

IBT-UNAM

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología de la UNAM

Caracterización de líneas transgénicas modificadas mediante el sistema Ac/Ds
para la identificación de genes candidatos relacionados al desarrollo de raíces
laterales en una de ellas.

Alumno:

María Dolores Gutiérrez Alanís

Asesores:

Dr. Joseph Dubrovsky
Dr. Jean Philippe Vielle Calzada

Comité Tutorial:

Dr. José Luis Reyes
Dr. Mario Rocha



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM de la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionar los recursos didácticos y humanos necesarios para mi formación en éste posgrado.

Al Dr. Joseph Dubrovksy, mi asesor, por todas sus enseñanzas, porque siempre creyó en mi y me apoyó en mis ideas alocadas, por enseñarme el significado de "paciencia", "puntualidad", "buena redacción", etc etc. Gracias por todo Dr. Joseph.

A los doctores José Luis Reyes y Mario Rocha por formar parte del comité evaluador.

A mis padres, por su incondicional apoyo en cualquier momento y situación, por enseñarme a ser independiente, a luchar siempre por lo que quiero y principalmente por enseñarme que ... todo es posible.

A toda mi familia porque para mi siempre han sido un refugio en los tiempos difíciles.

A Lenin Yong Villalobos por ser parte de mi vida sentimental y por su cariño y apoyo durante una parte de este periodo de mi vida, ah y por supuesto por los protocolos y trueques "Cinvestav-IBT" que me ayudaron a completar mi proyecto de maestría.

A mi amigo y confidente Esteban que en las buenas y en las malas siempre estuvo conmigo, me ayudó, me escuchó y hasta me regañó cuando rara vez meti la pata, jaja. (por cierto, amigui por ahi debes 200 pesos, ni creas que no me acuerdo!).

A mis amigos el Dr. Juan Manuel Estevez por apoyarme y animarme en muchas situaciones, y el Dr. Gerardo Orta y Raúl Noguez por todos sus consejos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Raquelito (Por pasarme la receta de los "brownies" hmmm), a Jazmin (por escucharme ... y por el cafecito que venía incluido) a Ramces (por sus palabras cuando andaba "depre" y por las conversaciones en su version "historia sin fin") a Laurita (simplemente porque siempre me sonsacaba a salir aunque no tuviera muchas ganas y al final ... siempre me la pasaba muy bien) a Dulce (por enseñarme como se debe jugar billar y pegarle a la lampara al mismo tiempo) a Edgar (por enseñarme lo que significa "amar la tierra" aah y bueno ... tengo que confesarte que Si fui yo quien se voló los platanitos con chile de tu lugar que le compraste a Paz, en verdad... no me pude resistir, jaja).

Y a la incansable Coca-cola de lata por acompañarme en el laboratorio y ayudarme a pensar en mis resultados de lunes a viernes y ocasionalmente los fines de semana.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Ventajas de <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo.....	6
1.2. Organización histológica de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.3. Desarrollo de primordios de raíces laterales.....	8
1.4. Principales fitohormonas involucradas en el desarrollo del primordio de la raíz lateral.....	8
1.4.1. Auxinas.....	8
1.4.2. Citocininas.....	9
1.5. Regulación genética de la iniciación del primordio de la raíz lateral.....	9
2. ANTECEDENTES	11
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVO GENERAL	14
5. OBJETIVOS PARTICULARES	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1. Material Biológico.....	15
6.2. Esterilización de las semillas.....	15
6.3. Germinación <i>in vitro</i>	15
6.4. Método de inducción de Callos.....	15
6.5. Método de Tinción Histoquímica para actividad de GUS.....	16
6.6. Método de aclaración de raíces.....	16
6.7. Crecimiento en suelo.....	16
6.7.1. Aislamiento de líneas homocigotas por resistentes a kanamicina.....	17
6.8. Extracción de DNA genómico.....	17
6.9. TAIL-PCR.....	18
6.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	21
6.11. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	21
6.12. Purificación de plásmido mediante columnas.....	22
6.13. Condiciones de crecimiento para <i>Escherichia coli</i>	22
6.13.1. Medio Luria Bertani (LB).....	22
6.13.2. Condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i>	22
6.14. Clonación del producto de PCR.....	22
6.15. Extracción del DNA Plásmidico.....	23

6.16.	Transformación de células químicamente competentes de <i>E. coli</i>	23
6.17.	Corte con endonucleasas de restricción.....	23
7.	RESULTADOS	25
7.1	Análisis detallado de los patrones de actividad de GUS en 12 líneas seleccionadas.....	25
7.1.1	MGT 22.....	28
7.1.2	MGT 303.....	30
7.1.3	MGT 307.....	31
7.1.4	MGT 511.....	32
7.1.5	MGT 512.....	35
7.1.6	MGT 521.....	36
7.1.7	MGT 582.....	37
7.1.8	MGT 606.....	39
7.1.9	MGT 821.....	41
7.1.10	MET 115.....	44
7.1.11	MET 441.....	45
7.1.12	MGT 180.....	46
7.2	Identificación y análisis genético de una línea relacionada a la iniciación de primordios de raíces laterales.....	49
7.3	Análisis molecular de la línea MGT 180.....	55
7.3.1	Estandarización de la técnica de TAIL-PCR.....	55
7.3.2	Análisis molecular de la línea MGT180 L9(GUS+).....	66
8.	DISCUSION	74
8.1	Análisis detallado de los patrones de actividad de GUS de plántulas de 12 líneas transgénicas seleccionadas.....	74
8.2	La línea MGT 180 se seleccionó como la línea de mayor interés en relación al desarrollo de raíces laterales.....	76
8.3	Análisis Genético de la línea MGT 180.....	76
8.4	Análisis molecular de la línea MGT 180.....	78
8.5	Breve descripción bibliográfica de los genes candidatos a proporcionar la actividad de GUS en los primordios de raíces laterales en la línea MGT 180.....	82
9	CONCLUSIONES	85
10	PERSPECTIVAS	86
11	BIBLIOGRAFÍA	89
APÉNDICE I	97
APÉNDICE II	99

RESUMEN

Aún estamos lejos de entender los principales mecanismos que controlan la iniciación de raíces laterales, un punto central en el desarrollo de la raíz lateral y base de la formación del sistema radical en plantas. Tal conocimiento es de fundamental importancia para el entendimiento de los mecanismos de desarrollo de la raíz. En nuestro grupo se realizó un escrutinio de una colección de 2,000 líneas transgénicas de tipo “gene trap” y “enhancer trap” (MGTs y METs) generadas usando el sistema implementado por Sundaresan y col. (*Genes Dev.* 1995, 15: 1797) para seleccionar líneas con la expresión del gen reportero GUS en periciclo y en los primordios de las raíces laterales. El sistema Ac/Ds permite la modificación de plantas transgénicas mediante el uso de transposones para su inserción en genes endógenos. La inserción actúa como una marca molecular facilitando su identificación y permite la expresión temporal y/o tejido específico de genes reporteros como el gen de la β -glucuronidasa (GUS). Basándonos en información preliminar de la actividad de GUS en células de periciclo seleccionamos 10 líneas MGTs y 2 MET para su estudio. En este trabajo se confirmó dicha expresión en células de periciclo en las líneas MGT 22, MGT 180, MGT 511, MGT 821 y MET 441, y en etapas tempranas de primordios de raíces laterales en las líneas MGT 180, MGT 511 y MGT 512. La línea transgénica más interesante (MGT 180) fue seleccionada por la estabilidad y reproducibilidad de la actividad de GUS en células del periciclo y etapas tempranas de la formación de primordios, manteniendo el mismo patrón de tinción en plantas de diferente edad. Encontramos que la mayoría de las raíces laterales de la línea MGT 180 tuvieron el meristemo apical más corto que el meristemo de tipo silvestre. Un análisis genético de segregación (basado en la resistencia a kanamicina y actividad de GUS) y un análisis molecular sugirieron la presencia de al menos 2 inserciones no relacionadas en MGT 180. Mediante la técnica de TAIL-PCR se identificó una región en el cromosoma 3 en la posición 94290 del BAC T4C21 del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Mediante PCR se realizó la confirmación de la posición de la inserción en la región UTR5' putativa del At3g60870, adyacente al gen At3g60860. Por lo tanto, el gen identificado en este trabajo como candidato a presentar un papel relacionado con el desarrollo de raíces laterales es At3g60870 que codifica para una proteína nuclear con un dominio tipo AT (“AT-hook”), la proteína AHL18.

1 INTRODUCCIÓN

La raíz es un órgano de vital importancia en la vida de una planta ya que participa en la absorción de nutrientes y agua así como en su transporte a la parte aérea, provee un soporte físico, es almacén de alimento y en muchas especies es el principal sitio de síntesis de metabolitos (Rost, *et al.* 1998), entre ellas fitohormonas tales como auxinas (Ljung *et al.*, 2005) y citocininas (Alóni *et al.*, 2005), las cuales participan en importantes procesos fisiológicos. El conjunto de raíces de una planta constituyen el sistema radical. Este sistema surge después de la germinación de una semilla a partir de un órgano embrionario llamado radícula embrionaria, cuando la radícula sale de la semilla y crece se le llama raíz primaria. La mayor parte del sistema radical está hecho de raíces laterales que se originan a partir de la raíz primaria, la producción de nuevas raíces laterales continúa a lo largo de la vida de una planta y el desarrollo de la raíz lateral está controlado por diferentes factores incluyendo la concentración de nutrientes en la planta y el suelo (Lopez-Bucio *et al.*, 2003).

1.1 Ventajas de *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo.

Arabidopsis thaliana es una planta que tiene varias ventajas para utilizarla como modelo de estudio del sistema radical, su genoma es pequeño y está completamente secuenciado (130 Mb organizadas en 5 cromosomas), la observación de la morfología de la raíz es fácil de analizar utilizando técnicas de microscopía de contraste diferencial de interferencias o Nomarski (Dubrovsky y Rost, 2003). Debido a que en este órgano los tejidos son semitransparentes y el patrón de formación de tejidos es simple y predecible y, a diferencia de la formación de la raíz primaria que ocurre durante la embriogénesis, la formación de raíces laterales es fácilmente accesible para observación y experimentación (Figura 1B).

ESQUEMA GENERAL

SECCIÓN LONGITUDINAL

SECCIÓN TRANSVERSAL

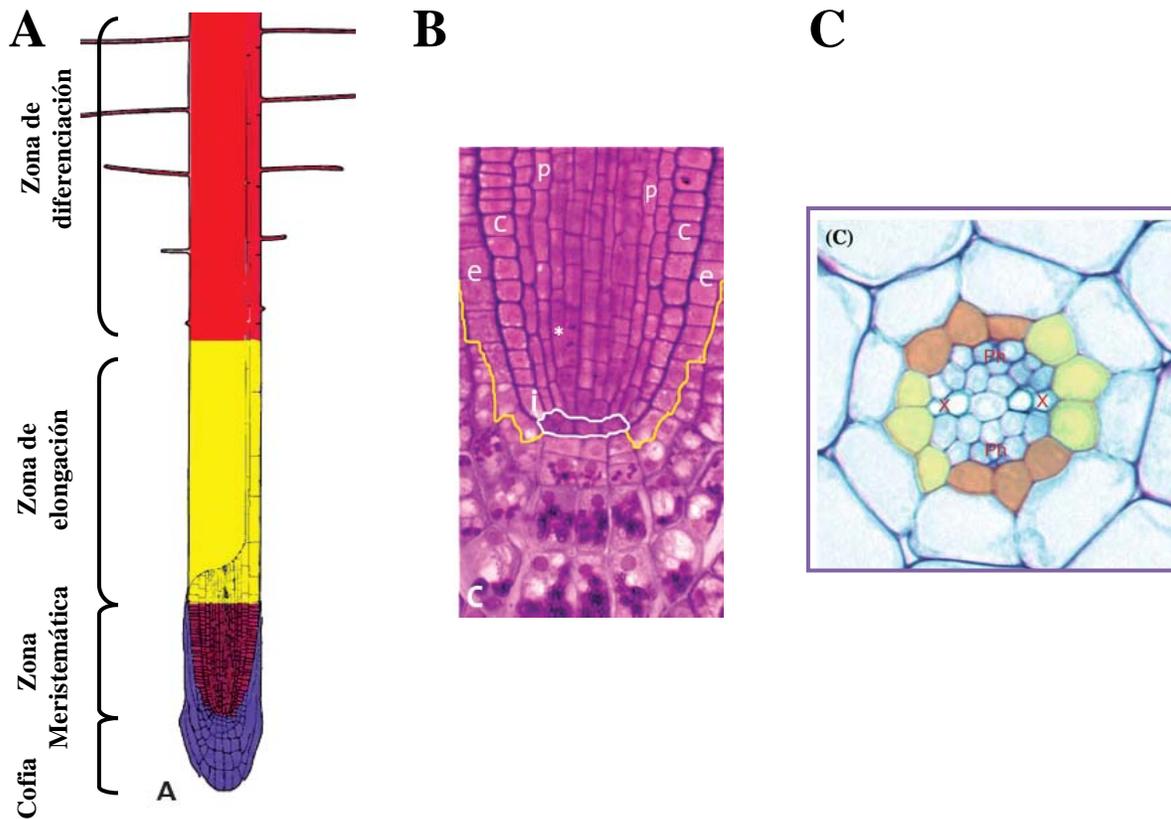


Figura 1.- Estructura de la raíz. (A) Esquema general de las zonas de la raíz. (B) Microfotografía de corte histológico longitudinal de la región apical de la raíz. Las células dentro de la línea blanca son células del centro quiescente. Al exterior y abajo de la línea amarilla se encuentra la cofia de la raíz. Arriba de la línea amarilla se encuentra el meristemo apical. (C) Microfotografía de sección transversal de la región apical de la raíz. Las células en naranja y amarillo son células del periciclo, adyacentes al floema y xilema respectivamente. e: epidermis, c: córtex, p: periciclo, i: célula inicial del córtex, Ph: floema, X: xilema.

Tomado de Dubrovsky y Shishkova, 2007 (A, B); De Smet *et al*, 2006 (C).

1.2 Organización histológica de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* puede dividirse longitudinalmente en tres zonas: la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación (Figura 1A). La zona meristemática está localizada en la punta de la raíz y se compone en su mayor parte de células que potencialmente presentan una gran actividad proliferativa. Adyacente a esta zona, se encuentra la región de elongación, en la cual las células de los diferentes tejidos se alargan hasta alcanzar su longitud máxima. La región más alejada de la punta de la raíz se denomina zona de diferenciación, en la que se encuentran las células maduras (Dolan *et al.*, 1993).

La organización radial de la raíz esta generada por una división predecible de células iniciales y una subsecuente adquisición de identidad celular. En plano transversal, hay tres capas radiales (de afuera hacia adentro: epidermis, cortex y endodermis) que rodean al cilindro central (Figura 1) (Scheres *et al.*, 1995). Cada tejido forma filas longitudinales de células que pueden ser rastreadas hasta las células iniciales, localizadas en el meristemo apical de la raíz (Malamy and Benfey, 1997). La organización de los tejidos de la raíz lateral es similar a la de la raíz primaria. Sin embargo, en la raíz lateral el número de filas celulares de cada tejido es variable (Dolan *et al.*, 1993).

1.3 Desarrollo de primordios de raíces laterales.

Usualmente la iniciación de las raíces laterales se da después de la germinación sin embargo, la iniciación de las raíces laterales puede originarse desde el desarrollo de la radícula en el embrión como ocurre en *Cucumis sativum* (Dubrovsky y Rost, 2003). En las plantas angiospermas y gimnospermas, las raíces laterales se forman a partir del periciclo (la capa más externa del cilindro central), mientras que en los helechos provienen de la endodermis. En algunas angiospermas como *Arabidopsis thaliana*, la endodermis y el cortex de la raíz parental también contribuyen durante las etapas tempranas del desarrollo en la formación del primordio de la raíz lateral, además del periciclo. Sin embargo, el tejido derivado a partir de la endodermis y el cortex se pierde cuando las raíces laterales emergen, y por consiguiente sólo se considera al periciclo como el tejido que da origen a las raíces laterales (Dubrovsky and Rost, 2003).

En *Arabidopsis thaliana*, como en muchas otras especies de plantas, el inicio de raíces laterales tiene lugar en la zona de diferenciación, en el periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2000; Beeckman *et al.*, 2001) a una distancia de entre 3 y 8 mm de la punta de la raíz (Dubrovsky *et al.*, 2001). Dicho proceso de iniciación en la formación de raíces laterales procede de un pequeño número de células llamadas células fundadoras, situadas en el periciclo de la raíz adyacentes a los polos del xilema (Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2001). Las células fundadoras se definen como aquellas que adquieren un destino de desarrollo diferente al de la célula parental (Dubrovsky *et al.*, 2000; 2001) y están bajo un programa

definido de divisiones celulares que dan origen a un primordio de la raíz lateral (Malamy and Benfey, 1997; Dubrovsky *et al.*, 2001). La formación de raíces laterales puede ser dividida en tres fases principales: la especificación de la célula fundadora, la formación del primordio y la activación del meristemo post emergencia (Celenza *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995; Malamy and Benfey, 1997; Dubrovsky *et al.*, 2008). También se ha propuesto una cuarta etapa la de post-emergencia (Zhang y Forde, 2000; De Smet *et al.*, 2003). El patrón de división celular durante el desarrollo de los nuevos primordios es muy diferente al que ocurre durante la formación de la raíz primaria (Casimiro *et al.*, 2001). Se ha demostrado que longitudinalmente una célula puede dar lugar a un primordio y que tres células fundadoras transversalmente son suficientes para dar lugar a un primordio comenzando la división casi sincrónicamente (Dubrovsky *et al.*, 2001). Alternativamente, longitudinalmente dos células fundadoras también pueden participar en la formación de un primordio (Dubrovsky *et al.*, 2001). Por lo tanto, la iniciación de los primordios a partir de las células fundadoras puede ser de dos tipos: longitudinal-bicelular y longitudinal unicelular. La iniciación longitudinal-bicelular, implica la presencia de divisiones asimétricas de dos células adyacentes en la misma fila del periciclo, a lo largo de la raíz, mientras que la iniciación longitudinal-unicelular involucra la división de una sola célula en una fila del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2001). El proceso del desarrollo de los primordios de las raíces laterales se divide en 7 etapas que abarcan el proceso de iniciación, la organización del meristemo y adicionalmente la emergencia de la raíz lateral que, como se mencionó anteriormente, involucra un patrón de división celular y características anatómicas específicas. La emergencia de la raíz lateral se debe principalmente a la expansión de las células del primordio de la raíz lateral mediante divisiones periclinales y anticlinales (Malamy and Benfey, 1997). Generalmente, los primordios de las raíces laterales se inician en sentido acropétalo, a lo largo de la raíz parental, por lo que los primordios más jóvenes se encuentran próximos a la punta de la raíz parental; mientras que los primordios más desarrollados son los más alejados. Después de la emergencia de la raíz lateral, ésta sigue creciendo a través de la división de las células en la punta pertenecientes al meristemo apical funcional en la raíz lateral así como por la elongación celular (Malamy and Benfey, 1997).

En *Arabidopsis*, el inicio del primer evento en la iniciación de la raíz lateral es espacial y temporalmente asincrónico y se pueden encontrar células adyacentes al protoxilema en fase G2 del ciclo celular y otras que permanecen en la fase G1 (Beeckman *et al.*, 2001). El tiempo que toma el ciclo celular del periciclo en el meristemo, y el requerido por las células del periciclo para desplazarse del meristemo y empezar la iniciación de un primordio de la raíz lateral, es aproximadamente el mismo, en promedio 14 h a 20°C. Esto significa que en contraste con otros tipos celulares, las células del periciclo opuestas al protoxilema continúan el ciclo celular fuera del meristemo (Dubrovsky *et al.*, 2000).

Debido a que la inhibición del transporte polar de auxinas bloquea la primera división formativa del desarrollo de raíces laterales, se sugirió que la regulación del ciclo celular en el periciclo adyacente a los polos del xilema depende del transporte basipetalo de auxinas (Casimiro *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la auxina promueve la iniciación de la raíz lateral por la estimulación del ciclo celular a la transición de G1 a S (Himanen *et al.*, 2002; Dubrovsky *et al.*, 2008).

1.4 Principales fitohormonas involucradas en el desarrollo del primordio de la raíz lateral.

Las fitohormonas se definen como un grupo de sustancias orgánicas, que se forman de manera natural, que pueden influenciar varios procesos fisiológicos en estos organismos. Las fitohormonas influyen principalmente en el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular, por lo tanto están involucradas en varios procesos del desarrollo vegetal (Davies, 2004). Las auxinas, las citocininas y otras fitohormonas tienen un papel muy importante en el desarrollo de las raíces laterales.

1.4.1 Auxinas.

La fitohormona auxina desempeña una función muy importante en el desarrollo y crecimiento de la planta, ya que se encuentra involucrada en la regulación de varios procesos del desarrollo como la elongación del tallo, la dominancia apical, la iniciación y elongación de las raíces laterales, el desarrollo de los frutos y el crecimiento regulado por fototropismo y gravitropismo, entre otros (Buchanan *et al.*, 2000; Leyser, 2002).

Las auxinas y su transporte polar tienen un papel central en la formación de las raíces laterales y en la definición de la polaridad de tejidos y órganos vegetales. Las proteínas transportadoras de eflujo llamadas PINFORMED (PIN), y de influjo AUX/LAX, están involucradas en el transporte polar de auxina (Weijers D. *et al.*, 2008). La localización asimétrica y expresión diferencial de las proteínas PIN juega un papel importante en el establecimiento de un gradiente de respuesta a auxinas durante la iniciación y desarrollo de los primordios y en la formación de raíces laterales (Benková *et al.*, 2003). La localización de las raíces laterales presenta una fuerte tendencia a emerger en el lado convexo de las curvas de la raíz primaria (Fortin *et al.*, 1989) y se ha demostrado que la curvatura de la raíz induce un nivel más alto de respuesta a auxinas en el lado convexo de la curva, donde la abundancia y posición de los transportadores de auxinas restringe esta respuesta a la zona competente para la formación de la raíz lateral (Laskowski *et al.*, 2008). La acumulación local de auxinas en células del periciclo adyacentes al protoxilema es una señal necesaria y suficiente para adquirir la identidad de célula fundadora de raíces laterales (Dubrovsky *et al.* 2008) así como la activación de divisiones celulares en el periciclo (Woodward and Bartel, 2005), siendo la especificación de la célula fundadora el evento detectable más temprano (Dubrovsky *et al.* 2008).

