.

INFLUENCIA DE LA ACETOSYRINGONA:

Uno de los compuestos que secreta *A. tumefaciens* en respuesta a una herida es la acetosyringona, este compuesto induce los genes de virulencia de *A. tumefaciens*, por lo tanto muchos protocolos recomiendan utilizar acetosyringona en el medio donde crece *A. tumefaciens* para aumentar la eficiencia de transformación. En este caso se decidió utilizar en algunos ensayos de transformación acetosyringona a una a una concentración de 50 µM. Al comparar la eficiencia de transformación con y sin acetosyringona, no se notaron grandes diferencias, lo que indica que al menos en nuestra condición no es un factor crítico para la eficiencia de transformación.

INFLUENCIA DEL ACIDO INDOLACETICO:

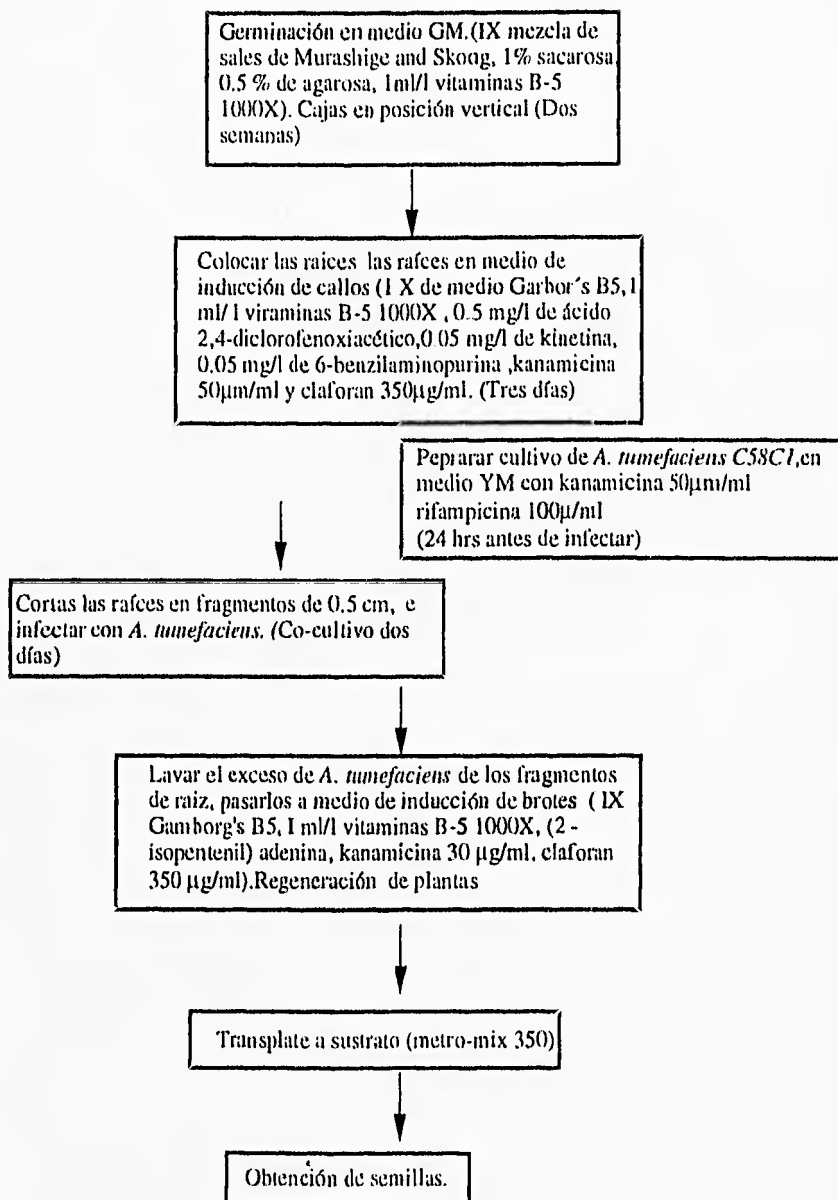
En muchos protocolos de transformación para *A. thaliana*, en el medio de inducción de brotes (SIM) se utiliza las hormonas 2iP y ácido indolacético. Sin embargo muchos protocolos sugieren no utilizar el ácido indolacético. En este caso cuando no se utilizó ácido indolacético se obtuvo regeneración de brotes y plantas transgénicas.