1.4.2 Citocininas.

Las citocininas son fitohormonas que se caracterizan principalmente por promover la división celular en presencia de auxinas, derivan del precursor adenina e influyen en otras funciones importantes como el desarrollo de órganos, la dominancia apical, la formación y actividad del meristemo apical del brote (Buchanan *et al.*, 2000). Plantas con deficiencia de citocininas por la sobreexpresión de genes para una citocinina oxido/reductasa, que degrada a la citocinina, presentan una mayor producción de raíces laterales y adventicias, así como una elongación más rápida de este órgano (Werner *et al.*, 2003). Se ha reportado que las citocininas inducen la inhibición de la iniciación y formación de las raíces laterales (Withman *et al.*, 1980), esto ocurre debido a que las células del periciclo adyacentes a los polos del protoxilema son sensibles a citocininas solo en etapas tempranas, pero insensibles en etapas más avanzadas. La sensibilidad a citocininas específica de las células fundadoras podría estar relacionada con la modificación del gradiente de respuesta a auxinas mediante la perturbación de la expresión de los genes PIN (Laplaze *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las citocininas podrían estar controlando además de la formación de las raíces laterales, el tiempo de transición en la diferenciación celular de células meristemáticas de la raíz (Ioio *et al.*, 2007).

1.5 Regulación genética de la iniciación del primordio de la raíz lateral.

Todavía no se conoce bien, como es que las auxinas activan ciertas células del periciclo para inducir la formación de los primordios de la raíz lateral; por lo que el análisis de mutantes afectadas en la formación de las mismas ha proporcionado evidencia sobre el papel de las auxinas en la formación del primordio de la raíz lateral. Se sabe que cuando los genes necesarios para la señalización de las auxinas son mutados (mutantes *axr1y aux1*), las plantas resultantes son deficientes en la iniciación de primordios de raíces laterales, y/o con sensibilidad reducida, tal como *axr4*, que produce pocas raíces laterales (Hobbie and Estelle, 1995). De igual manera en la doble mutante *arf7arf19* la formación de raíces laterales y la iniciación de raíces laterales esta casi enteramente bloqueada (Wilmoth *et al.*, 2005). Por el contrario, mutantes como *superroot sur1/alf1/rty1* que sobreproducen auxinas, incrementan los eventos que dan lugar a la formación de primordios de raíces laterales (Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995).

A pesar de la existencia de una gran cantidad de mutantes que tienen afectado el desarrollo de la raíz, se conocen muy pocos genes esenciales involucrados en el proceso de iniciación de la raíz lateral; El gen *ALF4 (ALTERED LATERAL ROOT FORMATION 4)* auxina-autónomo, cuya mutante *alf4-1* no forma primordios de raíces laterales, inclusive después de la adición de auxinas (Celenza *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 2004). El gen *LINI (LATERAL ROOT INITATION 1)* codifica para un transportador de nitrato de alta afinidad

NRT2.1. La mutante *lin1* es capaz de crecer bajo condiciones de alta relación sacarosa/nitratos y vencer la represión de la iniciación de las raíces laterales por altas concentraciones de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo (Malamy y Ryan, 2001; Malamy *et al.*, 2005). El gen *HOBBIT* que codifica para CDC27B, una subunidad del complejo promotor de la anafase (APC/C) es requerido para la formación del meristemo de la raíz (Willemsen *et al.*, 1998; Perez-Perez *et al.*, 2008). El gen *SLR* (*SOLITARY ROOT 1*) codifica para un represor transcripcional de la familia AUX/IAA, la proteína IAA14, (AUX/IAA: Auxin/Indole-3-Acetic Acid). La proteína IAA14 reprime a ARF7 y ARF19 que son activadores transcripcionales necesarios para el desarrollo de las raíces laterales. En la planta mutante *slr* hay escasos eventos de iniciación por la falta de activación de las células fundadoras del periciclo (Fukaki *et al.*, 2002; Fukaki *et al.*, 2005a, b).

2 ANTECEDENTES

Considerando la importancia de las raíces laterales para el mantenimiento de las plantas y la escasez de información acerca de la regulación del desarrollo de estos órganos, es de suma importancia utilizar todas las herramientas posibles para determinar qué genes participan en este proceso de diferenciación.

Sundaresan *et al.*, (1995) reportaron el uso del sistema de dos elementos transponibles, el sistema Activador/Disociador (Ac/Ds) derivado del maíz Sundaresan lo utilizaron por primera vez en *A. thaliana* para crear una colección de genes interrumpidos por este transposón (“gene trap”) y una colección de mutantes para identificar elementos reguladores en cis (“enhancer trap”). Estas colecciones públicas incluyen, 19 237 líneas de tipo “gene trap” y 14 262 líneas de tipo “enhancer trap”. Estas colecciones se han utilizado en el análisis funcional de genes en *Arabidopsis* y en otras plantas (Martienssen, 1998; Sundaresan *et al.*, 1999). El sistema Ac/Ds permite la integración de elementos transponibles en el genoma causando mutaciones al azar dentro de regiones codificantes o zonas cercanas a las regiones regulatorias de genes. El sistema Ac/Ds utiliza dos elementos transponibles independientes, el elemento Ac autónomo y el elemento Ds no autónomo. El elemento Ac es inmovilizado mediante la remoción de sus secuencias repetidas invertidas en la construcción llamada Ac (Figura 2). La construcción Ac lleva el promotor fuerte 35S, para transcribir de manera fuerte y constitutiva la enzima transposasa. La construcción Ds lleva el gen reportero que codifica para la enzima β glucuronidasa y el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina. Las líneas parentales que llevan el elemento inmóvil Ac son cruzadas con plantas que llevan el elemento Ds no autónomo para permitir la transposición del elemento Ds. (Figura 2). Existen dos versiones de la construcción Ds para generar las líneas transgénicas, la construcción DsG y la construcción DsE (Figura 2). Las líneas transgénicas de tipo “gene trap” llevan la construcción DsG que no tiene un promotor que regule su expresión, y contienen una secuencia aceptora que evita su eliminación durante el “splicing” del mRNA en caso de que se haya integrado dentro de un intrón (Acosta-García y Vielle-Calzada 2004). Las mutantes de tipo “enhancer trap” llevan la construcción DsE que contiene un promotor mínimo fusionado a un gen reportero por lo que si este fragmento se integra cerca de un “enhancer”, se promoverá la expresión del gen reportero en algún órgano, tejido o en cierto tipo de células (Campisi *et al.*, 1999). Los “enhancers” son secuencias que activan la transcripción, no necesitan estar cerca del sitio de inicio de la transcripción, son activos en cualquier orientación respecto a su blanco y participan en la regulación específica tisular o temporal (Lewin, 1997). El patrón de expresión de GUS permite seleccionar las líneas transgénicas de interés mediante su expresión temporal y/o tejido específica. Las construcciones Ac y Ds fueron integradas en vectores T-DNA y llevan el gen IAAH que codifica para la enzima ácido indolacetamida hidrolasa que es utilizada como marcador de selección negativa. Cuando las plántulas son

germinadas en medio suplementado con naftaleno acetamida (NAM) no crecen debido a la conversión de NAM a naftaleno y ácido acético en concentraciones tóxicas. El gen IAAH permanece en los bordes de la construcción Ds después del evento de transposición. Para prevenir movilizaciones posteriores, la construcción Ac y los restos de la construcción Ds son transferidos a otras plantas mediante segregación y selección negativa de las plantas utilizando medio de cultivo suplementado con NAM (Sundaresan *et al.*, 1995). La selección negativa por NAM también se utiliza para eliminar las plantas con inserciones muy cercanas entre ellas que dificulte su segregación en estudios posteriores.

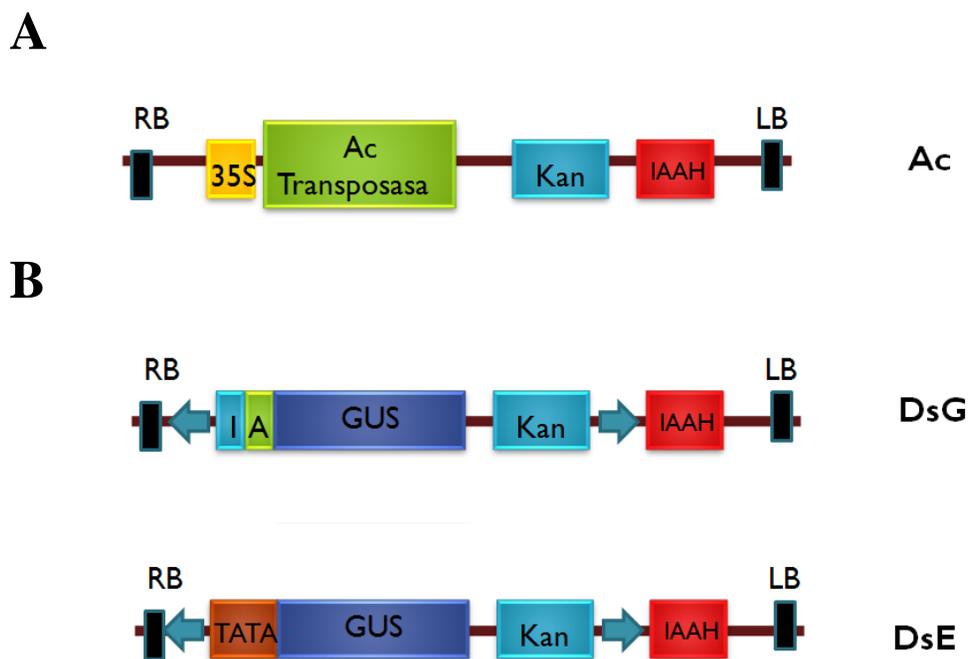


Figura 2. Sistema Ac/Ds para generar líneas transgénicas de tipo “gene trap” y “enhancer trap”. El sistema Ac/Ds utiliza dos elementos transponibles independientes, el elemento Ac y el elemento Ds. **A.** En la generación de líneas de ambos tipos se utiliza la construcción Ac; en la generación de líneas de tipo “enhancer trap” se utiliza la construcción DsE y en las de tipo “gene trap” la de tipo DsG **B.** Las construcciones Ds llevan el gen reportero que codifica para la enzima β glucuronidasa (cuadro azul oscuro) y el gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa (NPTII) que confiere resistencia a kanamicina (cuadro azul claro). La construcción Ac lleva el promotor de expresión fuerte y constitutiva 35S (cuadro amarillo), para transcribir constitutivamente la enzima transposasa (cuadro verde). Adicionalmente, las construcciones Ac, DsE y DsG llevan el gen IAAH que codifica para la enzima ácido indolacetamida hidrolasa (IAAH; cuadro rojo). Las plántulas transgénicas que llevan el gen IAAH y que son germinadas en medio de cultivo suplementado con naftaleno acetamida (NAM) no crecen debido a la conversión de NAM a ácido acético y naftaleno en concentraciones tóxicas de ácido acético en el medio de selección. Las flechas en las construcciones Ds representan las secuencias repetidas invertidas del transposon; los cuadros pequeños verdes I y A de la construcción DsG representan secuencias donadoras (I) yceptoras (A) y el cuadro café en la construcción DsE representa un promotor mínimo (caja TATA). Tomado de Acosta-García y Vielle-Calzada, 2004.

Mientras la mutagénesis por T-DNA genera integraciones inmóviles y estables, los transposones pueden ser removidos del sitio de inserción para revertir un fenotipo potencial. Esta movilidad puede confirmar efectos de las mutaciones causadas por las inserciones (Petersen *et al.*, 2000). Una ventaja del uso de mutantes insercionales es que permite la determinación de genes que son difíciles de aislar (genes redundantes para la misma función o que exhiben una función discreta en diferentes tiempos de desarrollo) ya que las líneas son seleccionadas con base en su patrón de expresión y no por su fenotipo mutante (Campisi *et al.*, 1999). También las líneas obtenidas con esta metodología pueden utilizarse como marcadores de células y tejidos específicos, y por lo tanto, es posible elucidar el desarrollo de órganos complejos que consisten de una variedad de tipos celulares similares agrupados.

El aislamiento de las secuencias flanqueantes de las inserciones ya sea de tipo T-DNA o inserciones tipo Ds mediante TAIL-PCR se está convirtiendo en un método popular para la identificación y caracterización de líneas transgénicas insercionales, ya que no requiere demasiada manipulación del DNA genómico y permite la identificación de la inserción de manera rápida e incluso la identificación múltiple, como el trabajo reportado por Raina *et al.*, en el 2002 quien identificó la posición de las inserciones en 260 líneas transgénicas mediante transposones (Ac/Ds). Esta metodología se ha utilizado también para identificar genes únicos relacionados con la meiosis y el desarrollo de los óvulos (Grossniklaus, 1998; Acosta-García and Vielle-Calzada, 2004), entre otros (Seki *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1995; Tsugeki *et al.*, 1996; Parinov *et al.*, 1999; Tissier *et al.*, 1999; Tsugeki and Fedoroff, 1999, Ito *et al.*, 2004, etc.).

Una colección de 2,000 líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* fue generada en el laboratorio del Dr. Vielle-Calzada en el CINVESTAV, campus Irapuato del IPN, México usando un sistema Ac/Ds implementado por Sundaresan *et al.* (1995). En colaboración con el Dr. Vielle-Calzada, el Dr. Aleš Soukup hizo un escrutinio de esta colección analizando la actividad de GUS en células del periciclo y en células de primordios de las raíces laterales. Para esto, se aclararon y analizaron raíces de 5 plantas de cada línea bajo el microscopio de contraste diferencial de interferencias u óptica de Nomarski. Como resultado de este escrutinio primario, fueron seleccionadas 50 líneas del tipo “gene trap” y 102 del tipo “enhancer trap”. Que son consideradas para estar afectando algún gen implicado en el desarrollo de raíces laterales.

3 HIPÓTESIS.

El patrón tejido específico de actividad de GUS en la línea transgénica seleccionada corresponde a ciertos genes relacionados con el desarrollo de raíces laterales.

4 OBJETIVOS GENERALES

- 1) Identificar y caracterizar una línea transgénica cuyo patrón de actividad de GUS sea detectado durante la formación de raíces laterales. .

5 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar detalladamente los patrones de actividad de GUS de plántulas de 12 líneas transgénicas seleccionadas y realizar su caracterización fenotípica preliminar.
- Identificar una línea transgénica en relación a la iniciación de primordios de raíces laterales.
- Realizar un análisis genético de dicha línea transgénica.
- Estandarizar la técnica de TAIL-PCR.
- Identificar y aislar mediante TAIL-PCR la posición de la inserción en el genoma de la línea transgénica seleccionada.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Las semillas se obtuvieron del laboratorio del Dr. Jean Philippe Vielle-Calzada (CINVESTAV), las que posteriormente se sometieron a escrutinio para seleccionar aquellas con actividad de GUS en células del periciclo. La progenie de estas plantas seleccionadas se utilizó durante este proyecto de investigación.

6.2 Esterilización de las semillas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron empaquetadas en conos de papel filtro, y esterilizadas utilizando hipoclorito de sodio al 1.2% con 0.08% de Tritón X-100 en agua destilada. Las semillas se incubaron en la solución de cloro durante 10 minutos, se lavaron 4 veces con agua destilada estéril durante 10 minutos. Con el fin de promover y sincronizar la germinación, las semillas se incubaron a 4°C durante 48 h en oscuridad. Para proceder a la germinación *in vitro*, en condiciones de luz y temperatura controladas.

6.3 Germinación *in vitro*.

Las semillas previamente esterilizadas, se sembraron en cajas de Petri estériles con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 0.2X, suplementado con 1% de sacarosa y vitaminas bajo condiciones de esterilidad. Para la selección de plantas resistentes a kanamicina, se adicionaron 50µg/ml de kanamicina al medio de cultivo. Las plantas fueron crecidas en cajas orientadas verticalmente, excepto las plantas utilizadas en el experimento de selección con kanamicina que fueron crecidas en cajas colocadas en posición horizontal durante 11 días, con la finalidad de poder crecer más plantas en una caja. Todas las plantas se trasladaron a cámaras de crecimiento con ambiente controlado, con un fotoperiodo de 16h luz/8 h oscuridad y temperatura de 23°C.

6.4 Método para inducción de callos.

Los explantes utilizados se tomaron de hojas de plantas de 15-18 días de edad, los explantes fueron cortados en pequeñas piezas de aproximadamente 0.5 cm y transferidos a cajas de Petri estériles con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 0.2X, suplementado con 2% de glucosa, vitaminas, 50µg/ml de kanamicina y 2,4-

Diclorofenoxiacético e IAA en una proporción 0.5/0.05 según descrito por Valvenkens (1988).

6.4 Método de tinción histoquímica para actividad de GUS.

Se colocaron las muestras en acetona fría al 90% por 20 minutos, durante este periodo se mantuvo todo el material en hielo para evitar la evaporación de la acetona, se retiró la acetona al 90% y se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente retirando las soluciones de lavado en cada ocasión; para el primer lavado la muestra se sumergió en 1 mL de la solución de lavado I durante los primeros 2 minutos y se añadieron otros 2 mL de solución de lavado I para los 8 minutos restantes, para el segundo lavado la muestra se sumergió en 2 o 3 mL de la solución de lavado II y para el tercer lavado la muestra se sumergió en 2 o 3 mL de la solución de lavado I, posteriormente la muestra se sumergió en solución de tinción y se incubó a 37°C durante 3-18 hrs. Se selló el vaso de precipitado con parafilm, se retiró la solución de tinción, se lavó la muestra durante 1 o 2 minutos en 2 o 3 mL de la solución de lavado I a temperatura ambiente y finalmente se aclaró la muestra (El contenido de las soluciones I, II y de tinción se describe en Apéndice I).

6.6 Método de aclaración de raíces.

Para la observación al microscopio se utilizó el método de aclaración de raíces descrito por Malamy y Benfey (1997). Las raíces fueron tratadas con una solución de metanol (20%) acidificado (0.24N HCl) a 62°C durante 40 minutos. Después las raíces fueron tratadas con una solución básica compuesta por 0.7% de NaOH en 60% de etanol a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente fueron rehidratadas con diferentes diluciones de etanol en agua; 40%, 20% y 10% de 1 a 4 días para cada tratamiento. Después se adicionó glicerol al 50 % a las muestras y finalmente se montaron en portaobjetos con glicerol al 50%. Las muestras ya montadas fueron examinadas a través de microscopía de contraste diferencial de interferencias (Nomarski).

6.7 Crecimiento en suelo

Para el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana* se utilizó un sustrato estéril de la compañía SUNGRO Metro mix 200 sunshine (Contiene 50-60% de vermiculita, Canadian sphagnum peatmoss, perlita grado horticultura, caliza dolomítica para ajustar el pH y un agente para mantener la humedad. El transplante se llevó a cabo cuando las plántulas germinadas *in vitro* habían formado las primeras hojas verdaderas. Las macetas se colocaron en charolas de plástico delgado y se cubrieron para mantener condiciones de humedad adecuadas.

Las plantas se llevaron a cámaras de crecimiento vegetal con fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad a una temperatura de 24°C. Las plantas se mantuvieron con riegos con agua cada tercer día.

6.7.1 Aislamiento de líneas homocigotas a la resistencia a kanamicina.

Las semillas se esterilizaron y se germinaron *in vitro* en medio MS sólido conteniendo kanamicina. Las plántulas resistentes a kanamicina se pasaron a suelo y se permitió la autopolinización obteniéndose una segregación 3:1, una cuarta parte de la población (25%) será de tipo silvestre sin el transgen y serán sensibles al antibiótico, un 50% tendrá el transgén en un solo alelo y serán resistentes a kanamicina, y un 25% portará el transgén en ambos alelos del mismo locus, y serán homocigotas transgénicas resistentes al antibiótico. Las plántulas resistentes a kanamicina se pasaron a suelo y se permitió la autopolinización para obtener la siguiente generación, 100-50 semillas de algunas plantas de esta generación se esterilizaron y se germinaron *in vitro* en medio MS sólido conteniendo kanamicina, de tal manera que en las plántulas homocigotas todas sus semillas germinaron permitiéndonos identificar la planta homocigota.

6.8 Extracción de DNA genómico.

Se extrajo DNA de acuerdo a Dellaporta (1985) utilizando plántulas de 3-6 semanas de edad, se añadieron 200 µL de regulador de extracción Dellaporta (EB) (Apéndice II) por 100 mg de muestra macerada, se obtuvo una mezcla homogénea mediante el uso del vortex y se añadió 50 µL de SDS al 20% para ~~se~~ ~~incubar~~ a 65 °C por 10 min. Posteriormente se añadió 130 µL de acetato de potasio 5M y se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo con 60 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 640 µL de isopropanol. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70 % frío (-20 °C). Se resuspendió la pastilla en 200 µL de BTE y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo con 200 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 450 µL de etanol absoluto. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. El siguiente paso fue lavar la pastilla con etanol al 70 % para después disolver la pastilla en 100 µL de TE. Después se incubó por 1 hr a 37 °C. Se agregaron 100 µL de acetato de sodio y 220 µL de etanol absoluto y se centrifugó por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70 %. Se secó a temperatura ambiente por 10 minutos y finalmente se resuspendió en 30 µL de TE. Se analizó en gel de agarosa al 1.0%. El DNA obtenido se conservó a -20 °C para su posterior utilización en la genotipificación.

6.9 TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995.)

Oligonucleótidos empleados

Se diseñaron oligonucleótidos específicos al borde 3' del inserto conocido en las líneas transgénicas utilizadas denominados Ds 3'1, Ds3'1b, Ds3'2 y Ds3'3, además se diseñaron oligonucleótidos degenerados de acuerdo a lo descrito por Liu *et al.*, 1995, denominados AD1 y AD2.

Posteriormente se realizaron las reacciones de PCR primaria, secundaria y terciaria en las condiciones descritas a continuación:

Reacción primaria (volumen final: 20 μ l).

		final
DNA	1 μ l	Aprox 250 ng
MgCl ₂ (25mM)	0.8 μ l	1,0 mM
10x PCR buffer	2 μ l	1X
10x dNTPs (10 mM)	0.4 μ l	200 nM
Ds5-1 or Ds3-1 (2 μ M)	10 μ l	1 μ M
AD2 (20 μ M)	2 μ l	2 μ M
H ₂ O c.b.p		20 μ l
Taq polymerase (5U/ μ l)	0.2 μ l	0,05U/ μ l

Condiciones utilizadas para reacción primaria:

Los tiempos están calculados para el termociclador original Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler; los tiempos entre paréntesis son para el modelo de termociclador Perkin Elmer 9600 y el MJ Research PTC 200.