INFLUENCIA DE LOS ANTIBIOTICOS PARA CONTROLAR EL SOBRECRECIMIENTO DE *A. tumefaciens*:

Otros de factores importantes en la regeneración de callos y brotes, es controlar el sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*, en las primeras transformaciones se utilizó carbenicilina a una concentración de 500 µg/ml, su efecto sin embargo, no fue tan eficiente pues en algunos casos había un sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*; lo que creemos que impedía la regeneración de los brotes, pues los brotes se tornaban fenólicos (de color café). En transformaciones posteriores se utilizó Claforan (cefataxima) a una concentración de 350 µg/ml, los resultados que se obtuvieron fueron buenos pues se logró controlar el sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*. Para tener mejores resultados los callos y brotes se cambiaban a medio SIM nuevo aproximadamente 2 a 3 semanas ya que el Claforan se degrada en la presencia de luz.

En la figura #15, se resumen los resultados obtenidos a través de la estandarización del método mencionado.

FIGURA # 15. TRANSFORMACION DE *Arabidopsis thaliana* (ECOTIPO RLD), A TRAVES DEL METODO : INFECCION DE RAICES.



En la figura #15, se resumen los resultados obtenidos a través de la estandarización del método mencionado.

TRANSFORMACION in planta A TRAVES DE INFILTRACION POR VACIO.

Como se mencionó anteriormente, se decidió estandarizar el método de transformación, infiltración por vacío, por las ventajas que se han mencionado. Los resultados obtenidos para transformar plantas de *A. thaliana* fueron los siguientes:

En los ensayos hechos para probar el método de transformación, se utilizaron los ecotipos de *A. thaliana* WS Y RLD. Los plásmidos utilizados fueron Bin19-GUS-NOS (Jefferson, 1987), Bin 19 antiF23-C, Bin 19 antiF23-5', Bin 19 antiF23-3' y Bin 193X35S-NOS, todos estos plásmidos llevan el gen de resistencia a kanamicina. Las plantas se crecieron en macetas, cuando se formaba la primera inflorescencia (aproximadamente entre la segunda semana y la tercera) esta fue cortada, esto con el propósito de inducir la formación de inflorescencias secundarias. Al quinto día después de haber cortado la inflorescencia las plantas fueron puestas en medio de infiltración para hacer un vacío de 15 pulgadas de mercurio por 10 minutos. Las plantas infiltradas se crecieron hasta obtener semillas las cuales fueron germinadas en medio GM con kanamicina 50 µg/ml para seleccionar las transformantes. Hasta el momento las plantulas germinadas en medio con selección a kanamicina no lograron sobrevivir, lo que sugiere que no son plantas transgénicas.

En la figura# 16 se resume la estrategia generada en la estandarización del método mencionado mencionado.

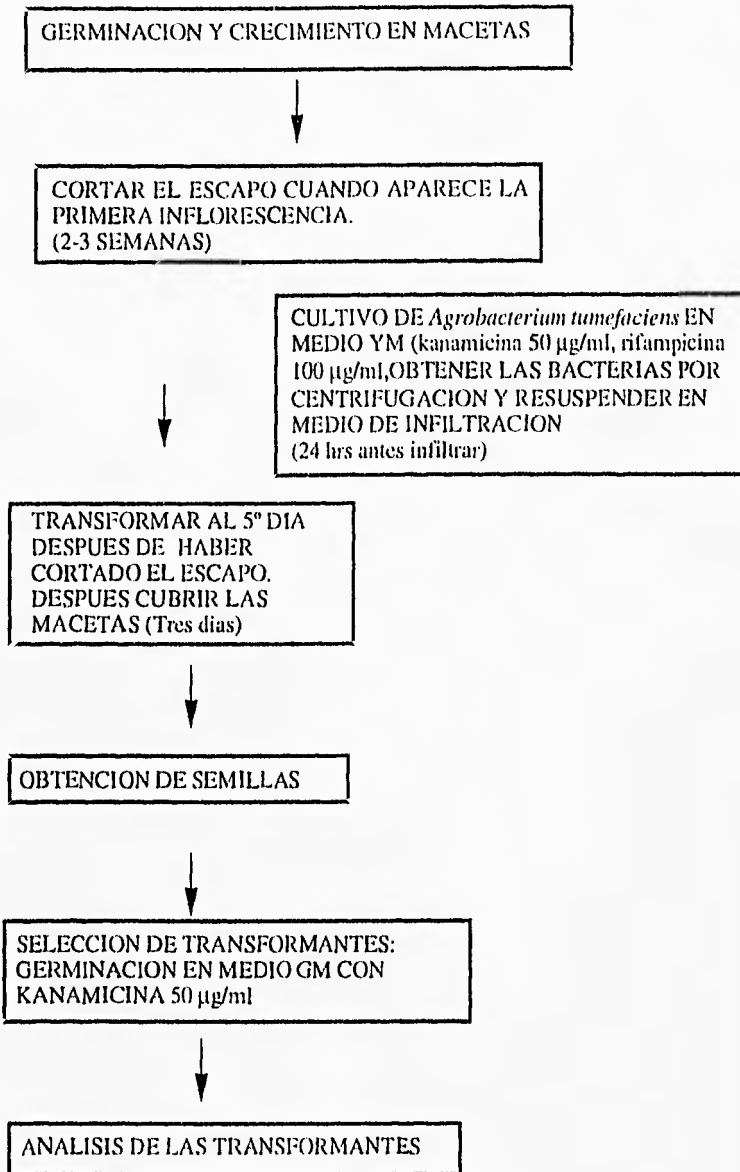
3. ANALISIS DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS.

Una vez establecida las condiciones para generar plantas transgénicas a través del método de infección de raíces por *A. tumefaciens*, se generaron plantas transgénicas con las construcciones en antisentido y el vector Bin193X35S-NOS utilizado como control.

Dado que hasta el momento no contamos con un método efectivo para aislar ácidos nucleicos de muestras tan pequeñas, como es el caso de las plantas transgénicas generadas, para hacer estudios moleculares que nos permitan apoyar mas los resultados obtenidos. el análisis de las plantas hasta el momento ha sido a nivel fenotípico.

También en este trabajo se la microscopia electrónica de los cloroplastos de plantas que expresan Bin19 antiF23-3'.

Figura # 16. TRANSFORMACION DE *Arabidopsis thaliana*, A TRAVES DEL METODO: INFILTRACION POR VACIO.



Análisis fenotípico de las plantas transgénicas:

Hasta el momento se han obtenido fenotipos variables. Se han generado plantas las cuales presentan un gradiente de fenotipos, plantas totalmente albinas, plantas amarillosas hasta plantas verdes. En la Figura #17, se muestran plantas con el gradiente de fenotipos generados por los antisentidos.

El análisis hecho en las plantas de *A. thaliana* generadas con cada una de las diferentes construcciones, mostró que las regiones cortas del gen *DEF-1* se obtienen plantas totalmente albinas a diferencia de la secuencia completa del gen. En la figura #18, se muestran fotografías donde se observan plantas con los niveles máximos de inhibición en cada antisentido.

En varias plantas transgénicas se presentó un patrón de variegación. Este patrón se caracteriza por presentar los bordes de las hojas tejido albino. En la figura #19 se muestran plantas con el patrón de variegación encontrado.

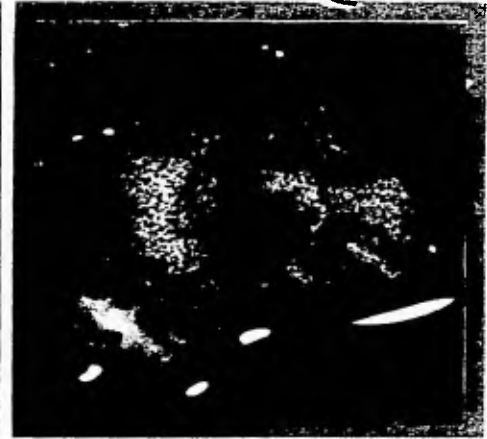
Los primeros estudios de microscopia electrónica del cloroplasto de las plantas transgénicas que presentan un fenotipo albino, muestran que los cloroplastos en estas plantas no son normales. Estos cloroplastos son muy semejantes a los que se observan en la planta *def-1*. En la figura # 20 se muestran cloroplastos de plantas que expresan el antisentido antiF23-3'.



PANEL 1



PANEL 2



PANEL 3

Figura #17. Muestra un amplio rango de fenotipos generados por las construcciones en antisentido. En el panel 1) plantas totalmente albinas, Panel 2) plantas amarillosas y Panel 3) plantas verdes. Estas plantas fuerón generadas a través del método de infección de raíces.