95°C	2 min	
94°C	1 min	5 ciclos
62°C	1 min	
72°C	2.5 min	
94°C	1 min(30 sec)	1 ciclo
25°C	3 min	

ramp to 72°C	3 min	
72°C	2.5 min	
94°C	30 sec	15 superciclos
68°C	1 min	
72°C	2.5 min	
94°C	30 sec	
68°C	1 min	
72°C	2.5 min	
94°C	30 sec	
44°C	1 min	
72°C	2.5 min	
72°C	5 min	
4°C	Soak file	

Reacción secundaria (volumen final: 20 µl):

		Final
DNA	1µl de la reacción anterior sin diluir	
MgCl ₂ (25mM)	0.8 µl	1,0 mM
10x PCR buffer	2µl	1X
10x dNTPs (10 mM)	0.4µl	200 µM
Ds5-2 or Ds3-2 (2 µM)	10µl	1µM
AD2 (20 µM)	2µl	2 µM
H ₂ O c.b.p	3.6 µl	20µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.2 µl	0,05U/ µl

Condiciones utilizadas para reacción secundaria:

94°C	30 sec	15 superciclos
64°C	1 min	
72°C	2.5 min	
94°C	30 sec	
64°C	1 min	

72°C	2.5 min
94°C	30 sec
44°C	1 min
72°C	2.5 min
72°C	5 min
4°C	Soak file

Reacción terciaria (volumen final: 20 μ l)

		Final
DNA	1 μ l de la reacción anterior sin diluir	
MgCl ₂ (25mM)	0.8 μ l	1,0 mM
10x PCR buffer	2 μ l	
10x dNTPs (10 mM each stock)	0.4 μ l	200 μ M
Ds5-2 or Ds3-2 (2 μ M)	10 μ l	1 μ M
AD2 (20 μ M)	2 μ l	2 μ M
H ₂ O c.b.p		20 μ l
Taq polymerase (5U/ μ l)	0.2 μ l	0,05U/ μ l

Condiciones utilizadas para reacción terciaria:

92°C	5min	
94°C	1 min	25 to 30 ciclos
37°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	Soak file	

Se hizo una electroforesis de 7-9 μ L de los productos de reacción en un gel de agarosa al 1%.

6.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700. En estos experimentos se utilizaron diferentes combinaciones de los oligonucleótidos llamados Ds 3', proximal y distal, estos hibridan con cadenas opuestas y en regiones flanqueantes al fragmento de DNA que se deseaba amplificar. El DNA que se usó como cadena patrón, junto con los oligonucleótidos correspondientes se sometieron a una serie de ciclos de desnaturalización, unión y extensión del oligonucleótido, por acción de una DNA polimerasa termoestable, resultando en la amplificación del fragmento de DNA de interés, cuyos extremos quedaron definidos por la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

En un tubo Eppendorf de 200 μ L para PCR se depositó la siguiente mezcla de reacción: 50 pM de oligonucleótido sentido (2 μ L), 50 pM de oligonucleótido antisentido (2 μ L), 100 ng DNA genómico de plantas de 13 días de edad, 11 μ L de H₂O HPLC, 0.4 μ L de dNTPs, 0.8 μ L de MgCl y 0.2 μ L de DNA polimerasa.

Las condiciones para la amplificación de la región donde se encuentra la inserción en la línea transgénica MGT180 L9 fueron las siguientes:

desnaturalización	<u>94°C 5 min</u>	} 30-35 ciclos
	94°C 1 min	
alineamiento	48°C-60°C 1.5 min	
extensión	<u>72°C 2.30 min</u>	
	72°C 10 min	

6.11 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Rusell (2001). La agarosa se preparó al 1% en amortiguador TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 5 mM pH 8). La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 80 V/cm en una cámara de electroforesis con el mismo amortiguador. Para la visualización de los fragmentos de DNA, se añadió a la agarosa bromuro de etidio hasta una concentración final de 0.5 μ g/mL, observándose las bandas del DNA que fluorescen al irradiar el gel con luz ultravioleta. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con marcadores de peso moleculares comerciales.

6.12 Purificación de plásmido mediante columnas.

La obtención de DNA plasmídico de alta pureza para secuenciación, se realizó mediante columnas Marligen Bioscience Mini kit(50) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Marligen Bioscience).

6.13 Condiciones de crecimiento para *Escherichia coli*.

6.13.1 Medio Luria Bertani (LB).

Este medio contiene: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl para un litro de medio. Para tener medio sólido se adicionaron 20 g de agar bacteriológico. Para seleccionar las bacterias portadoras de plásmido con resistencia a ampicilina, se adicionó 1 µg/mL de este antibiótico.

6.13.2 Condiciones de crecimiento de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se crecieron en medio líquido LB a una temperatura de 37°C a 200 rpm en un agitador orbital marca LAB-LINE por 12 a 14 horas. En medio sólido la incubación se llevó a cabo a la misma temperatura de 37°C durante 12-14 horas. Para la selección de transformantes se crecieron en placas de medio LB con 1 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche.

6.14 Clonación del producto de PCR.

Se hizo la ligación del producto de PCR de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor, pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Figura 3), a un volumen final de 5 µl, por lo que se utilizó la mitad de cada uno de los componentes de la reacción de ligación sugerida por el fabricante pGEM[®]-T Easy Vector Systems:

Reacción de ligación: (Volumen final: 10 µl)

Agua estéril 2 µl
Buffer de ligación 10X 5 µl
pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng/µl) 1 µl
Producto de PCR reciente (~10 ng) 1 µl
T4 DNA Ligasa 1 µl

Se incuban las reacciones de ligación a 14°C por al menos 4 horas (preferentemente toda la noche).

6.15 Extracción del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó utilizando el protocolo de lisis alcalina de acuerdo a Sambrook y Russel (2001) como se describe a continuación: las colonias de *E. coli* seleccionadas se sembraron en 3 mL de medio LB-ampicilina líquido a 37°C durante 14 h en agitación constante a 180 rpm, se pasaron 1.5 mL a tubos Eppendorf centrifugando 1 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante quedando la pastilla a la cual se le adicionó 100 µL de GTE (Glucosa 20%, Tris-HCl pH8 1 M, EDTA pH8 0.5 M), se mezcló perfectamente en vortex, posteriormente se le adicionó 200 µL de SDS alcalino (SDS 20%, NaOH 10 N) se mezcló por inversión, se incubó no más de 5 min en hielo, el sobrenadante se precipitó con 150 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2, se incubó 10 min en hielo, se centrifugó por 15 min a 13,000 rpm se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se repitió el procedimiento en tres ocasiones, recuperándose el sobrenadante en un tubo nuevo se precipitó con 800 µl de etanol absoluto, centrifugándose por 15 min a 13,000 rpm., se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla 3 veces con etanol 80% dejándola secar y finalmente se resuspendió en 20 µL de buffer TE_{10/1} o agua destilada ultrapura.

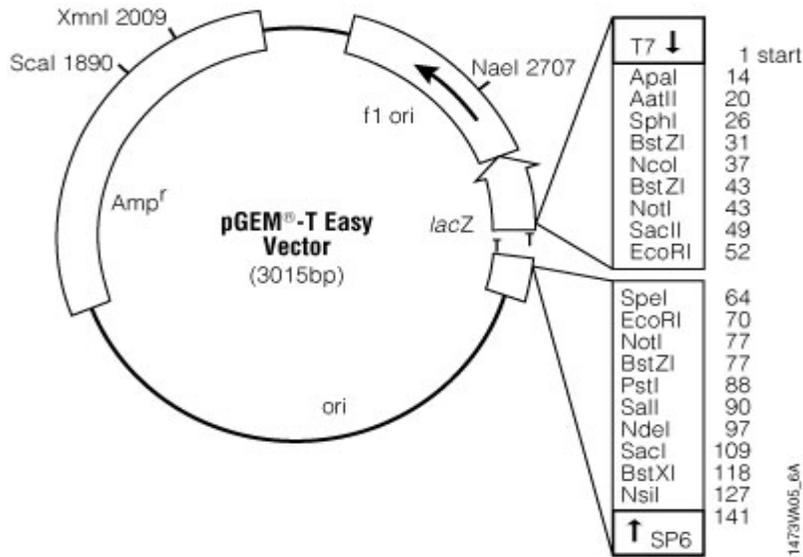
6.16 Transformación de células químicamente competentes de *E. coli*.

La transformación de células de *E. coli* químicamente competentes se realizó por el método de choque térmico descrito por Sambrook y Russell (2001) como se menciona a continuación: Se colocaron 50 µL de células químicamente competentes de *E. coli DH5α* en un tubo Eppendorf con 2 µL de plásmido. La mezcla se incubó en hielo 20 minutos, después se incubaron a 42 °C por 45 segundos, se volvieron a incubar en hielo por 2 minutos, posteriormente se incubaron por 1 hora y media a 37°C en 1 mL de medio LB líquido en un tubo Eppendorf en agitación y finalmente se sembraron las bacterias en medio sólido de selección, incubándose de 14-16 hrs a 37 °C.

6.17 Corte con endonucleasas de restricción.

Para cortar el DNA con enzimas de restricción se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante Invitrogen. La mezcla de reacción contenía una unidad de enzima por cada µg de DNA con el amortiguador de digestión a una concentración final recomendada por el proveedor. La mezcla se incubó por tres horas a 37°C.

A



B

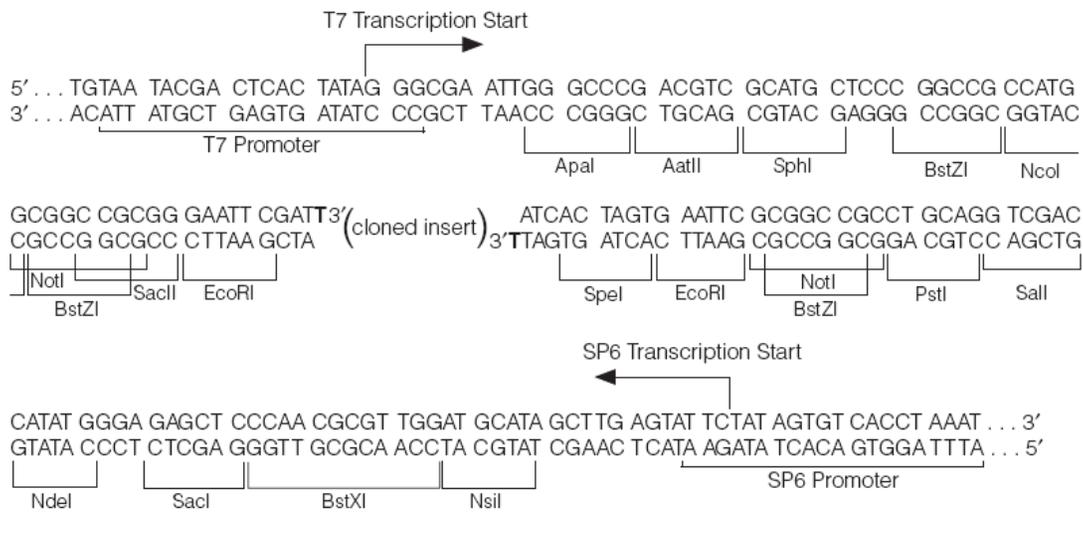


Figura 3. pGEM[®]-T Easy Vector. **A** El pGEM[®]-T Easy Vector es un vector de clonación linearizado de alto número de copias, contiene los promotores de la RNA polimerasa T7 and SP6 flanqueando la región de clonación y un sitio de reconocimiento para enzimas de restricción *EcoRI*, *BstZI* y *NotI* proporcionando sitios para digestiones específicas y permitiendo la liberación del inserto. Contiene además el gen de resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli*. **B** Secuencia del promotor y región de clonación del vector pGEM[®]-T Easy Vector.

7 RESULTADOS

Del escrutinio realizado por el Dr. Ales Soukup seleccionamos 12 líneas transgénicas en base a la información preliminar proporcionada del patrón de actividad de GUS presentada en células de periciclo y primordios de raíces laterales. De éstas, 10 son de tipo “gene trap” (MGT 22, MGT 180, MGT 303, MGT 307, MGT 511, MGT 512, MGT 521, MGT 582, MGT 606 y MGT 821) y 2 de tipo “enhancer trap” (MET 115 y MET 441). Para cumplir con el primer objetivo no se realizó un análisis genético de cada una de las líneas ya que las líneas seleccionadas son generación F5 lo que aumenta la probabilidad de homocigocidad y porque la línea que presente un patrón de actividad de GUS en etapas tempranas de desarrollo de primordios será prueba suficiente para su selección y estudio, si existen más inserciones se seguirá mediante segregación la inserción(es) que proporcionen la tinción en etapas tempranas de primordios.

7.1 Análisis detallado de los patrones de actividad de GUS en 12 líneas seleccionadas.

Se propagaron las plantas de las 12 líneas seleccionadas y se colectó la progenie de cada planta. Las semillas se esterilizaron y sembraron en cajas Petri, se tomaron plantas transgénicas de 9 y 13 días de edad y se determinó el tiempo específico óptimo para observar la actividad de GUS de estas líneas transgénicas. Durante este procedimiento se verificó la tinción a través de un estereoscopio cada 2-4 horas y se determinó el tiempo de incubación óptimo de 16 horas a 37°C.

Posteriormente se buscó un método de pre-tratamiento óptimo para monitorear la actividad de GUS; manteniéndose constante el mismo tiempo de incubación para los diferentes pretratamientos. Se realizaron pretratamientos con paraformaldehído, formalina ó acetona en aprox. 70 plantas de 9 líneas transgénicas diferentes de 9 ó 13 días de edad; al utilizar paraformaldehído o formalina como pretratamiento no se observaron diferencias notables, pero al compararlos con el pretratamiento con acetona se observó una mayor precipitación de producto histoquímico de color azul y mayor definición de la actividad de GUS. No se presentaron cambios en la localización ni en el tipo de tejido teñido, estos datos fueron consistentes tanto en la línea control (*DR5-GUS*, Figura 4) como en las líneas transgénicas (MGT 22, MGT 180, MGT 303, MET 441, Figura 5).

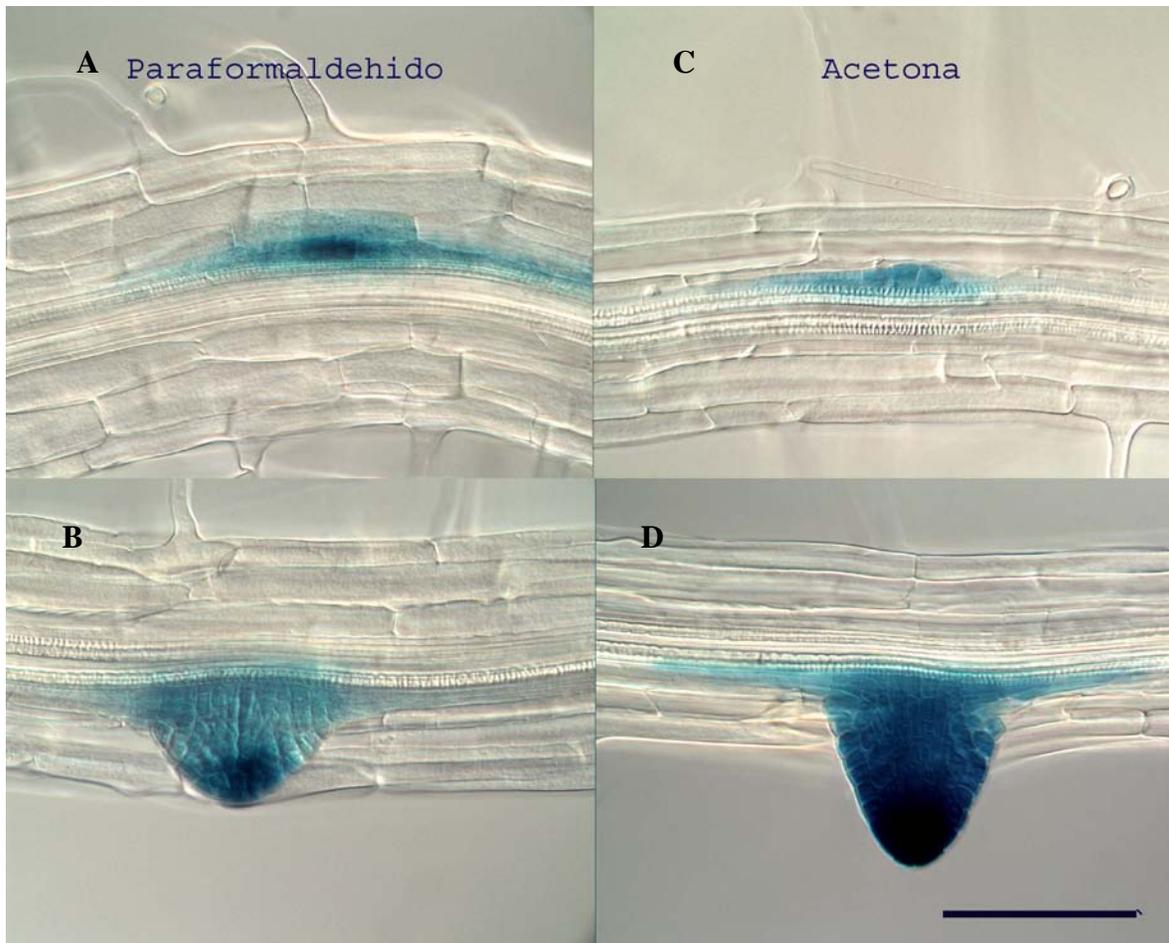


Figura. 4.- Efecto del pretratamiento con paraformaldehído y acetona en el precipitado de producto histoquímico resultado de la actividad de GUS en la línea transgénica DR5-GUS. A, B. Las plantas de la línea DR5-GUS fueron pretratadas con paraformaldehído por 20 min, la intensidad de la tinción se observó con mayor intensidad y con menor presencia de grumos en el pretratamiento con acetona. C, D. las plantas fueron pretratadas con acetona fría por 20 minutos. $n= 21$ de 9 días de edad. Escala: 100 μ m.

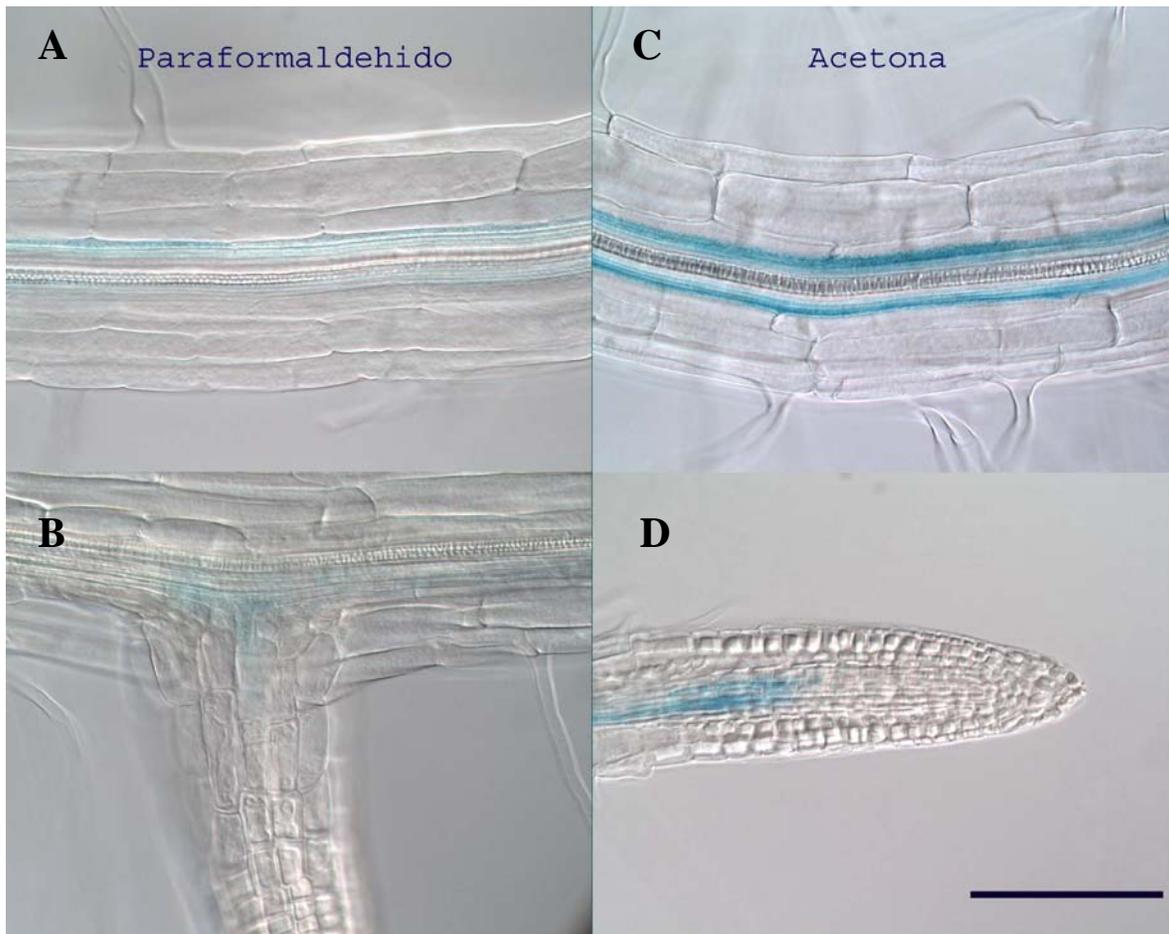


Figura. 5.- Efecto del pretratamiento con paraformaldehído y acetona en el precipitado de producto histoquímico resultado de la actividad de GUS en la línea transgénica MGT 22. A, B. Las plantas fueron pretratadas con paraformaldehído por 20 min. Las líneas transgénicas presentaron menor intensidad de tinción con ambos pretratamientos que el control *DR5-GUS*, sin embargo, se observa claramente una mayor intensidad y definición de la tinción en la línea transgénica pretratada con acetona. **C, D.** las plantas fueron pretratadas con acetona fría por 20 minutos. $n= 23$ plantas de 9 días de edad de 9 líneas transgénicas diferentes. **Escala:** 100 μ m.

Después de establecer un procedimiento óptimo de tinción histoquímica para detectar la actividad de GUS en estas líneas, iniciamos la caracterización detallada de cada una de las líneas transgénicas (Figuras 6 a 21) analizando entre 15 y 33 plantas de 9 y/o 13 días de edad para cada línea transgénica. El número de plantas analizadas se determinó según la complejidad del patrón de actividad de GUS observado en cada línea. La caracterización de cada línea analizada se describe a continuación.

7.1.1 MGT 22

En la parte aérea de plantas de la línea MGT 22 se observó tinción en tejidos vasculares de hojas cotiledóneas, hojas verdaderas y ápice del brote (Figura 6A), de igual manera en la raíz se observó tinción en tejidos del cilindro vascular a lo largo de toda la raíz primaria y raíces laterales, por lo tanto se puede decir que la línea MGT 22 presenta un patrón de tinción específico de tejido vascular en la planta completa. La tinción observada en la raíz es casi continua es decir, es raro observar regiones sin tinción a largo del cilindro central (Figura 6C y D) tanto en la zona de diferenciación como en la zona de elongación (Figura 6J). La intensidad de la tinción se observó más débil en zonas distales de las raíces laterales y raíz primaria y en algunas áreas la tinción fue específica del periciclo. Cuando la tinción fue de mayor intensidad principalmente en partes proximales de la raíz primaria y raíces laterales, se observó teñido el cilindro central completo. En zona apical de raíz primaria y raíces laterales se observaron teñidas algunas células del cilindro central de la zona meristemática y zona de elongación (Figura 6J). Fue raro encontrar primordios teñidos en etapas tempranas (Figura 6E), aunque estando el periciclo teñido fue difícil distinguir si la tinción se presenta cuando inicia el desarrollo del primordio de la raíz lateral o es propia de periciclo. En las zonas donde no hay tinción, los primordios en etapa temprana no están teñidos y en primordios en etapas avanzadas, fue posible encontrar algunas células teñidas en los bordes laterales de la base del primordio (Figura 6F). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre.