Bin 19 antiF23-3'



Bin 19 antiF23-5'



Bin 19 antiF23-C

Figura #18. La transformación de cada construcción generó un rango de fenotipos, aquí se muestran las plantas que presentan los niveles máximos de inhibición. Estas plantas fueron generadas a través del método de infección de raíces.



Figura #19. Muestra el patrón variegado presentado en hojas de plantas transgénicas generadas con los antisentidos. En la mayoría de los casos los bordes de la hoja presenta tejido albino. Estas plantas fueron generadas a través del método de infección de raíces.

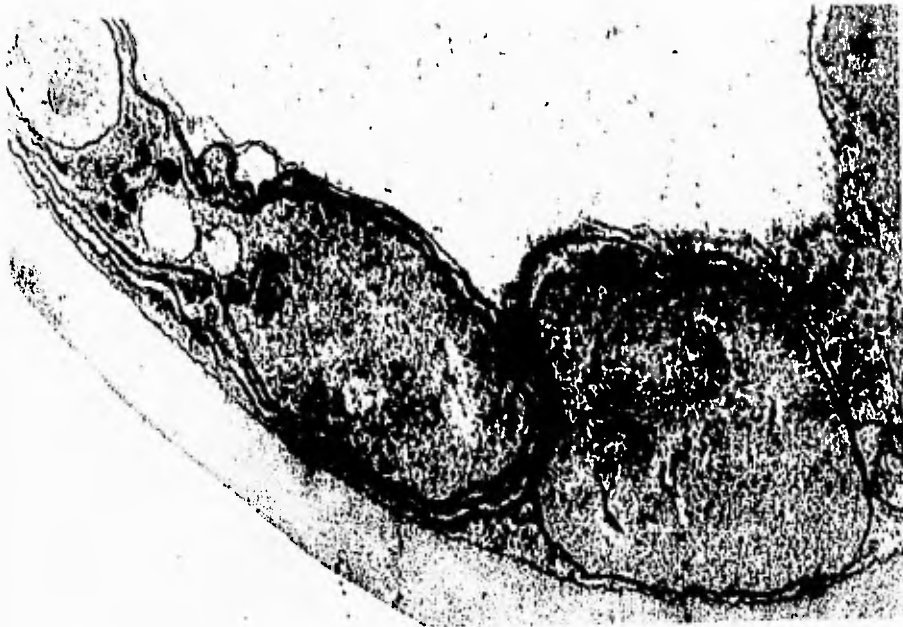


Figura # 20. Muestra plástidos de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el antisentido Bin19 antiF23-3'. Estos plástidos tomados de tejido albino son semejantes a los encontrados en la planta *def-1* . Aumento 54000 X

DISCUSION

La generación de plantas transgénicas que expresan los diferentes antisentidos fue utilizando el método de infección de raíces. En los primeros ensayos de transformación se utilizó un protocolo modificado al desarrollado por Valvekens, *et al.*, 1988. En este caso no se tuvieron buenos resultados. Muchos de los problemas encontrados para la regeneración plantas fueron resueltos cuando se modificaron varios factores tales, como el cambio de ecotipo de *A. thaliana*, el cambio de cepa de *A. tumefaciens*, el cambio de fitagar a agarosa en los medios de cultivo, la concentración de Kanamicina, las hormonas utilizadas en el medio SIM, el antibiótico para controlar el sobrecrecimiento de *A. tumefaciens* en la regeneración de brotes. Cuando se hicieron estos cambios en el proceso de regeneración (en el medio SIM), una de la evidencias que indica la formación de brotes, fue el color verde de los callos. Días después se observaron plantas con fenotipos diferentes dado por el efecto del antisentido. Aunque el método de infección es uno de los métodos más utilizados, para tener transformación estable, actualmente el método de infiltración por vacío se han utilizado para transformación de varias especies de plantas, mediante el cual se han obtenido buenos resultados. Las ventajas de este método son el tener plantas transgénicas en menos tiempo que el método de infección, además no se maneja cultivo de tejidos. En este trabajo se realizaron ensayos para la transformación *in planta* de *A. thaliana*, pero hasta el momento no se ha logrado obtener plantas transgénicas. Esto posiblemente se debe a factores que no han sido controlados en nuestro sistema. Uno de los pasos críticos en la transformación por este método es el momento en cual se infiltra después de cortar el escape. Tal vez el tiempo que estamos infiltrando no sea el adecuado. Otra de las causas son las medidas de Mercurio, pues posiblemente no sea suficiente vacío para sacar el aire de los espacios intercelulares, por lo que no penetra el *A. tumefaciens*, aunque cabe aclarar que altas medidas de Mercurio son dañinas para la planta. Otro factor importante es el tiempo de vacío, se han probado tiempos de 10 minutos, quizá en nuestro sistema no sean suficiente el tiempo, por lo que también pueda influir en la transformación de las plantas. Algunos autores recomiendan utilizar detergente (s/wet), esto con el propósito de dañar un poco las paredes celulares, sin embargo muchas veces resulta ser perjudicial para las plantas. En este trabajo no se ha utilizado ningún tipo de detergente. Por lo que sería bueno probar detergentes como el s/wet.

La tecnología del RNA antisentido ha sido utilizado para inhibir la expresión de genes en bacterias, animales y plantas. En este trabajo se han generado plantas que expresan diferentes regiones del gen *DEF-1* en antisentido bajo la expresión del promotor (triplicado) constitutivo 35S, el cual se ha probado que se expresa en toda la planta. El propósito de triplicar el promotor 35S fue para aumentar los niveles de transcripción de los antisentidos, y así tener niveles altos de inhibición. Sin embargo, Guerinéau,

et al., (1994) en experimentos de antisentidos hechos con el gen de la β -glucoronidasa (GUS) bajo la expresión de promotor 35S (individual) y 35S duplicado utilizando el sistema de protoplastos tabaco, demuestran que la actividad de GUS en ambos casos fue 14.0 y 12.0 % respectivamente, indicando que no es necesario un exceso de RNA antisentido para inhibir la expresión de un gen.

En reportes de antisentidos artificiales hechos en plantas se obtiene un rango de inhibición de la expresión genética, desde una inhibición cercana al 100 % hasta cercana al 0 %. En este trabajo las plantas generadas con los diferentes antisentidos muestran un rango de fenotipos (figura #17), lo cual sugiere que hay un rango de inhibición de la expresión del *DEF-1*, en plantas albinas cercana al 100 %, mientras que en plantas verdes podría ser cercano al 0 %. Höfgen, *et al.*, (1994), generan diferentes fenotipos en plantas de tabaco, cuando inhiben la expresión del gen la enzima glutamato-1-semialdehído aminotransferasa (enzima requerida para biosíntesis de clorofilas) por RNA antisentido. Los diferentes fenotipos observados en transformantes independientes son atribuidos a diversos factores tales como el número de copias de T-DNA insertado en el genoma vegetal, el número de copias que tiene gen blanco, el lugar donde se inserte el T-DNA, es posible que se inserte cerca de un aumentador de la transcripción (enhancer), o si se inserta cerca de un elemento que disminuya la transcripción (silencer). También es atribuido a los diferentes promotores utilizados (Mol, *et al.*, 1990).

Otro de los aspectos que provocan diferentes niveles de inhibición. Es hecho que diferentes regiones antisentido de un gen inhiben diferencialmente la expresión genética. Por ejemplo, Sandler, *et al.*, (1988) demuestran en plantas de tabaco que la secuencia más efectiva para inhibir la expresión del gen NOS (nopalina sintasa) bajo la expresión del promotor Cab 22 R, es la región 3'. En contraste a la región 5' o la región completa, parecen no ser tan efectiva. También van der Krol, *et al.*, (1990) demuestran que la región 3' del gen de la chalcona sintasa, son capaces de inhibir la pigmentación de las flores en petunia. En otros experimentos hechos en plantas de tabaco ha demostrado que una secuencia de 41 pares que incluye el codón de inicio del gen GUS fué suficiente para inhibir 100% expresión de GUS (Cannon, *et al.*, 1990). Los resultados mostrados en la figura 18 muestran plantas totalmente albinas con los antisentidos Bin19 antiF23-5' y Bin 19 antiF23-3', a diferencia de las plantas generadas con el antisentido generado con la secuencia completa del gen *DEF-1*. donde no se generó plantas albinas, lo cual sugiere que las regiones 3' y 5' en orientación del gen *DEF-1* son más efectivas para inhibir la expresión de este gen. Es posible que la secuencia completa del RNA antisentido pueda tener una estructura la cual impida eficientemente la hibridación con el RMAm (Sandler, *et al.*, 1988) del gene *DEF-1*.