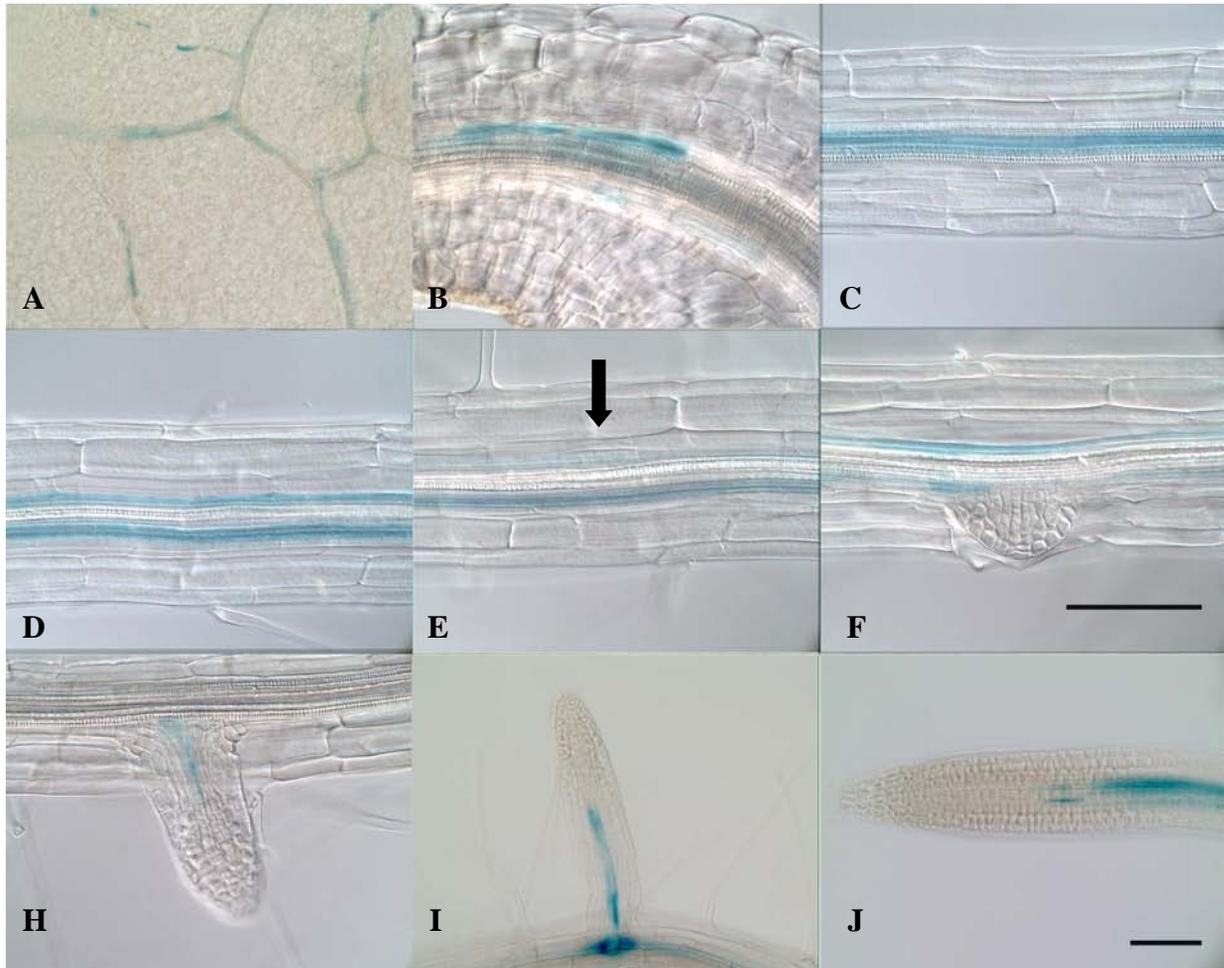


Figura. 6.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 22. A. Hoja cotiledónea. B. Hipocotilo. C. Parte distal de la raíz primaria. D. Parte distal de la raíz primaria, en una región diferente de la mostrada en C de la misma planta. E. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). F. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. H. Raíz lateral. I. Raíz lateral de otra planta. J. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μm . La escala en F es igual para A, B, C, D, E y H; la escala en J es igual para I. $n=23$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.2 MGT 303

En plantas de la línea MGT 303 la actividad de GUS fue muy específica, se observó únicamente en células de primordios de hojas verdaderas (Figura 7A) y este hallazgo fue similar en todas las plantas analizadas. A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre. Esta línea transgénica fue seleccionada porque la información proporcionada por el Dr. Ales indicó tinción específica de células de periciclo.

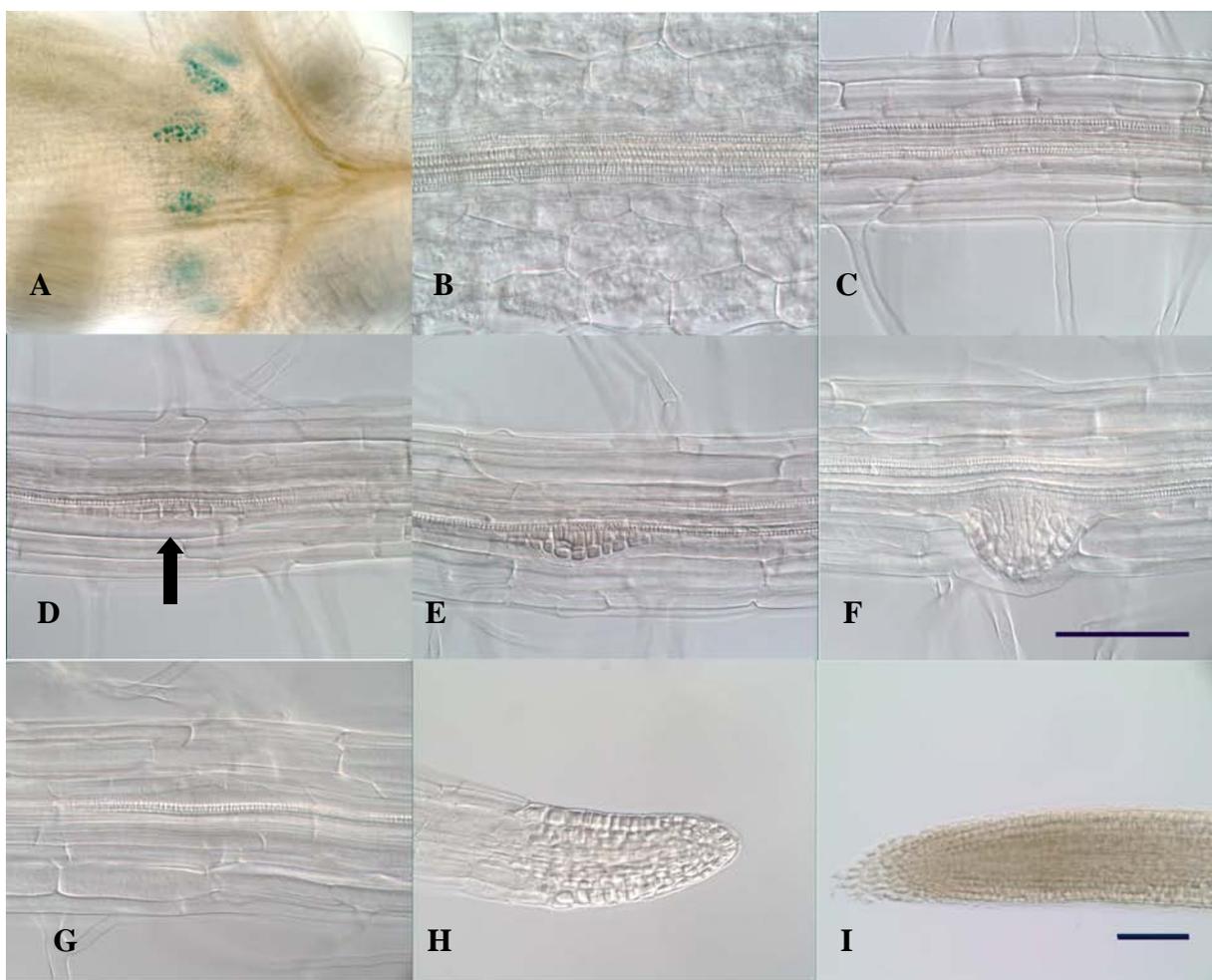


Figura. 7.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 303. A. Ápice del brote. B. Hipocotilo. C. Parte distal de la raíz primaria. D. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). E. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. F. Primordio emergido. G. Parte proximal de la raíz primaria. H. Meristemo apical de raíz lateral y I. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. La escala en F es igual para B, C, D, E, G y H; la escala en I es igual para A. $n=$ 19 plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.3 MGT 307

No se observó tinción en 25 plantas observadas de 9 y 13 días de edad (Figura 8). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre. Esta línea transgénica fue seleccionada porque la información proporcionada por el Dr. Ales indicó tinción de intensidad fuerte en floema, cortex y en primordios de raíces laterales en etapa avanzada.

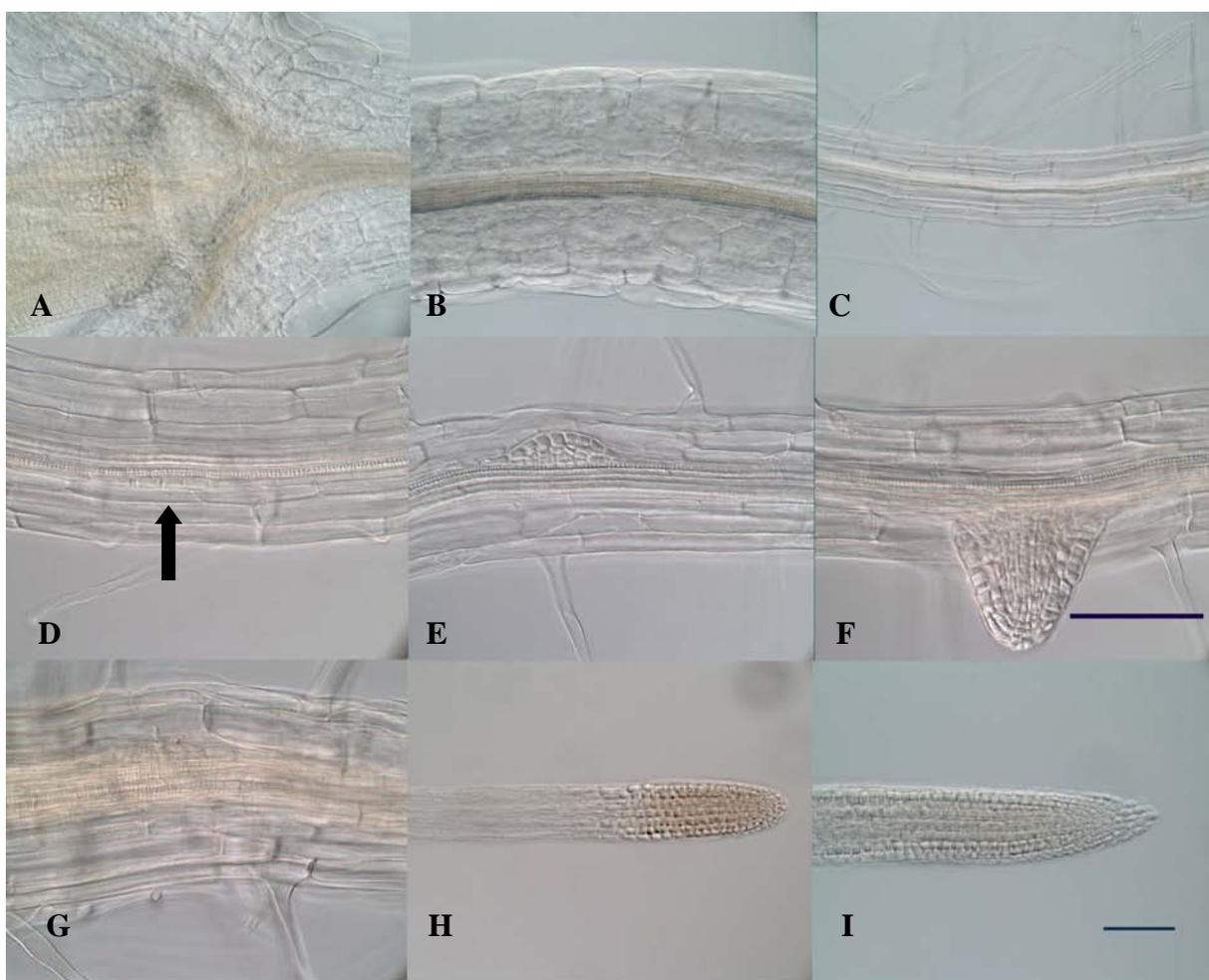


Figura. 8.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 307. A. Ápice del brote. B. Hipocotilo. C. Parte proximal de la raíz primaria. D. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). E. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. F. Raíz lateral. G. Primordio de raíz lateral arrestado. H. Meristemo apical de raíz lateral. I. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μm . La escala en F es igual para B, D, E, y G; la escala en I es igual para A, C y H. $n= 25$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.4 MGT 511

Las plantas de esta línea transgénica presentaron tinción en diferentes capas celulares de casi todos los órganos de la planta. En la parte aérea se observó tinción en cotiledones, en las espículas de las hojas verdaderas y en primordios de hojas verdaderas (Figura 9A y B). En hipocotilo se observó tinción difusa en varias capas celulares (Figura 9C). En la parte proximal de la raíz se observó una tinción de mayor intensidad que en la parte distal, en la parte proximal de la raíz primaria se observó en cortex, endodermis, periciclo y tejidos internos del cilindro central (Figura 9G), en la parte distal de la raíz primaria se observó tinción de menor intensidad en estas mismas capas. En etapas tempranas y etapas más avanzadas de desarrollo de primordios de raíces laterales la tinción se detectó en células de los bordes de la base de los primordios de raíces laterales (Figura 9D, E y F). En ápices de la raíz primaria y raíces laterales se observó tinción en algunas células de cofia lateral (Figura 9H e I). Adicionalmente esta línea transgénica presentó la característica de que algunas de sus células de periciclo fueron más cortas que las células de periciclo de la raíz de la planta de tipo silvestre (*Ler*), y presentó regiones donde las células del periciclo están desarrolladas y claramente visibles (Figura 10A, B y C) a diferencia de las células de periciclo de las plantas de tipo silvestre que son casi imperceptibles (Figura 10D), aunque también fue posible encontrar zonas donde el periciclo permaneció similar a las plantas de tipo silvestre. A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre.

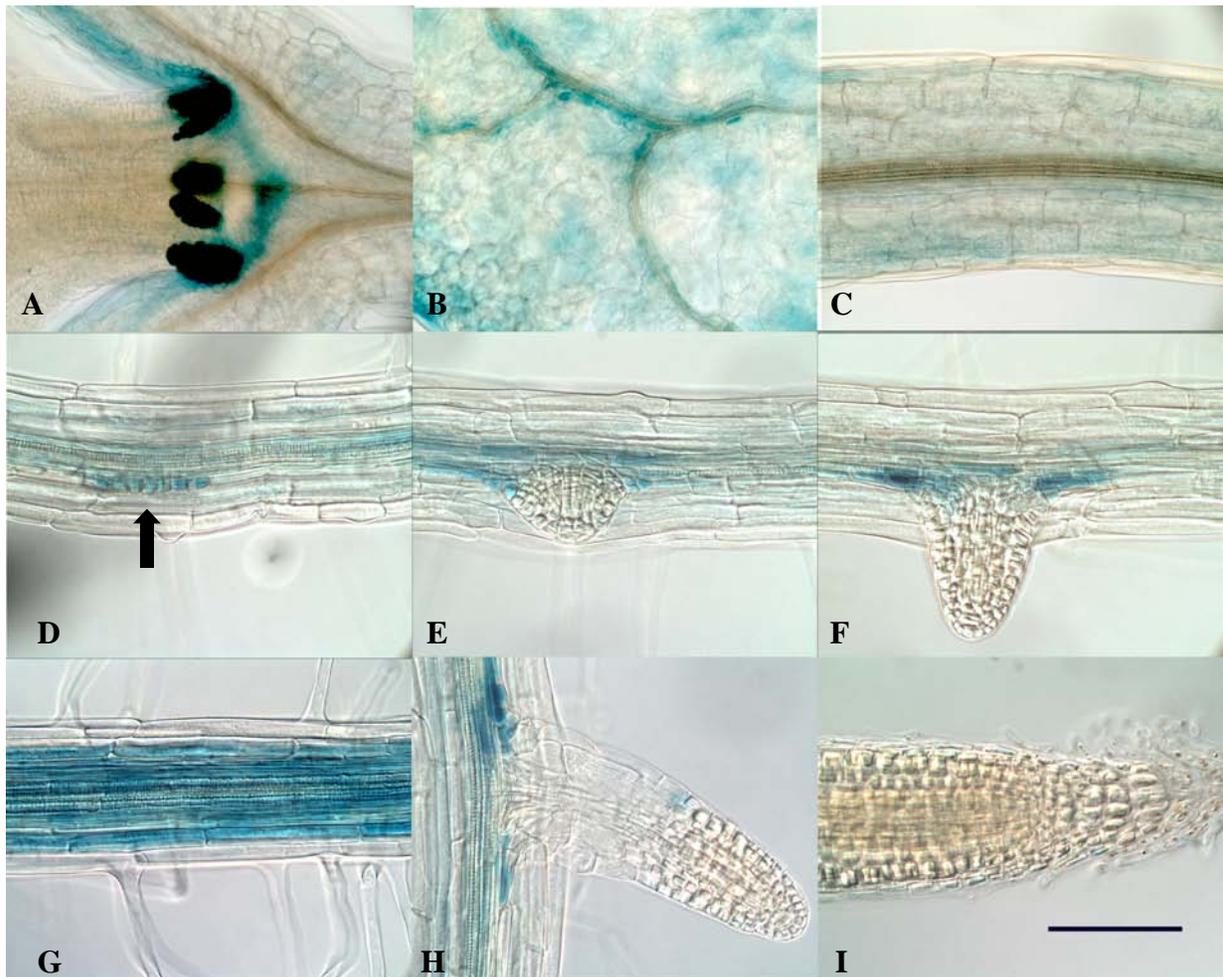


Figura. 9. - Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 511. A. Ápice del brote. B. Hoja cotiledonea. C. Hipocotilo. D. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). E. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. F. Raíz Lateral. G. Parte proximal de la raíz primaria. H. Raíz lateral. I. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. *n*= 16.plantas de 9 y 13 días de edad.

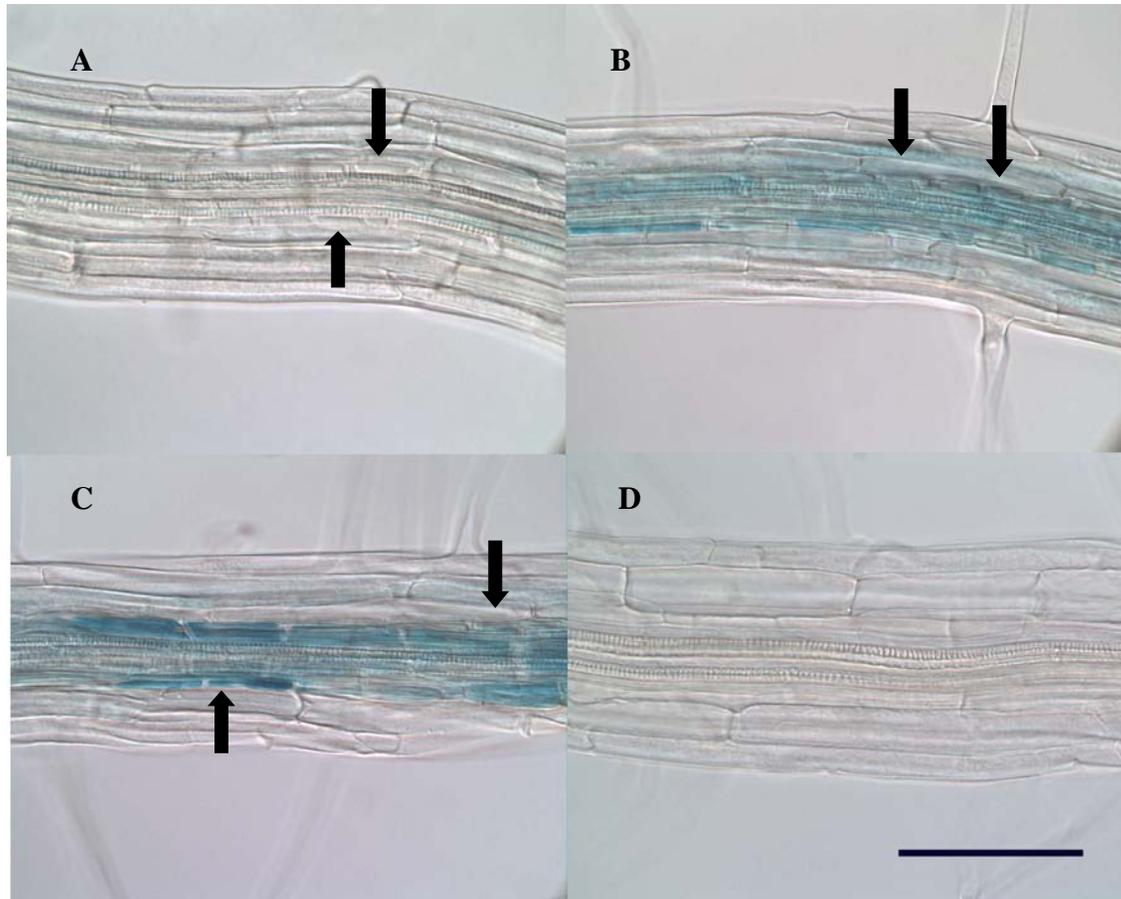


Figura. 10.- Características adicionales de la línea MGT 511. A, B y C; Parte proximal de la raíz primaria de la línea transgénica MGT 511 donde se observan células cortas de periciclo; las flechas indican algunas de estas células. **D.** Parte proximal de la raíz de una planta de tipo silvestre *Ler*. **Escala:** 100 μm . $n= 16$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.5 MGT 512

En plantas de la línea MGT 512 se observó tinción en diferentes capas celulares y en casi todos los órganos de la planta, tanto en la parte aérea como en la raíz. En su parte aérea, se observaron manchas con distribución irregular fuertemente teñidas en cotiledones y primordios de hojas verdaderas (Figura 11A y B). En la parte proximal de la raíz primaria se observó una tinción de mayor intensidad que en la parte distal, en la parte proximal de la raíz la tinción se observó en cortex, endodermis, periciclo y tejidos internos del cilindro central (Figura 11G), la tinción se pudo observar en primordios de raíces laterales en etapas tempranas, y células de bordes laterales de la base de los primordios en etapas más avanzadas (Figura 11D, E y F). En ápice de la raíz primaria y raíces laterales se observó tinción en algunas células de epidermis, cortex y endodermis de meristemo apical y zona de elongación (Figura 11I). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre.