Uno de los aspectos que comunmente se presenta en hojas de plantas que expresan los RNA antisentido, son los patrones de variegación. Höfgen, et al., (1994) generó plantas con un patron de variegación en hojas de tabaco. En este trabajo también se ha generado un patrón de variegación en plantas que expresan los antisentidos (figura #19). La explicación que se da a este efecto, es el hecho de que las células de los bordes son más viejas por lo tanto son más susceptibles al efecto de RNA antisentido.

Se ha generado plantas con el vector Bin 19 3X35S-NOS el cual ha sido utilizado como control. Los resultados que se esperaban era que las planta generadas fueran verdes. La mayoría de la plantas generadas fueron totalmente verdes, sin embargo algunas plantas llegaron ser amarillosas. Este efecto del fenotipo, posiblemente se deba a que el T-DNA haya alterado la expresión de un gen, el cual se vea manifestado en el fenotipo amarilloso. También es posible que los cloroplastos hayan sufrido fotooxidación, pues posiblemente las plantas transgénicas se sensibles a la luz.

Zhang, *et al* 1992, han reportado que el RNA antisentido y RNA en sentido del gene *AKR* (gen involucrado en el desarrollo del cloroplasto) bloquea la diferenciación del cloroplasto en *A. tahalina*. En nuestro caso, los estudios preliminares de la microscopía electrónica revelan que el cloroplasto no es normal. Se observan un tipo de vesículas, las cuales también se encuentran en plástidos de la plantas *DEF-1*. También es notable las ausencia de estructuras como los tilacoides y granas. Estos resultados sugieren que el RNA antisentido del gen *DEF-1* bloquea la diferenciación del cloroplasto.

CONCLUSION.

Se han establecido las condiciones para la transformación del ecotipo RLD de *A. thaliana*, mediante la infección de raíces por *A. tumefaciens*.

Las plantas obtenidas muestran un amplio rango de fenotipos, plantas totalmente albinas hasta plantas casi normales. Estos resultados pueden ser explicados con los niveles de inhibición de la expresión del gen *DEF-1*.

En varias plantas que expresan los antisentidos se ha observado un patrón de variegación en la hoja, el cual comunmente se observó que los bordes de las hojas presentan tejido albino.

Las plantas que expresan los antisentidos Bin19 antiF23-5' y Bin 19 antiF23-3', son más efectivas para producir fenotipos albinos, esto puede indicar que en el caso del gen *DEF-1* una región corta tanto de la región 5' y 3' puede ser más efectiva en la inhibición de la expresión del gen *DEF-1*.

Aunque hasta el momento no se cuenta con análisis a nivel molecular, los resultados obtenidos en este trabajo tanto de los fenotipos albinos, como de los cloroplastos alterados, sugieren que es posible inhibir eficientemente la expresión del gen *DEF-1* en plantas de *Arabidopsis thaliana*, mediante la estrategia del RNA antisentido.

BIBLIOGRAFIA.

- Bachem, C.W.B., Speckmann, G-J., van der Linde, P.C.G., Verheggen, F.T.M., Hunt, M. D., Steffens J.C. and Zabeau, M. (1994) Antisense expression of Polyphenol Oxidase genes inhibits enzymatic Browning in potato tubers. *Bio/technology*. 12: 1101-1105.
- Bevan Michael. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*. 8711-8721.
- Boiziau, C., Larrouy, B., Sproat, B. and Toulmé, J-J. (1995) Antisense 2'- O- alkyl oligoribonucleotides are efficient inhibitors of reverse transcription. *Nucleic Acids Research*. 23: 64-71.
- Bird, C. R., Ray, J.A., Fletcher, J. D., Boniwell, J. M., Bird, A. S., Teulieres, C., Blain, I., Bramley, P. M. and Schuch, W. (1991) Using antisense RNA to study gene funtion: Inhibitions of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *Bio/technology*. 9: 635-639.
- Cornelissen, M. (1989) Nuclear and cytoplasmatic sites for anti-sense control. *Nucleic Acids Research*. 17:7203-7209.
- Cornelissen, M., Vandewiele, M. (1989) Both RNA level and translation efficiency are reduced by anti-sense RNA in transgenic tabacco. *Nucleic Acids Research*. 17:833-843.
- Cannon, M., Platz, J., O'Leary, M., Sookdeo, C. and Cannon, F. (1990) Organ-specific modulation of gene expression in transgenic plants using antisense RNA. *Plant molecular Biology*. 15: 39-47.
- Davey, M.R., Rech, E.L. and Mulligan, B.J. (1989) Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Molecular Biology*. 13: 273-285.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*. 13: 4777-4788.
- Ecker, J. R., and Davis, R. W. (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 5372-5376.
- Eguchi, Y., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1991) Antisense RNA. *Annu.Rev. Biochem*. 60:631-52.27.
- Escudero, J., Neuhaus, G. and Hohn, B. (1995) Intracellular *Agrobacterium* can transfer DNA to the nucleos of the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:230-234.

- Feldmann, K. A. and Marks, M., D. (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet.* 208: 1-9.
- Feldmann, K. A. (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Mutacional spectrum. *Plant J.* 1:71-82.
- Furbank, R.T. and Taylor, W.C. (1995) Regulation of photosynthesis en C₃ and C₄ plants: A molecular approach. *The Plant Cell.* 7: 797-807.
- Green, P. J, Pines, O., and Inouye, M. (1986) The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 569-97.
- Guerineau, F., Waugh, R., and Brown. J.W.S. (1994) Parameters affecting the activity of antisense RNA sequences in tobacco protoplasts. *Plant Cell Reports.* 13: 703-708.9.
- Höfgen, R., Laber, B., Schüttke, I., Klonus, A-K., Streber, W. and Pohlens, H-D. (1995) Repression of Acetolactate Synthase activity through antisense inhibition. *Plant Physiol.* 107: 469-477.
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The gen GUS fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405.
- Jiang, C.-Z., Kliebenstein, D., Ke, N., and Rodermel, S. (1994) Destabilization sense transcripts by antisense RNA. *Plant molecular Biology.* 25: 569-576.
- Jiang, C.-Z., Quick, W. P., Alred, R., Kliebenstein, D., and Rodermel, S. R. (1994) Antisense RNA inhibition of Rubisco activase expression. *The Plant Journal* 5 (6). 787-798.
- Jiang, C.-Z., and Rodermel, S. R. (1995) Regulation of Photosynthesis during leaf development in *RbcS* antisense DNA mutants of Tobacco. *Plant Physiol.* 107: 215-2447.
- Majeau, N., Arnoldo, M., and Coleman, J. R. (1994) Modification of carbonic anhydrase activity by antisense and over-expression constructs in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology.* 25: 377-385.
- Mol, J. N. M, van der Krol, A. R., vanTunen, A. J., van Blokland, R., de Lange, P. and Stuitje, A. R. (1990) Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS lett.* 268: 427-430.
- Powell, P. A., Stark, D. M., Sanders, P. R., and Beachy, R. N. (1989) Protection against tobacco virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6949-6952.

- Sandler, S. J., Stayton, M., Townsed, J. A., Ralston, M. L., Bedbrook, J. R., and Dunsmuir, P. (1988) Inhibition of gene expression in transformed plants by antisense RNA. 11:301-310.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. Col Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Thomson, W.W. and Whatley, J.M. (1980) Development of nongreen plastids. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 375-94.
- Robert, L. S., Donaldson P. A., Ladaique, C., Altosaar, I., Arnison, P. G. and Fabijanski, S. F. (1989) Antisense RNA inhibition of β - glucuronidase gene expression in transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology. 13: 399-409.
- Rodermel, S. R., Abbott, M. S. and Bogorad, L. (1988) Nuclear-organelle interactions: Nuclear antisense gene inhibits Ribulose Bisphosphate Carboxylase enzyme levels in transformed Tobacco plants. Cell. 55: 673-681.
- Rodermel, S. R. and Bogorad, L. (1992) Antisense mRNA inhibition of ribulose bisphosphate carboxylase- the most abundant protein in photosynthetic cells. In antisense RNA and DNA. Modern Cell Biology Series. Volumen 4 (Murray. J. A.H., ed.) New York: Wiley-Liss, Inc., pp. 121-135.
- Rodermel, S. R. Jiang, C-Z., Kliebenstein, D. and Quian, J. (1994) Antisense RNA inhibition of photosynthetic gene expression.
- Valvekens, D., Montagu, M.V., and Lujsebettens, M.V. (1988). *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by kanamycin selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5536-5540.
- Zhang, H., Scheirer, D. C., Fowle, W. H. and Goodman, H. M. (1992) Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in Arabidopsis. The Plant Cell. 4: 1575-1588.
- Zupan, J.R. and Zambrsky, P. (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant cell. Plant Physiol. 107: 1041-1047.