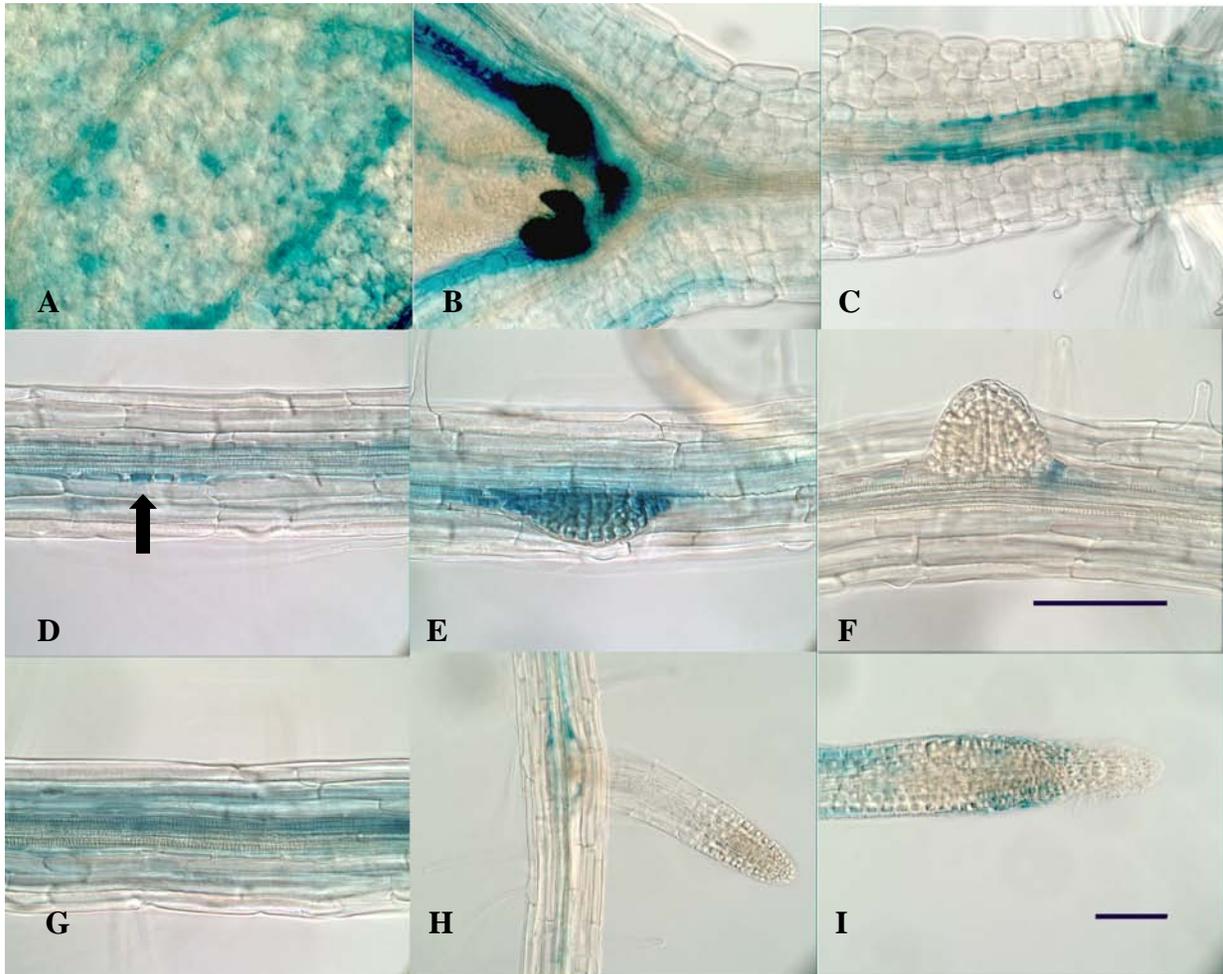


Figura. 11.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 512. A. Hoja cotiledónea. B. Ápice del brote. C. Hipocotilo. D. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). E. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. F. Primordio emergido. G. Parte proximal de la raíz primaria. H. Raíz lateral. I. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. La escala en I es igual para A, B, C y H; la escala en F es igual para D, E y G. $n=$ 15 plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.6 MGT 521

En plantas de la línea MGT 521 el patrón de tinción se observó en diferentes capas celulares de casi todos los órganos de la planta. La intensidad de la tinción en parte aérea fue notablemente más fuerte. En la parte aérea se observó tinción de mayor intensidad en bordes externos de cotiledones y en hojas verdaderas (Figura 12A y B). En hipocotilo se observaron manchas irregulares no específicas a ningún tejido (Figura 12C). En la raíz se observó en periciclo, en células de cortex y en células de endodermis (Figura 12G), se observó teñida la base de algunos primordios de raíces laterales y de algunas raíces laterales (Figura 12H). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre.

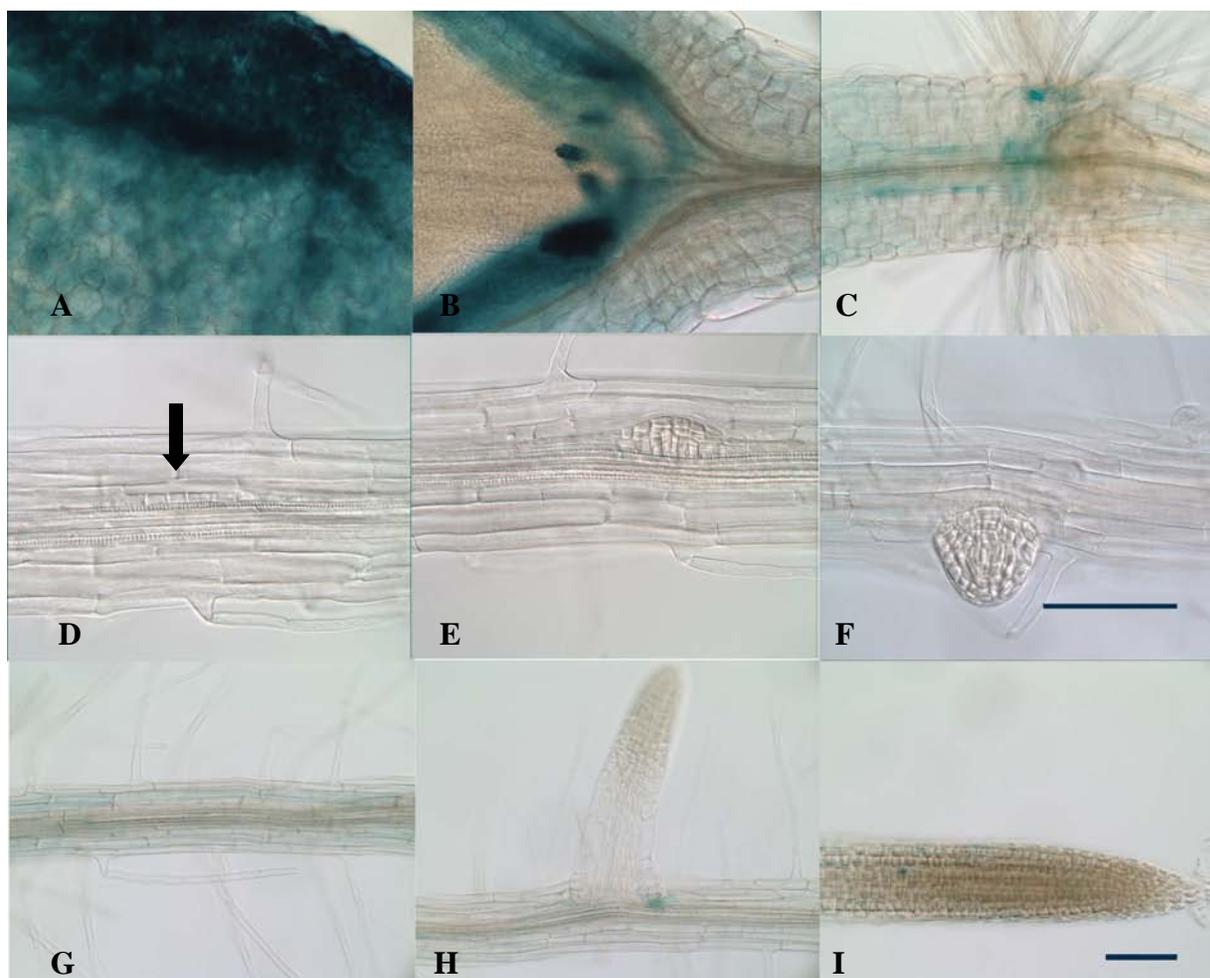


Figura. 12.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 521. A. Hoja cotiledonea. B. Ápice del brote. C. Zona de transición entre hipocotilo y raíz. D. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). E. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada F. Raíz lateral. G. Parte proximal de la raíz primaria, H. Raíz lateral y I. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μm . La escala en F es igual para D y E; la escala en I es igual para A, B, C, G y H. $n = 12$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.7 MGT 582

En plantas de la línea MGT 582 el patrón de tinción se observó en diferentes capas celulares de casi todos los órganos de la planta. La intensidad de la tinción en la parte aérea fue más fuerte que en la raíz. En la parte aérea se observó una tinción fuerte en los bordes externos de cotiledón y en primordios de hojas verdaderas (Figura 13A y B). En raíz la expresión no fue específica de periciclo, se observó claramente tinción aunque de intensidad débil en células de cortex, endodermis y periciclo en zona de diferenciación (Figura 13G y E). La intensidad de la tinción fue más fuerte en la parte proximal de la raíz que en la parte distal. En zonas distales de la raíz en algunas regiones se observó tinción sólo en periciclo; ocasionalmente se encontraron zonas donde se observó tinción en cortex y endodermis y se pudo detectar la tinción en primordios en etapa temprana. Sin embargo, la actividad de GUS en primordios no fue constante, de igual manera ocasionalmente se observaron células teñidas en los bordes laterales de los primordios más desarrollados (Figura 13E). En el ápice de la raíz se observó una expresión más ligera en células de la cofia de raíces laterales ya desarrolladas (Figura 13H) y rara vez en cofia de la raíz primaria (Figura 13I). No se observó en meristemas apicales de la raíz primaria (Figura 13I). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre. Adicionalmente las plantas de la línea MGT 582 presentaron un porcentaje de germinación aparentemente bajo (alrededor del 50%).

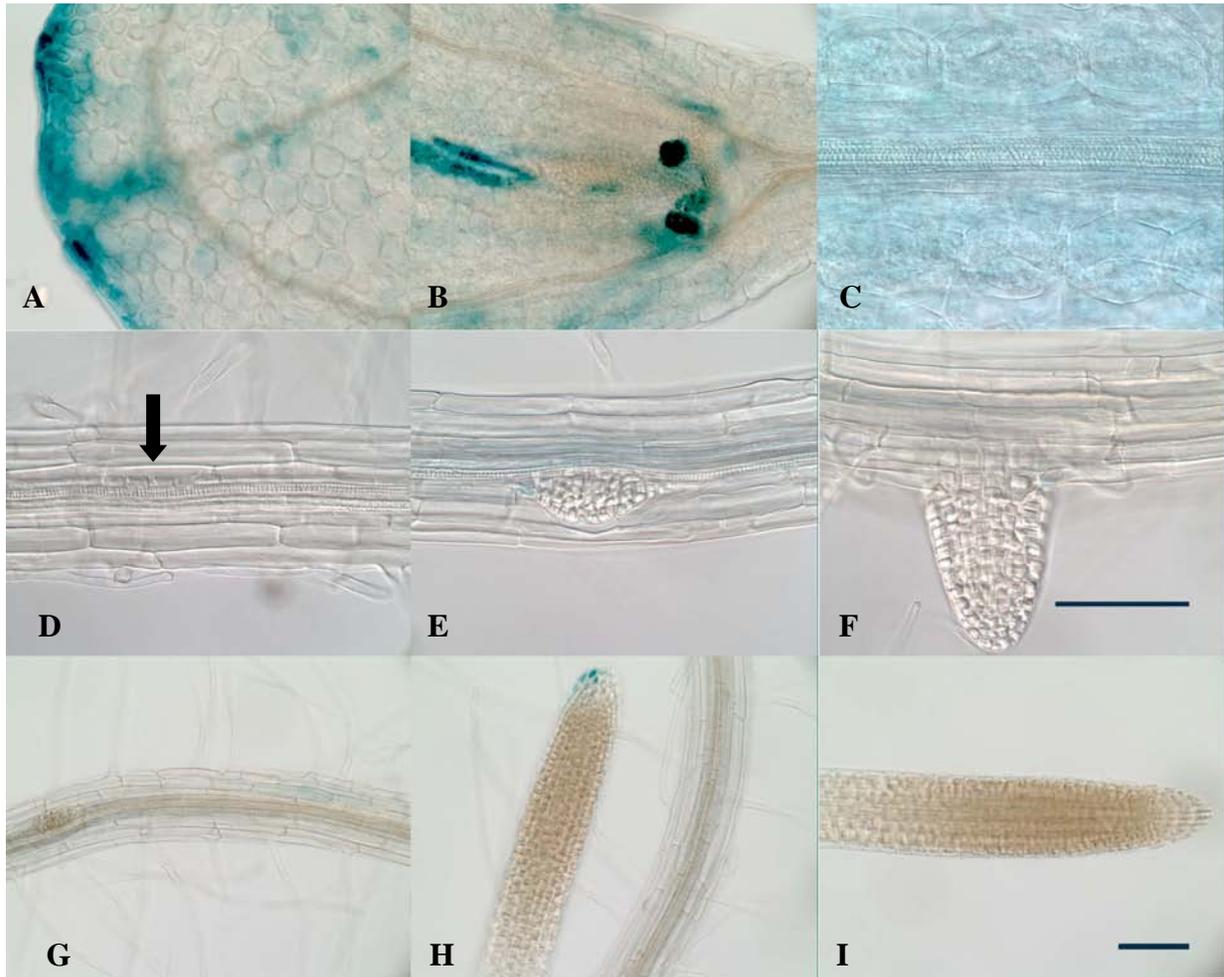


Figura. 13.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 582. A. Hoja cotiledonea. **B.** Ápice del brote. **C.** Hipocotilo. **D.** Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). **E.** Primordio de raíz lateral en etapa avanzada **F.** Raíz lateral. **G.** Parte proximal de la raíz primaria. **H.** Ápice de raíz lateral y parte de otra raíz lateral de la misma planta. **I.** Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. La escala en F es igual para C, D y E; la escala en I es igual para A, B, G y H. $n= 12$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.8 MGT 606

En la parte aérea se observó un incremento de la tinción de manera gradual hacia el ápice del brote (Figura 14B). En raíz se observó una tinción de gran intensidad que aumentó gradualmente hacia la zona meristemática de raíces laterales y raíz primaria (Figura 14I) y ápices de raíces laterales (Figura 14H). Dicha tinción se presentó en todas las capas celulares (Figura 14D), la intensidad máxima se detectó fácilmente en zona distal de elongación y zona meristemática (Figura 14H e I). Curiosamente, en la última línea celular de la cofia no se observó tinción (Figura 14H). En algunas plantas se encontraron algunas regiones de la zona de diferenciación con pocos pelos o sin pelos. (Figura 15A, B y C). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre.

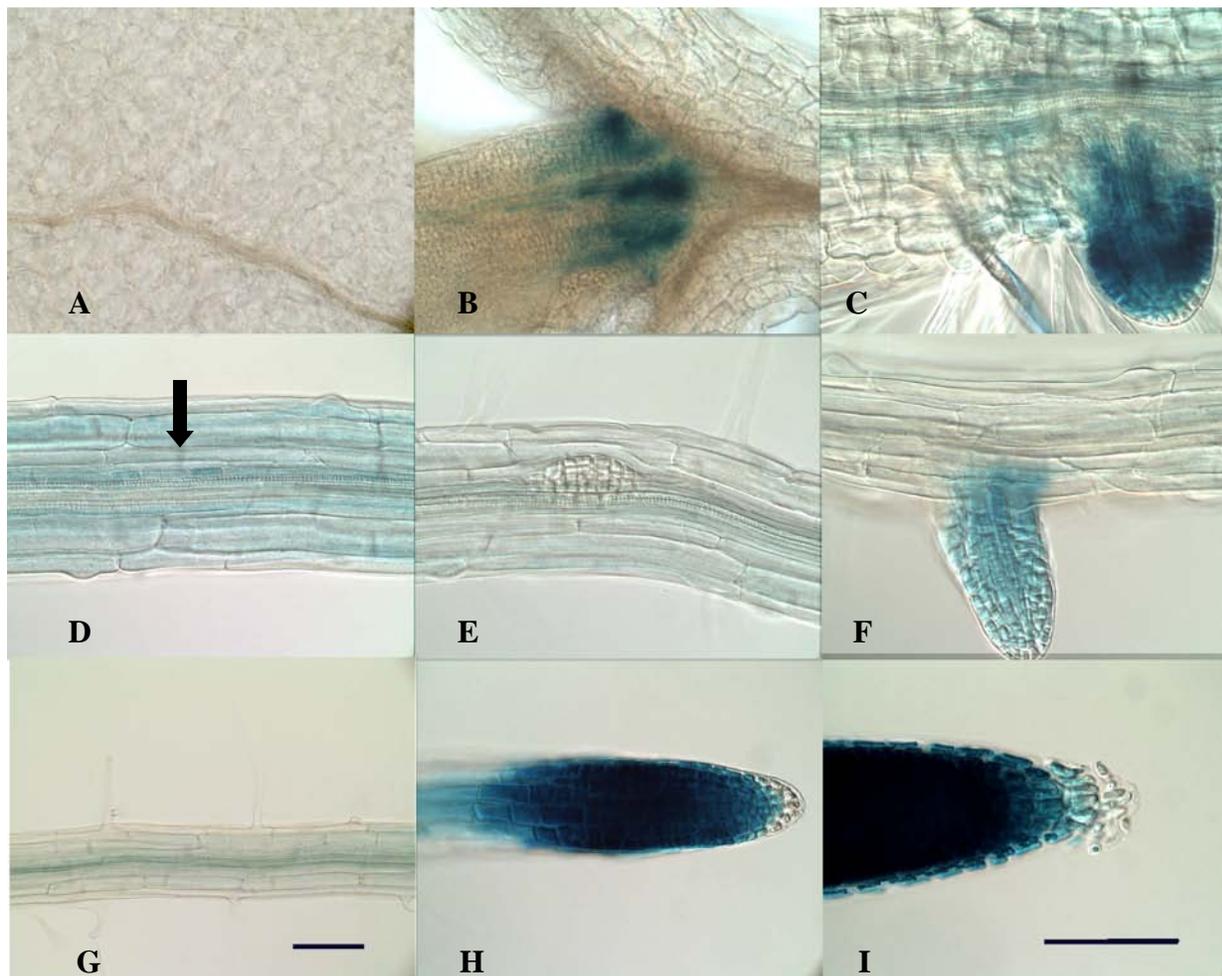


Figura. 14.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 606. **A.** Hoja cotiledonea. **B.** Ápice del brote. **C.** Hipocotilo y raíz lateral. **D.** Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha) . **E.** Primordio de raíz lateral en etapa avanzada **F.** Raíz lateral. **G.** Parte distal de la raíz primaria. **H.** Ápice de raíz lateral. **I.** Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. La escala en F es igual para A, C, D, E, H e I; la escala en G es igual para B. $n=$ 10 plantas de 9 y 13 días de edad.

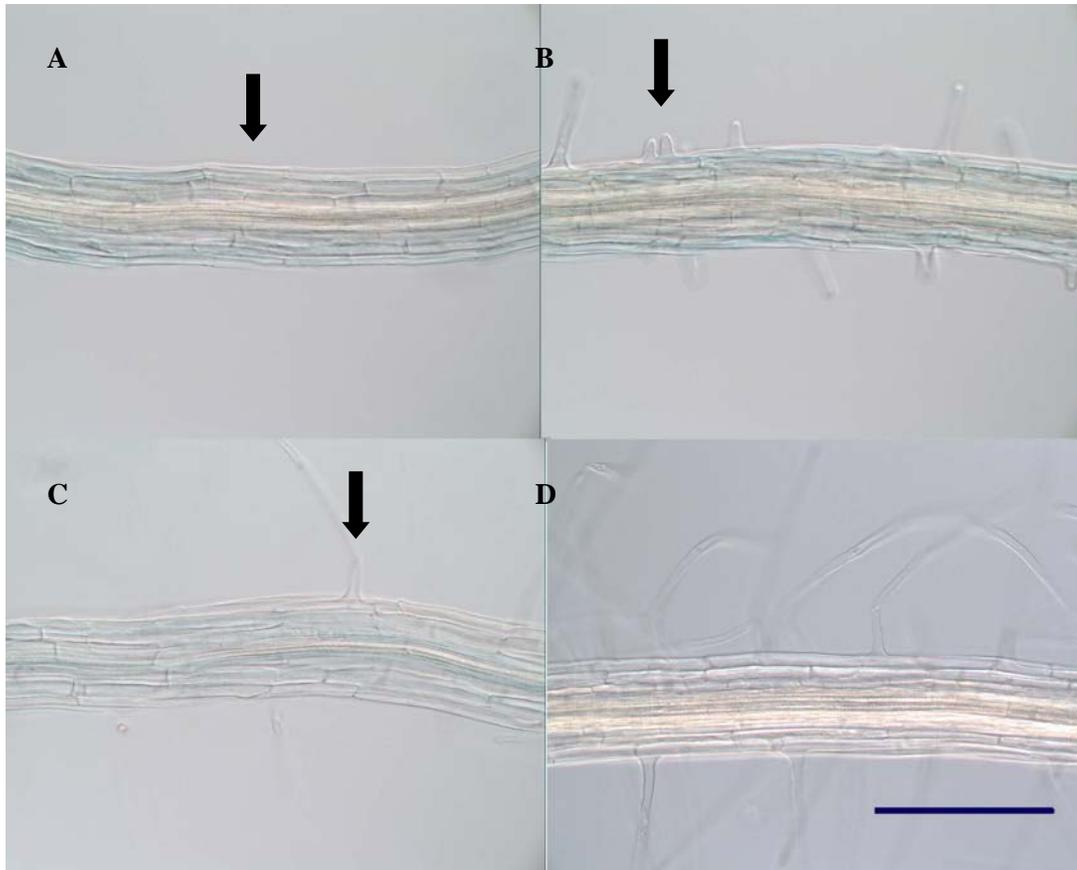


Figura. 15.- Características adicionales de la línea MGT 606. **A.** Parte proximal de la raíz primaria de la línea MGT 606 donde se observan regiones sin pelos (flecha), **B.** no desarrollados (flecha). **C.** Solo en uno de los polos de la raíz (flecha). **D.** Parte proximal de la raíz primaria de una planta de tipo silvestre *Ler*. **Escala:** 100 μm . $n=$ 10 plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.9 MGT 821

En estas plantas la tinción fue específica de tejidos vasculares de la raíz y del brote. En la parte aérea se observó tinción de intensidad fuerte en tejidos vasculares de ápice del brote (Figura 16A). En la parte proximal de la raíz primaria frecuentemente se detectó la tinción en el cilindro central completo (Figura 16G). Fueron encontradas zonas en la parte distal de la raíz primaria donde solo se observó tinción en periciclo, rara vez se llegó a encontrar células endodérmicas teñidas, rara vez se observó tinción en primordios de raíces laterales tanto en etapas tempranas como en etapas más desarrolladas (Figura 16D y E). No se detectó la tinción en meristemo apical de raíces laterales ni en raíz primaria (Figura 16F e I). Esta línea frecuentemente presentó una distribución anormal de primordios, ya sea en plano longitudinal (primordios muy cercanos uno a otro; Figura 17C) o en plano transversal (primordios formados uno frente de otro; Figura 17A y B), algunos primordios presentaron deformaciones en su domo (Figura 17E). A simple vista se observó claramente un fenotipo en plantas adultas de 4 semanas de edad. Algunas plantas se observaron mucho más pequeñas y visiblemente más delgadas que la parte aérea de la planta de tipo silvestre, como no todas las plantas presentaron este fenotipo y sólo las plantas pequeñas presentaron tinción, indica heterocigocidad o más de dos inserciones. Adicionalmente encontramos que esta línea transgénica tiene un bajo porcentaje de germinación (alrededor del 13%).

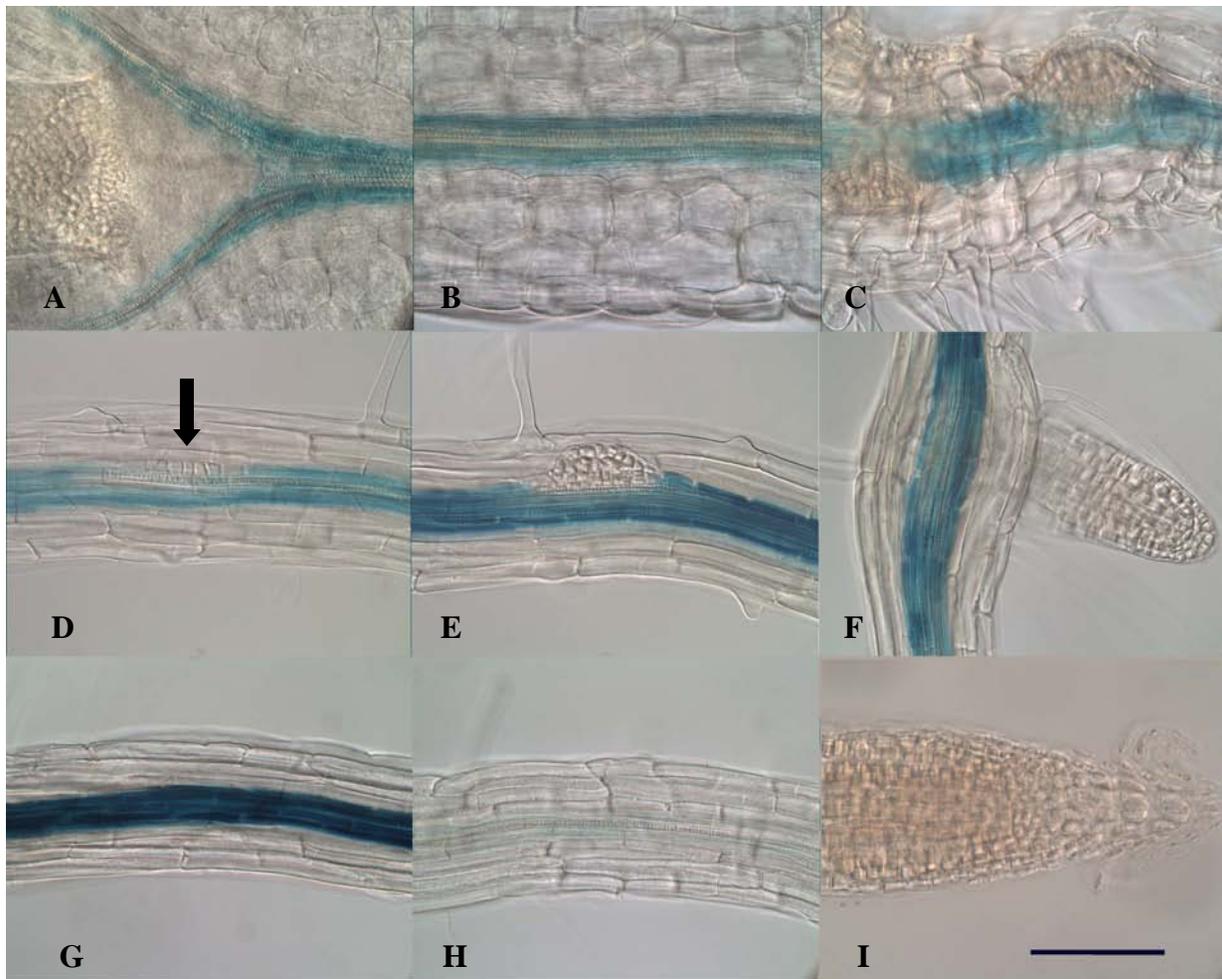


Figura. 16.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 821. **A.** Ápice del brote. **B.** Parte proximal del hypocotilo. **C.** Parte distal del hypocotilo. **D.** Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha) . **E.** Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. **F.** Raíz lateral. **G.** Parte proximal de la raíz primaria. **H.** Parte distal de la raíz primaria. **I.** Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. $n=$ 33 plantas de 9 y 13 días de edad.

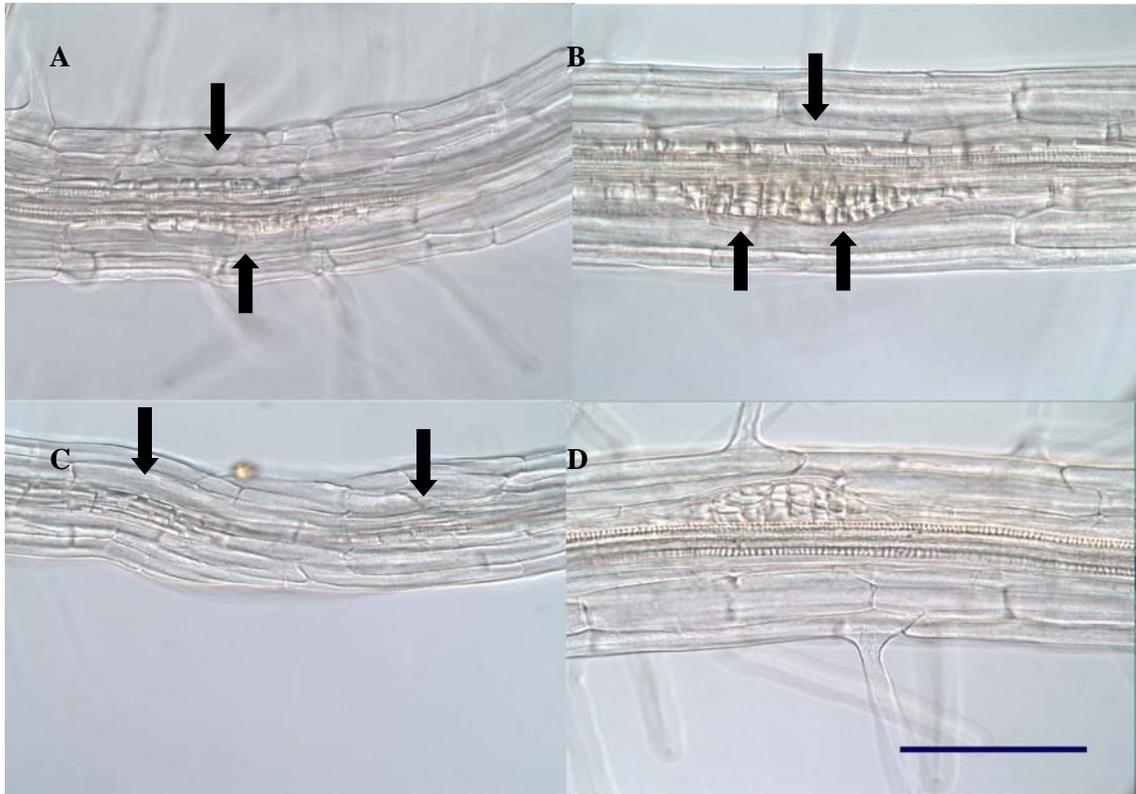


Figura. 17.- Características adicionales de la línea MGT 821. A, B, C; Raíz primaria de la línea transgénica MGT 821 donde se presenta distribución anormal de primordios de raíces laterales. **D.** Raíz primaria de una planta de tipo silvestre *Ler*. **Escala:** 100 μ m. $n = 33$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.10 MET 115

No se observó tinción en 22 plantas observadas de dos edades diferentes (Figura 18). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre. Esta línea transgénica fue seleccionada ya que en observaciones preliminares se reportó tinción en bordes laterales de la base de primordio de raíz lateral, y en células de periciclo en zona de transición.

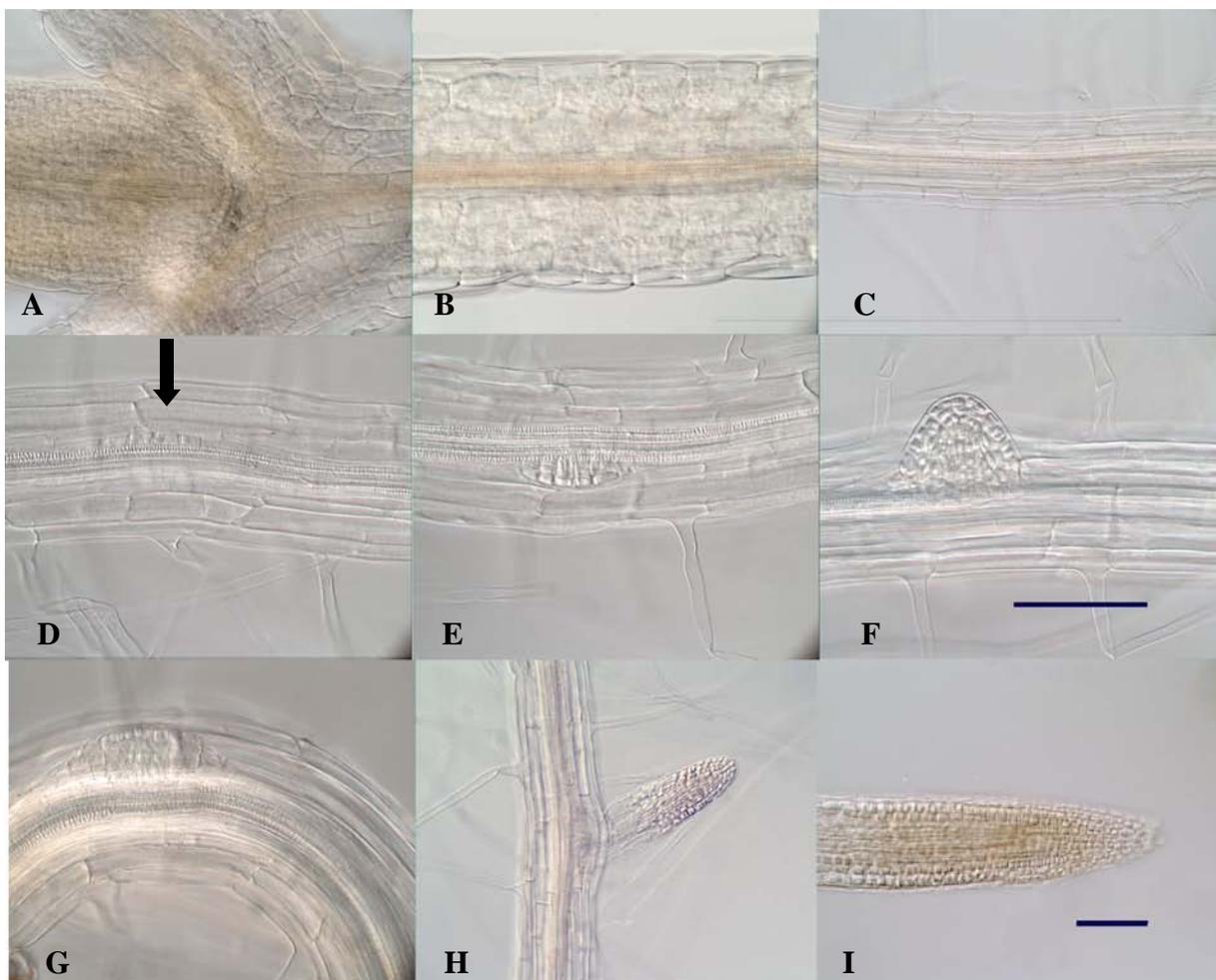


Figura. 18- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MET 115. **A.** Ápice del brote. **B.** Hipocotilo. **C.** Parte proximal de la raíz primaria. **D.** Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). **E.** Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. **F.** Primordio emergido. **G.** Primordio arrestado. **H.** Raíz lateral. **I.** Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μm . La escala en F es igual para D, E, y G; la escala en I es igual para A, B, C y H. $n= 22$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.11 MET 441

Las plantas de línea MET 441 presentaron un patrón de actividad de GUS fuerte y localizado. En parte aérea se observó en tejidos vasculares (Figura 19A), en raíz ocasionalmente se observaron regiones de periciclo fuertemente teñidas (Figura 19C), no se observó tinción en primordios en etapa temprana (Figura 19E). En primordios en etapas más avanzadas se observó una tinción fuerte y definida en los bordes laterales de la base del primordio que se continuó en células de periciclo (Figura 19F y G), no se observó tinción en meristemo apical de las raíces laterales y ni de raíz primaria (Figura 19H e I). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre. Las plantas de la línea transgénica MET 441 presentaron un porcentaje de germinación aparentemente bajo (alrededor del 40%).

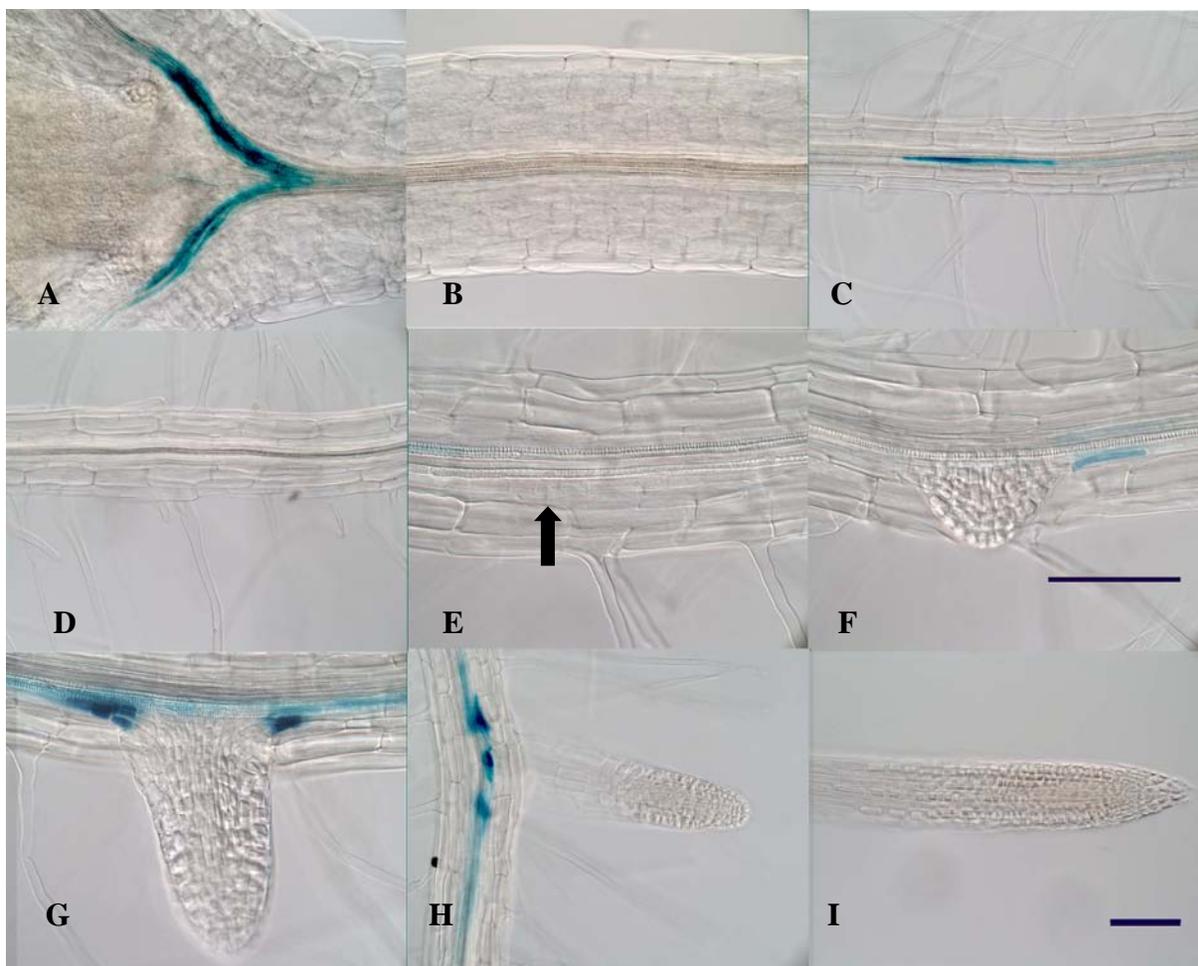


Figura. 19.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MET 441. A. Ápice del brote. B. Hipocotilo. C, D; Parte proximal de la raíz primaria. E. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). F. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. G, H; Raíz lateral. I. Meristemo apical de la raíz primaria. **Escala:** 100 μ m. La escala en F es igual para E y G; la escala en I es igual para A, B, C, D y H. $n= 21$ plantas de 9 y 13 días de edad.

7.1.12 MGT 180

Las plantas de esta línea presentaron tinción en casi todos los órganos de la parte aérea (Figura 20A), se observaron pequeños grupos de células epidérmicas de cotiledón teñidas, hay tinción ligeramente más fuerte en los bordes del cotiledón y en primordios de hojas verdaderas, en hipocotilo la tinción se observó ligera y en diferentes tejidos. En la parte proximal de la raíz la tinción fue más fuerte y en todo el cilindro central (Figura 20B). En la parte distal de la raíz la intensidad de la tinción fue mucho menor y a lo largo de la parte distal de la raíz se encontraron ocasionalmente zonas con tinción sólo en periciclo (Figura 20C). La tinción fue detectada en etapas tempranas del desarrollo de primordios de raíces laterales, en etapas más avanzadas, en la base de los primordios de raíces laterales. (Figura 20D y E). Ocasionalmente se encontraron primordios sin tinción. En raíces laterales desarrolladas se observó tinción en tejidos vasculares de zona de diferenciación y en algunas células de cofia. (Figura 20G). En la raíz primaria además de células de cofia se observó tinción en células de epidermis y cortex de zona meristemática (Figura 20H e I). Esta línea presentó un fenotipo interesante, los meristemas de las raíces laterales parecen más cortos que en las plantas de tipo silvestre. (Figura 21A). A simple vista, la parte aérea de la planta adulta de 4 semanas de edad y la longitud de la raíz de la planta de 9 días de edad, fueron de tamaño similar a lo observado en la planta de tipo silvestre.

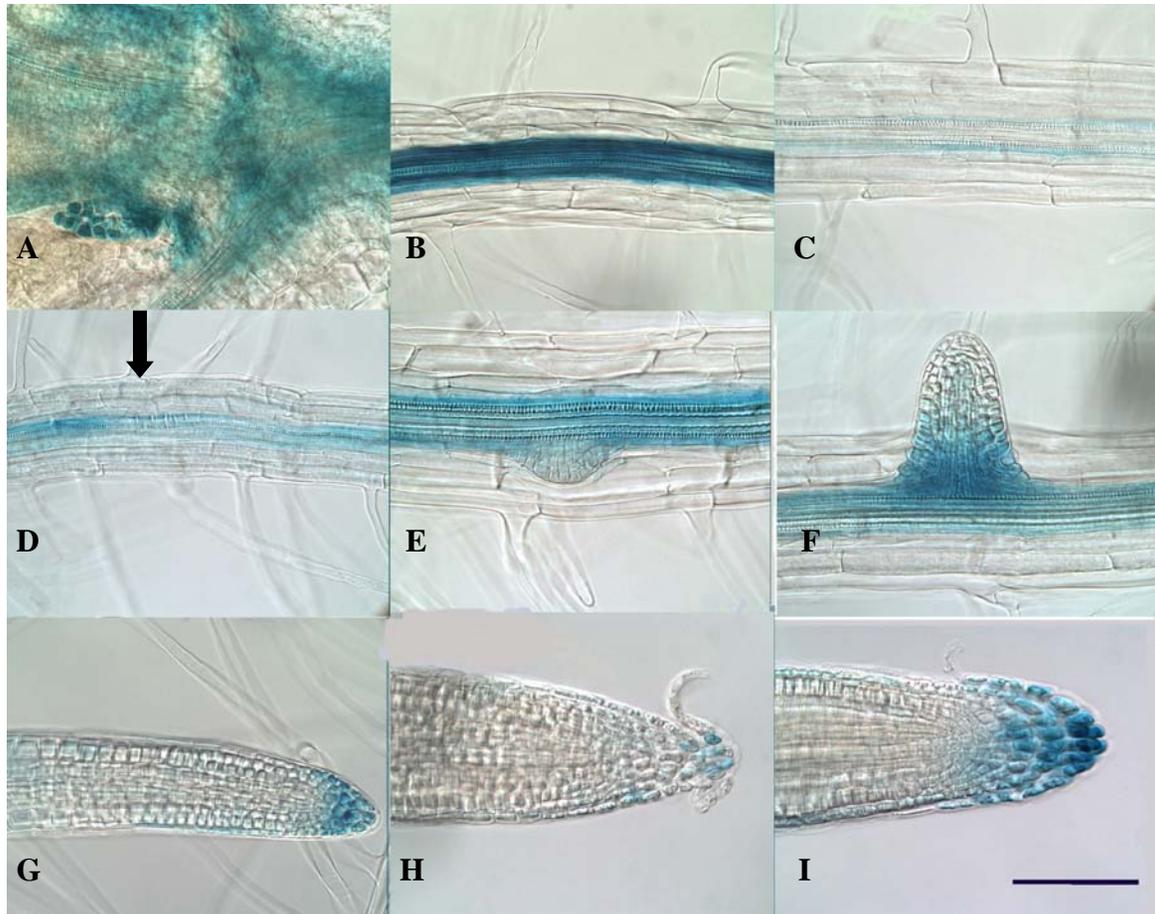


Figura.20.- Análisis del patrón de actividad de GUS en la línea MGT 180. A. Ápice del brote, B. Parte proximal de la raíz primaria. C. Parte distal de la raíz primaria. D. Primordio de raíz lateral en etapa temprana (flecha). E. Primordio de raíz lateral en etapa avanzada. F. Raíz lateral. G. Ápice de raíz lateral. H. Meristemo apical de la raíz primaria. I. Meristemo apical de la raíz primaria, diferente a la mostrada en H. **Escala:** 100 μm . $n= 15$ plantas de 9 y 13 días de edad.

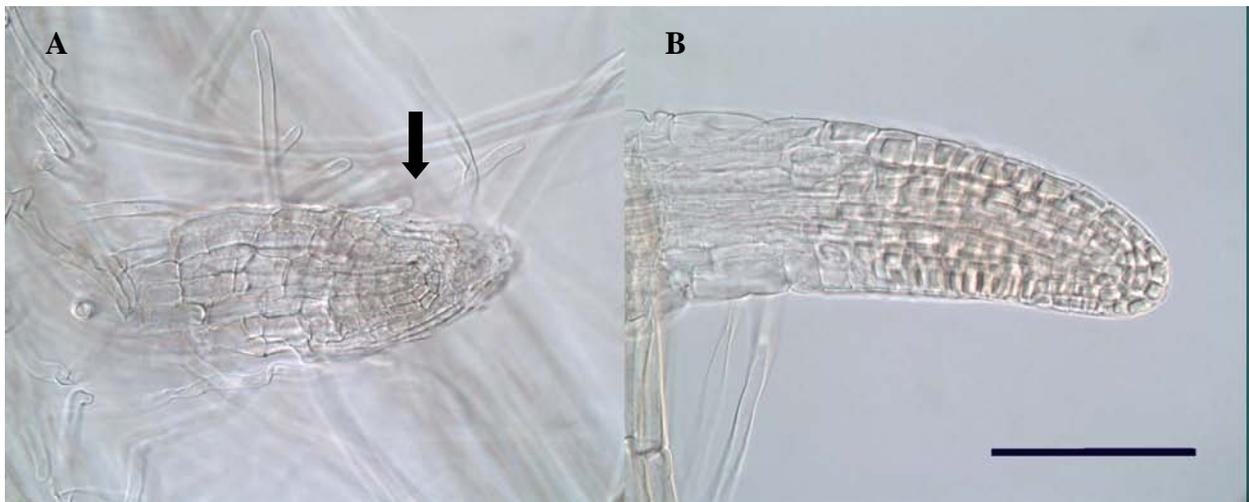


Figura. 21.- Fenotipo de raíces laterales cortas en plantas de la línea MGT 180. A. Raíz lateral de una planta de la línea MGT 180 de 13 días de edad, donde se observa el meristemo más corto que en la planta de tipo silvestre (flecha). B. Raíz lateral de una planta de tipo silvestre *Ler* de 13 días de edad. **Escala:** 100 μm . $n= 15$ plantas de 9 y 13 días de edad.

Tabla 1. Resumen del patrón de expresión de GUS en las líneas transgénicas.

	Cotiledón	Hoja verdadera	Ápice de la raíz	Zona de Diferenciación	Primordio de Raíz Lateral	Raíz Lateral desarrollada	Hipocotilo	# plantas observadas
MGT22	Tejido vascular	Tejido vascular	Células de todo cilindro central de zona meristemática	Periciclo Xilema Floema	Bordes laterales	Periciclo Xilema floema	Tejido vascular	27
MGT180	En grupos pequeños de células de cotiledón Y tejidos vasculares	Difuso	Cofia	Periciclo Xilema Floema Ver detalles	En base completa	Periciclo Xilema Floema Cofia.	Difuso	23
MGT303	No se observa	Primordios de hojas.	No se observa	No se observa	No se observa	No se observa	No se observa	29
MGT307	NO	SE	OBSERVÓ	TINCION				25
MGT511	Difuso	Difuso	Cofia lateral	Cortex Endodermis Periciclo Xilema Floema	Parte basal	Cofia lateral	Difuso	16
MGT512	Difuso	Difuso	Células meristemática	Cortex Endodermis Periciclo Xilema Floema	Bordes laterales	Células meristemática	Difuso	15
MGT521	Fuerte en bordes externos	Fuerte	No constante	cortex endodermis periciclo	Parte basal		Difuso	12
MGT582	Fuerte en bordes externos	Fuerte Difuso	Cofia	Cortex Endodermis Periciclo. Ver detalles	No constante	Cofia	Difuso	12
MGT606	Ver detalles	Ver detalles	Ver detalles	Ver detalles	Ver detalles	Ver detalles	Ver detalles	10
MGT821	No se observa	Ápice del brote	No se observa	Periciclo Xilema Floema	no se observa	Periciclo Xilema Floema	No se observa	33
MET115	NO	SE	OBSERVÓ	TINCION				22
MET441	No se observa	No se observa	No se observa	Periciclo No constante	Bordes laterales	No se observa	No se observa	21

7.2 Identificación y análisis genético de una línea de mayor interés en relación a la iniciación de primordios de raíces laterales.

Basándonos en el patrón de actividad de GUS analizado en todas las líneas arriba mencionadas, se seleccionó la línea MGT 180, que presentó tinción en los primordios de las raíces laterales en etapas tempranas de desarrollo del primordio y presentó un patrón estable y reproducible de actividad de GUS, para profundizar en su caracterización.

El análisis genético se inició con el estudio de la resistencia a kanamicina y de la actividad de GUS en 9 plantas diferentes de la línea MGT 180, llamadas L1 a L9. En el caso específico de la progenie de la planta 8, la línea MGT180 L8 ($n=18$) ninguna planta presentó tinción (GUS-); sin embargo, 15 fueron resistentes a kanamicina, caso contrario observado en la progenie de la planta 9, línea llamada MGT180 L9 ($n=20$) donde todas las plantas fueron resistentes a kanamicina y todas las plantas mostraron actividad de GUS (GUS+). Estos datos sugirieron presencia de dos inserciones y posible segregación en estas líneas.

Las líneas MGT180 L8 (GUS-) y MGT180 L9 (GUS+) fueron sometidas a un análisis genético detallado. Con el objetivo de analizar si existen algunos cambios del patrón de actividad de GUS a través del tiempo, se sembraron semillas de la línea MGT180 L9 (GUS +) en medio MS 0.2X y se realizó la tinción para detectar actividad de GUS, analizándose 13 plantas de 7 días, 12 plantas de 9 días, 12 plantas de 13 días y 15 plantas de 20 días de edad, y este análisis no mostró cambios en el patrón de tinción descrito anteriormente (Figura 20).

El fenotipo relacionado a meristemos apicales más cortos que en la planta de tipo silvestre en las raíces laterales, se observó tanto en plantas de la línea MGT180 L8 (GUS-) como en plantas de la línea MGT180 L9 (GUS+). Esta característica a diferentes edades de la planta no se encontró en plantas de 7 días ni de MGT180 L8 ($n=12$), ni de MGT180 L9 ($n=12$). En plantas de 9 días el fenotipo se presentó en un 20% de las plantas, sólo en algunas de las raíces laterales de las líneas MGT180 L8 (GUS-) $n=10$ y MGT180 L9 (GUS+) $n=10$. En plantas de 13 días de edad se encontró en un 40% de las plantas y solo se detectó en algunas de las raíces laterales de MGT180 L8 (GUS-) $n=12$ y MGT180 L9 (GUS+) $n=12$. Finalmente los meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre se encontraron en un 100% de las raíces laterales del 100% de la población de la línea MGT180 L8 (GUS-) de 20 días de edad. De igual manera el 100% de las plantas de 13 días de edad de MGT180 L8 (GUS-) crecidas en medio MS 0.2X suplementado con 50 μ g/ml de kanamicina, presentaron esta característica de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre. Sorpresivamente, en las plantas de tipo silvestre de 20 días de edad se

encontró esta misma característica, pero en menor cantidad de raíces laterales por planta y en un 80% de las plantas analizadas ($n=16$) (Figura 22).

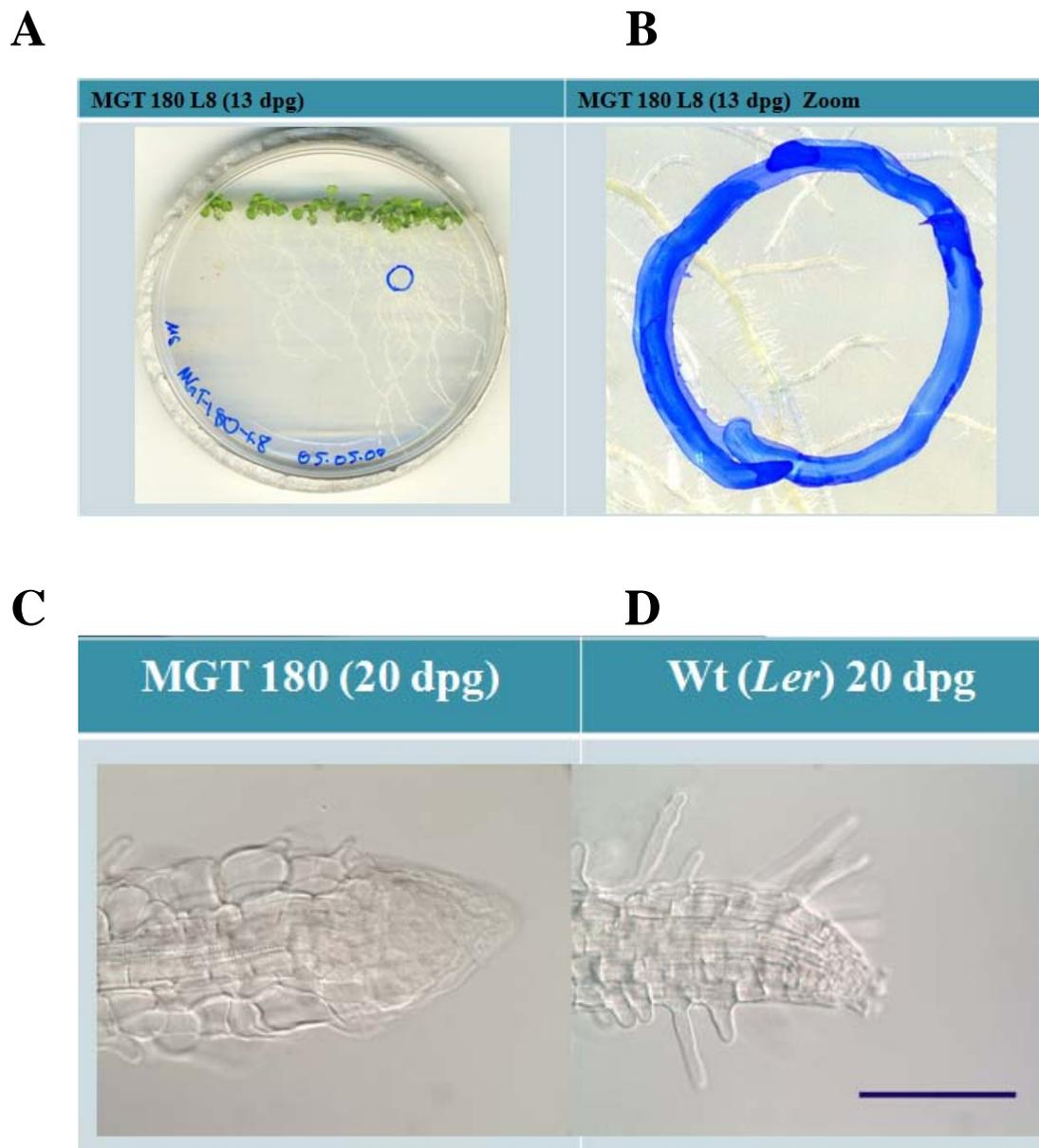


Figura. 22.- Fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre a 13 y 20 días de edad en la línea transgénica MGT 180. A, B; Línea MGT180 L8 (GUS-) sembradas en medio MS 0.2X sin kanamicina, donde se observan raíces laterales cortas y pelos radicales muy cerca del ápice de la raíz. **C.** Raíz lateral de la línea MGT180 L8 (GUS-) de 20 días sembrada en medio MS 0.2X sin kanamicina, donde se observa el meristemo corto. **D.** Raíz lateral de una planta de tipo silvestre de 20 días sembrada en medio MS 0.2X sin kanamicina, donde se observa el meristemo corto. **Escala:** 100 μ m.

Se realizaron ensayos de análisis de segregación con las líneas MGT180 L8(GUS-) y MGT180 L9(GUS+) con base en su resistencia a kanamicina ($n=100$). En el caso de MGT180 L8(GUS-) se obtuvieron 74 plantas resistentes a kanamicina y 26 plantas sensibles a kanamicina (aproximadamente 3:1) y para MGT180 L9(GUS+) se obtuvo el 100% de plantas resistentes a kanamicina (Figura 23). Estos datos indican que la línea MGT180 L8(GUS-) es heterocigótica para la resistencia a kanamicina y aparentemente solo tiene una inserción, mientras que la línea MGT180 L9(GUS+) es homocigótica, tanto para la resistencia a kanamicina, como para la actividad de GUS.

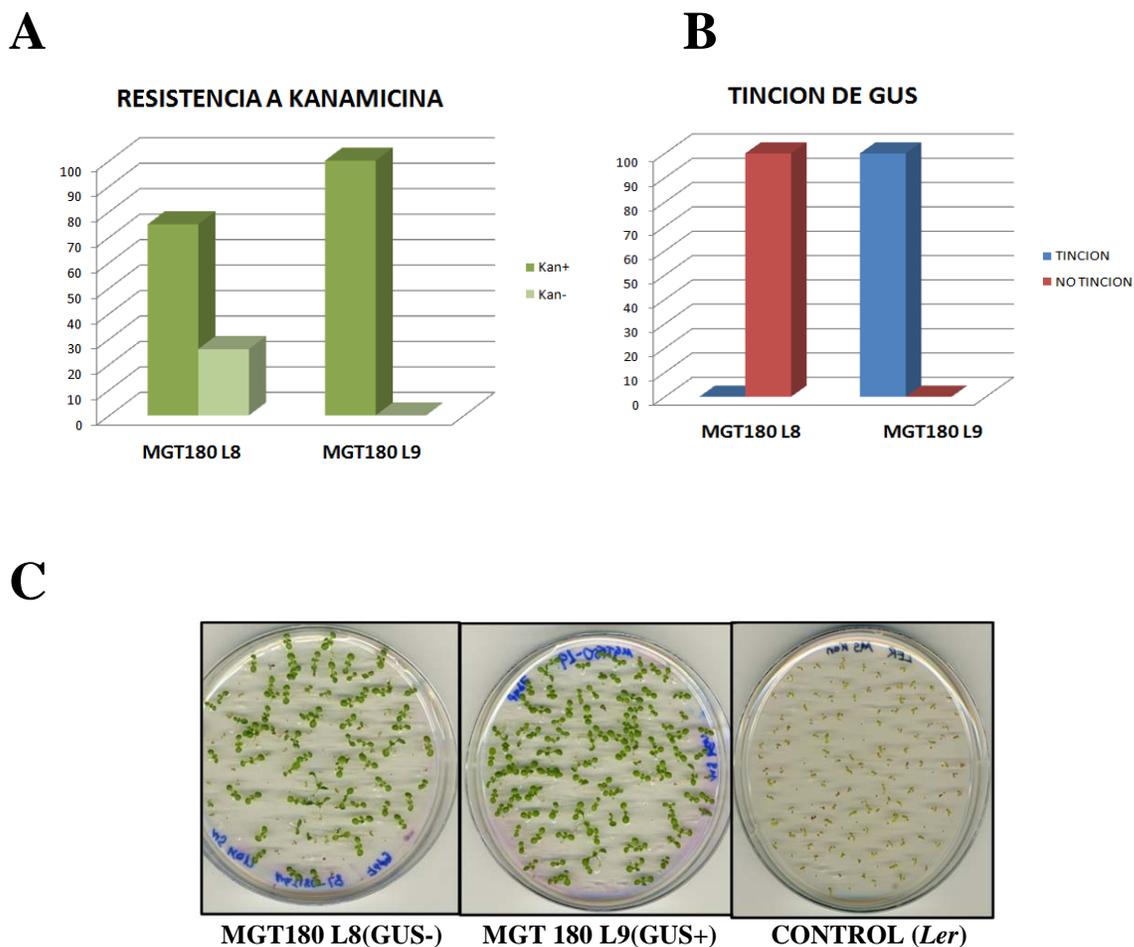


Figura. 23.- Análisis de la segregación de las líneas MGT180 L8 (GUS-) y MGT180 L9 (GUS+). **A.** Porcentaje de plántulas de las líneas MGT180 L8 (GUS-) $n=100$ y MGT180 L9 (GUS+) $n=100$ resistentes a kanamicina; barra verde oscuro: plántulas Kan⁺, barra verde claro: plántulas Kan⁻. **B.** Porcentaje de plántulas con actividad de GUS de las líneas MGT180 L8 (GUS-) $n=20$ y MGT180 L9 (GUS+) $n=18$; barra azul: plántulas GUS⁺, barra roja: plántulas GUS⁻. **C.** Plántulas de las líneas MGT180 L8 (GUS-) y MGT180 L9 (GUS+) sembradas en medio MS 0.2X suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, $\chi^2=0.0266$ para MGT 180 L8 (hipótesis=1 inserción). $\chi^2=0.0$ para MGT180 L9 (hipótesis=homocigótica). $n=100$ plantas.

Con la finalidad de estudiar la segregación de la línea MGT180 L9 (GUS+) y de determinar si porta una o más inserciones, se realizó una retrocruza de prueba usando plantas de tipo silvestre *Ler* tomadas como madre y la línea transgénica como donadora del polen. En la generación F1, sabiendo que la resistencia a kanamicina es un carácter dominante, se confirmó que la retrocruza fue exitosa sembrando la generación F1 en medio con kanamicina. (Figura 24).

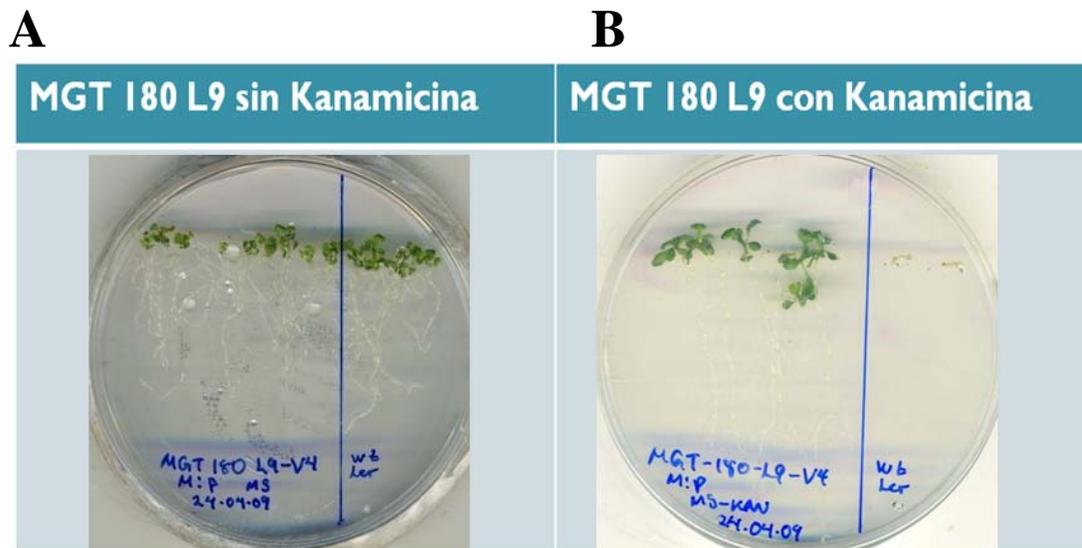


Figura 24.-Confirmación de la retrocruza exitosa de la línea MGT180 L9 (GUS+). Progenie F1 resultado de la retrocruza de plantas de tipo silvestre (*Ler*) fertilizada con polen de la línea MGT180 L9 (GUS+). **A.** A la izquierda plántulas de la generación F1, a la derecha plántulas de tipo silvestre (*Ler*) utilizadas como control positivo. Las plántulas fueron sembradas en medio MS 0.2X sin kanamicina **B.** A la izquierda plántulas de la generación F1, a la derecha plántulas de tipo silvestre (*Ler*) utilizadas como control negativo. Las plántulas fueron sembradas en medio MS 0.2X con 50 µg/mL de kanamicina.

Las plantas resistentes al antibiótico se sembraron en suelo, para obtener la generación F2 mediante autopolinización, se realizaron ensayos de análisis de segregación en base a su resistencia a kanamicina. Se analizaron las progenies de tres plantas independientes de la generación F2 (MGT180 L9-1, MGT180 L9-2 y MGT180 L9-3). En el caso de MGT180 L9-1 se obtuvieron 105 plantas resistentes a kanamicina y 32 plantas sensibles a kanamicina (aproximadamente 3:1), para MGT180 L9-2 se obtuvieron 161 plantas resistentes a kanamicina y 11 plantas sensibles a kanamicina y para MGT180 L9-3 se obtuvieron 120 plantas resistentes a kanamicina y ninguna planta sensible a kanamicina. Se tomaron de 21-30 plantas resistentes a kanamicina de cada línea y se analizó la actividad de GUS. Para la línea MGT180 L9-1 se obtuvieron 21 plantas sin actividad (n=21), para MGT180 L9-2 se obtuvieron 28 plantas sin actividad (n=28) y para MGT180 L9-3 se obtuvieron 22 plantas con actividad y 8 sin actividad (n=30) (Figura 25).

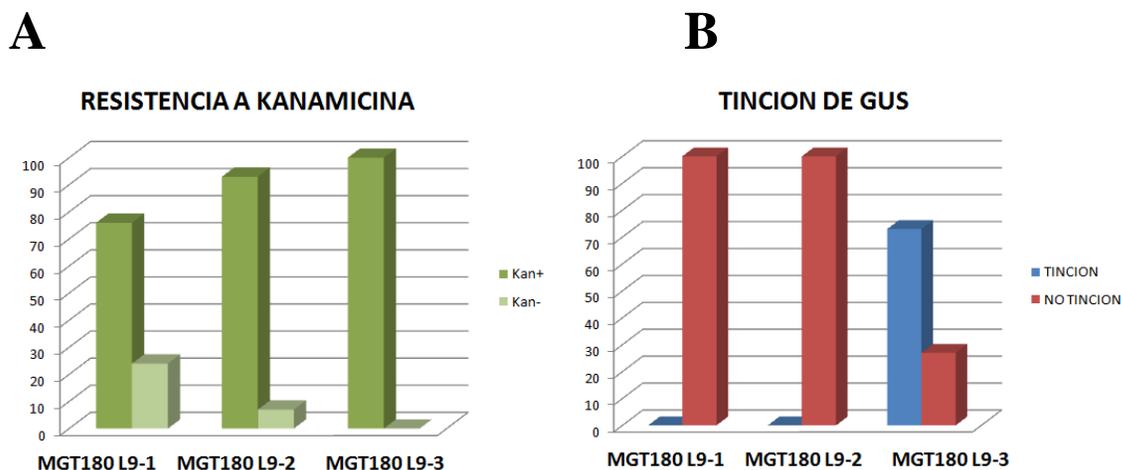
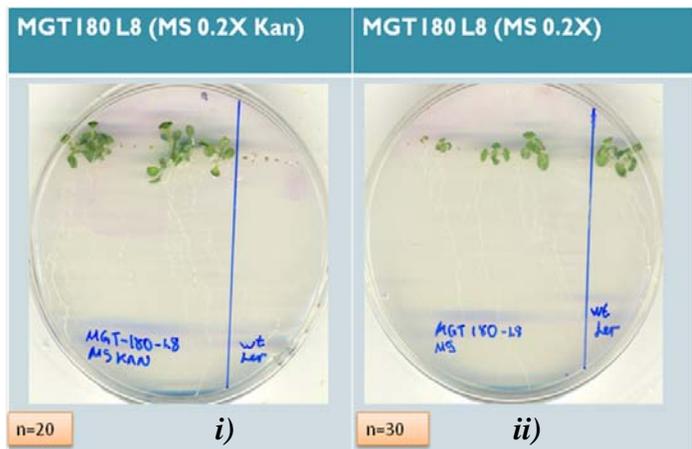


Figura. 25.- Análisis de la segregación de la generación F2 de la retrocruza de la línea MGT180 L9 (MGT180 L9-1, MGT180 L9-2 y MGT180 L9-3). A. Porcentaje de plántulas resistentes a kanamicina de las líneas MGT180 L9-1 ($n=105$), MGT180 L9-2 ($n=161$) y MGT180 L9-3 ($n=120$); barra verde oscuro: plántulas Kan⁺, barra verde claro: plántulas Kan⁻. $\chi^2=0.0266$ para MGT 180 L9-1 (hipótesis=1 inserción); $\chi^2=0.0032$ para MGT180 L9-2 (hipótesis=2 inserciones). $\chi^2=1.59$ para MGT180 L9-3 (hipótesis=3 inserciones). B. Porcentaje de plántulas con actividad de GUS de las líneas MGT180 L9-1 ($n=21$), MGT180 L9-2 ($n=28$) y MGT180 L9-3 ($n=30$); barra azul: plántulas GUS⁺, barra roja: plántulas GUS⁻. $\chi^2=0.148$ para MGT180 L9-3 (hipótesis=1 inserción provee la expresión de GUS).

Se realizó un ensayo experimental adicional para estudiar la relación entre la resistencia a kanamicina y el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre en las plantas de MGT180 L8(GUS-), el cual consistió en un análisis simultáneo del fenotipo y de la resistencia a kanamicina de 30 plantas crecidas en medio MS 0.2X. De plantas de 15-18 días de edad se tomaron explantes de hoja y se indujo la producción de callo en medio (MS) al 0.2X suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y 2,4-Diclorofenoxyacético e IAA en una proporción 0.5/0.05 según descrito por Valvenkens *et al.*, (1988) para *A. thaliana*. Las raíces de estas mismas plantas se aclararon y se observaron en microscopio analizando el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre en raíces laterales. En los resultados de este ensayo el 100% de las raíces laterales mostró el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre en el 100% de la población y el 71 % de las plantas fueron resistentes a kanamicina (Figura 26). Estos datos apoyan fuertemente que el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre de raíces laterales no está relacionado a la resistencia a kanamicina.

A**B**

Plantas con meristemos cortos	100%
Plantas resistentes a Kanamicina	71%
Plantas sensibles a Kanamicina	29%

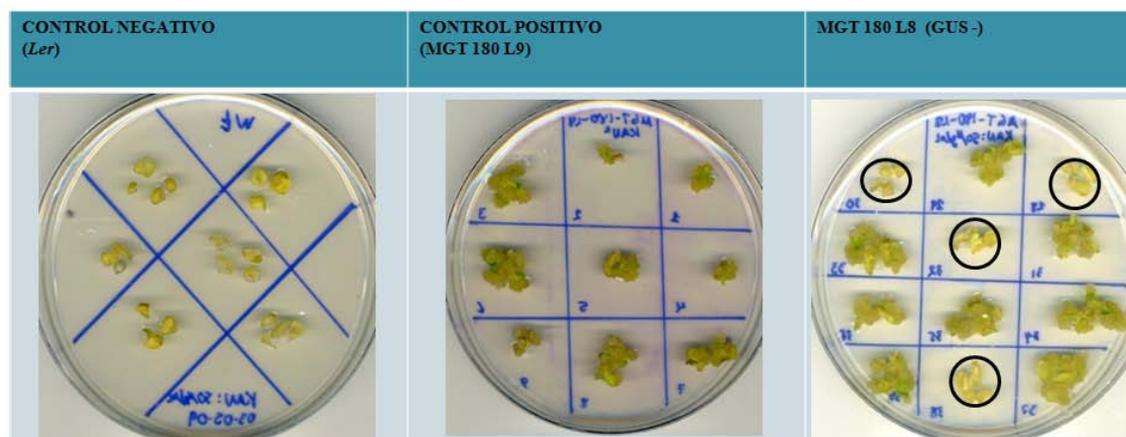
C

Figura. 26.- Búsqueda de la relación entre la resistencia a kanamicina y el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre. Se probó si hay relación entre la resistencia a kanamicina y el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre mediante la inducción de callos en presencia de kanamicina tomando explantes de una planta heterocigótica MGT180 L8 (GUS-) crecida en medio sin kanamicina. **A.** Plántulas de la líneas MGT180 L8 (GUS-) sembradas en medio MS 0.2X suplementado con 50 µg/mL de kanamicina (i), plántulas crecidas en medio MS 0.2X sin kanamicina (ii). **B.** Porcentaje de plántulas sensibles y resistentes a kanamicina que presentaron meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre. **C.** Inducción de callos en medio MS 0.2X suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, los explantes no formadores de callo están señalados por un círculo. $n=30$ plantas

7.3 Análisis molecular de la línea MGT 180.

Para realizar el análisis molecular de la línea seleccionada por el patrón de actividad de GUS relacionado con las etapas tempranas del desarrollo del primordio de la raíz lateral fue necesario estandarizar la técnica de TAIL-PCR. Trabajos preliminares realizados en laboratorio del Dr. Dubrovsky demostraron que el protocolo para TAIL-PCR no fue optimizado ya que fue difícil obtener las bandas de producto de PCR esperado.

7.3.1 Proceso de estandarización de la técnica de TAIL-PCR

Diseñamos oligonucleótidos degenerados de acuerdo a lo especificado por Liu *et al.*, (1995) y oligonucleótidos específicos del borde 3' del inserto utilizado para la construcción de las plantas mutantes (Figura 27).

A

BORDE Ds 3'

5' GAACAAAATACCGGTTCCCGTCCGATTTTCGACTTTAACCCGACCGGATCGTATCGGTTTTCGAT
TACCGTATTTATCCCGTTTCGTTTTCGTTA CCGGTATATCCCGTTTTCGTTTCCGTCCCGCAAGTTA
AATATGAAAATGAAAACGGTAGAGGTATTTTACCGACC GTTACCGACCGTTTTTCATCCCTA 3'

B

OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DS 3'1

DS 3'1

5' CGATTACCGTATTTATCCCGTTTCG 3'

DS 3'1b

5' GTATTTATCCCGTTCGTTTTTCGT 3'

DS 3'2

5' CCGGTATATCCCGTTTTTCG 3'

DS 3'3

5' GTTACCGACCGTTTTTCATCC 3'

C

OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS

ADI

NTCGASTWTS¹SGWGT²T

AD2

NGTCGASWGANAWGAA

D

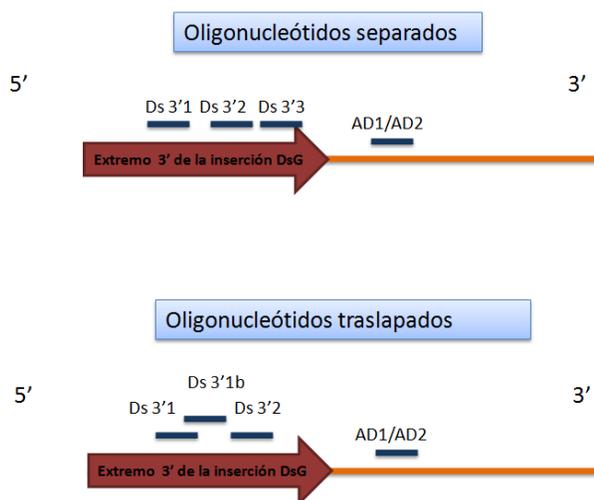


Figura 27.- Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en los TAIL-PCR. A. Secuencia del borde Ds 3' del inserto DsG, utilizado para la construcción de la colección de líneas transgénicas. **B.** Oligonucleótidos específicos del borde Ds 3'. **C.** Oligonucleótidos degenerados de acuerdo a Liu *et al.*, 1995. **D.** Esquema general de la posición de los oligonucleótidos empleados en las dos estrategias utilizadas para la amplificación del borde Ds 3' por TAIL-PCR. Las líneas azules representan la posición de los oligonucleótidos específicos empleados, la flecha roja corresponde a la inserción DsG y la línea naranja representa DNA genómico desconocido.

Se hizo la extracción de DNA genómico de algunas líneas transgénicas (Figura 28), a partir de tejido de plantas adultas crecidas en condiciones controladas. Se realizaron reacciones TAIL-PCR en las condiciones descritas anteriormente para las líneas transgénicas, MGT 22, MGT 180, MGT 307, MGT 582, MGT 606, MGT 767 y MGT 821. Los productos de la amplificación correspondiente a las reacciones primaria, secundaria y terciaria se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.0% o 1.5% (Figuras 29 a 35). Como se puede observar, se obtuvo una gran cantidad de bandas, algunas de ellas con el patrón característico de dichas reacciones TAIL-PCR, resultado que sugiere haber obtenido un resultado positivo. Con el fin de confirmar que se trataba de una banda específica y ya que se disponía de 4 oligonucleótidos para 3 reacciones de amplificación, se realizó una amplificación más con el oligonucleótido Ds 3'3 (Figura 27). A continuación

se realizó la ligación del fragmento obtenido en la reacción de TAIL-PCR en el vector de clonación pGEM[®]-T Easy Vector. La reacción de ligación se utilizó para transformar células químicamente competentes *DH5α* de *E. coli* mediante choque térmico .

Durante la estandarización molecular se observó que el utilizar oligonucleótidos específicos al borde de la inserción Ds 3' traslapados, aumentó la frecuencia de amplificaciones específicas.

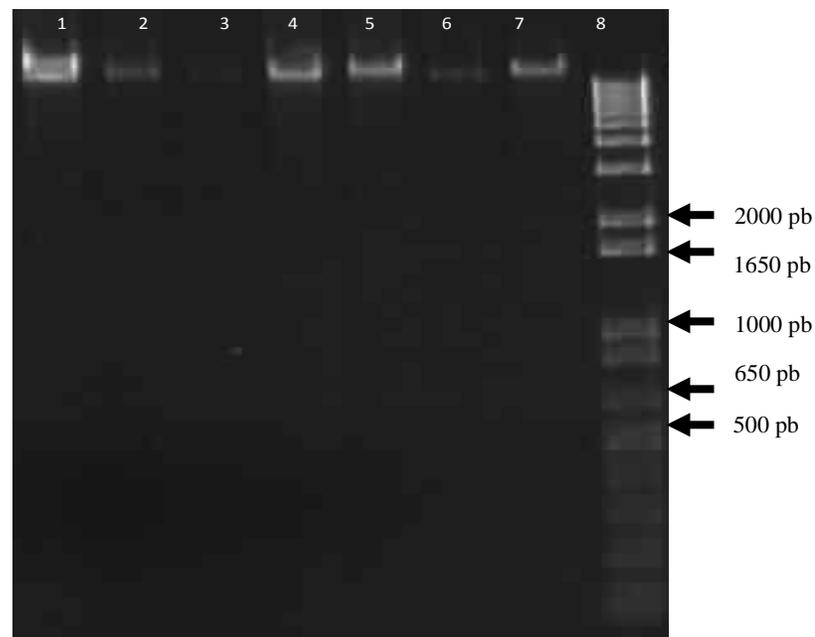


Figura 28. DNA genómico de las líneas transgénicas utilizadas para la estandarización del TAIL-PCR. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico; Carril 1: 5 μ L de DNA genómico de la línea MGT 307; Carril 2: 3 μ L de DNA genómico de la línea MGT 180; Carril 3: 3 μ L de DNA genómico de la línea MGT 821; Carril 4: 3 μ L de DNA genómico de la línea MGT 307; Carril 5: 3 μ L de DNA genómico de la línea MGT 22; Carril 6: 3 μ L de DNA genómico de la línea MGT 582; Carril 7: 3 μ L de DNA genómico de la línea MGT 767; Carril 8: Marcador de peso molecular 1Kb.

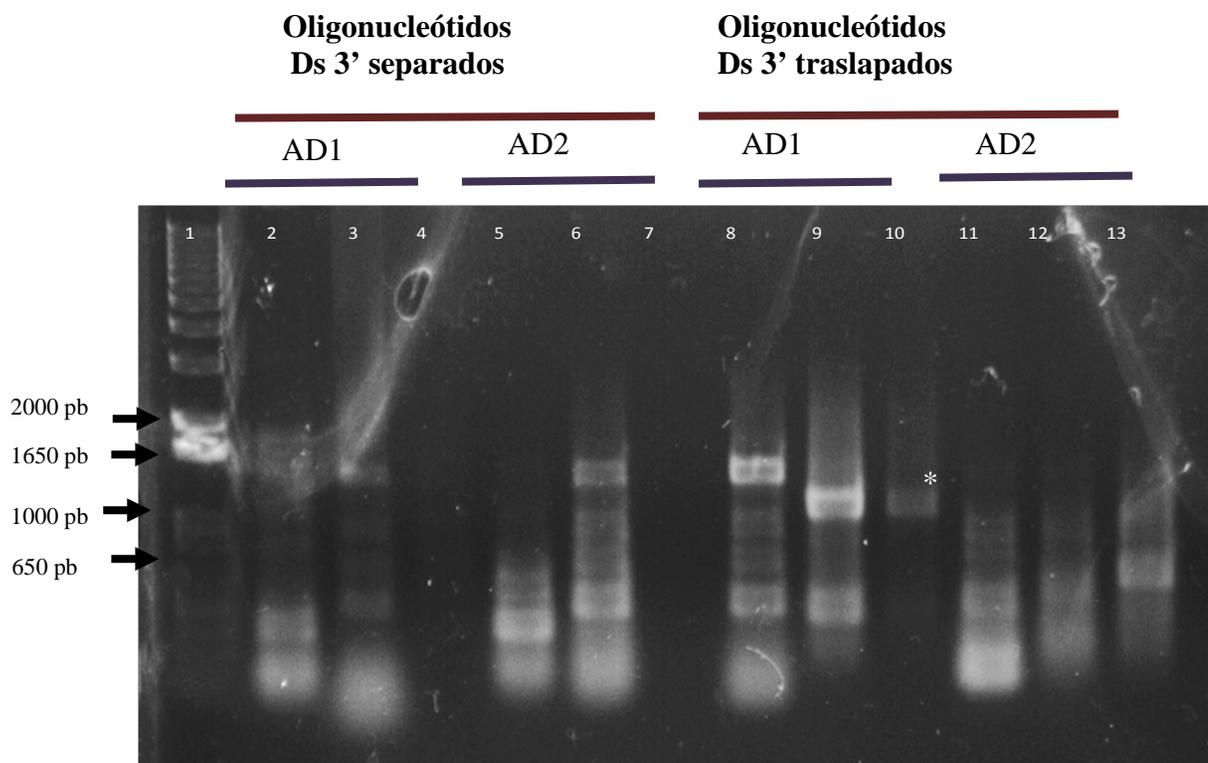


Figura 29.- TAIL-PCR de la línea MGT 767. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 767; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 4: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'3 y AD1; Carril 5: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 6: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2; Carril 7: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'3 y AD2; Carril 8: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 9: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 10: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 11: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 12: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2; Carril 13: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

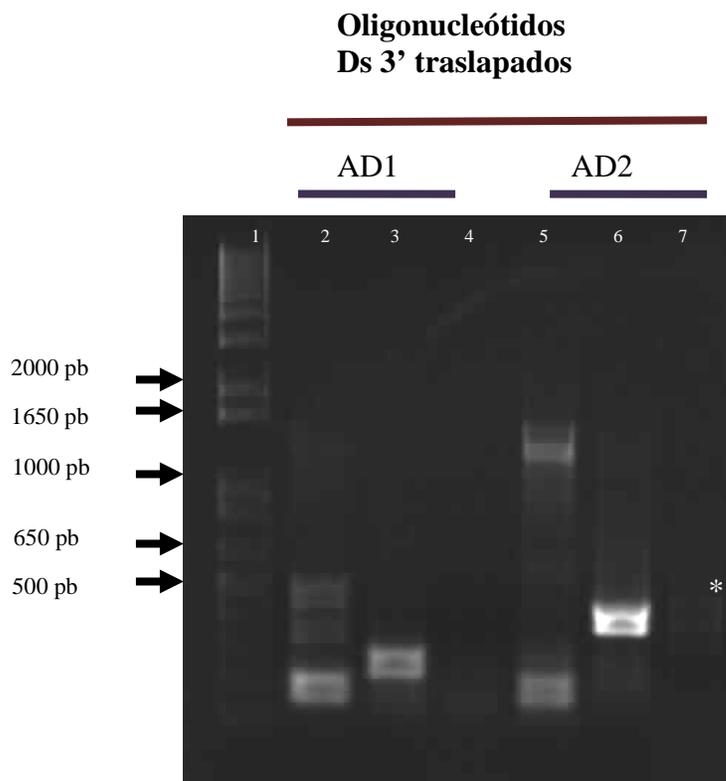


Figura 30.- TAIL-PCR de las líneas MGT 821. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 821; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 4: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 5: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 6: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2; Carril 7: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

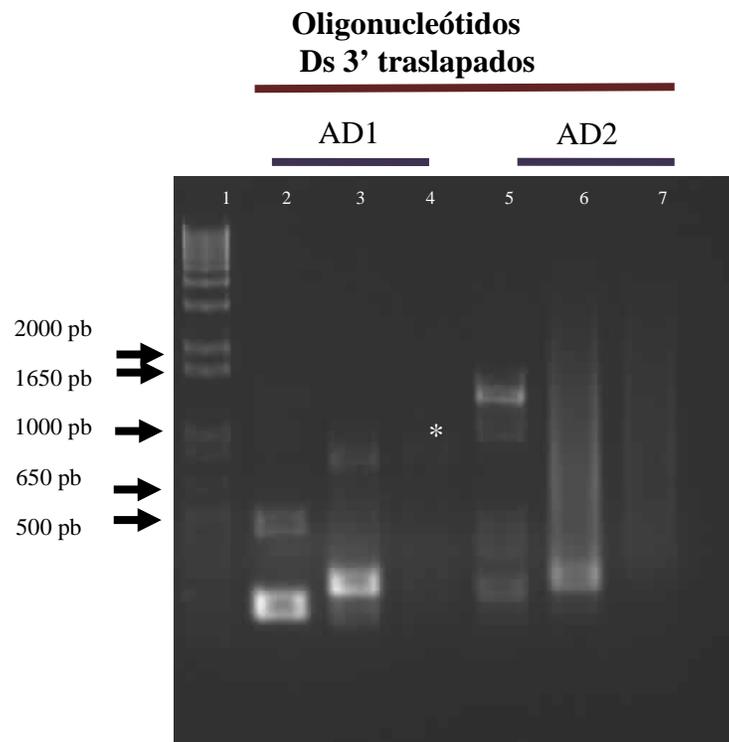


Figura 31.- TAIL-PCR de las líneas MGT 582. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 582; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 4: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 5: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 6: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2; Carril 7: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

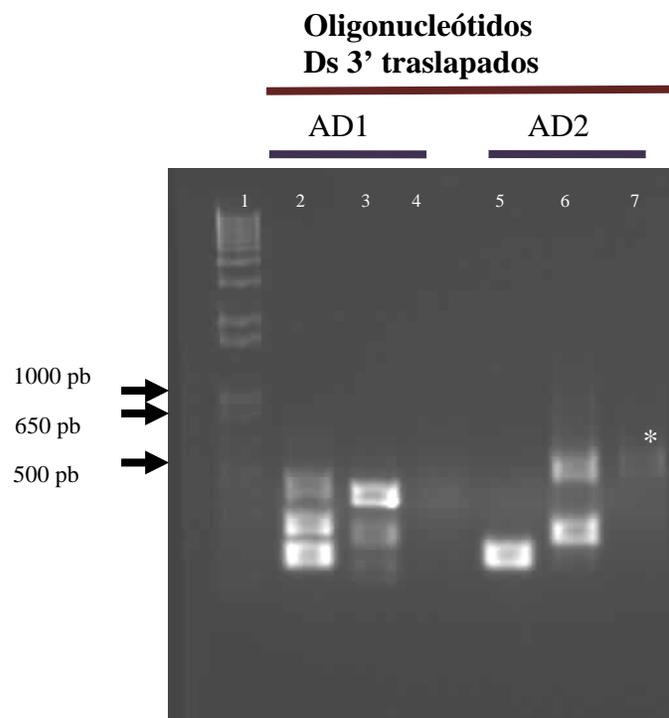


Figura 32.- TAIL-PCR de las líneas MGT 606. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 606; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 4: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 5: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 6: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2; Carril 7: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

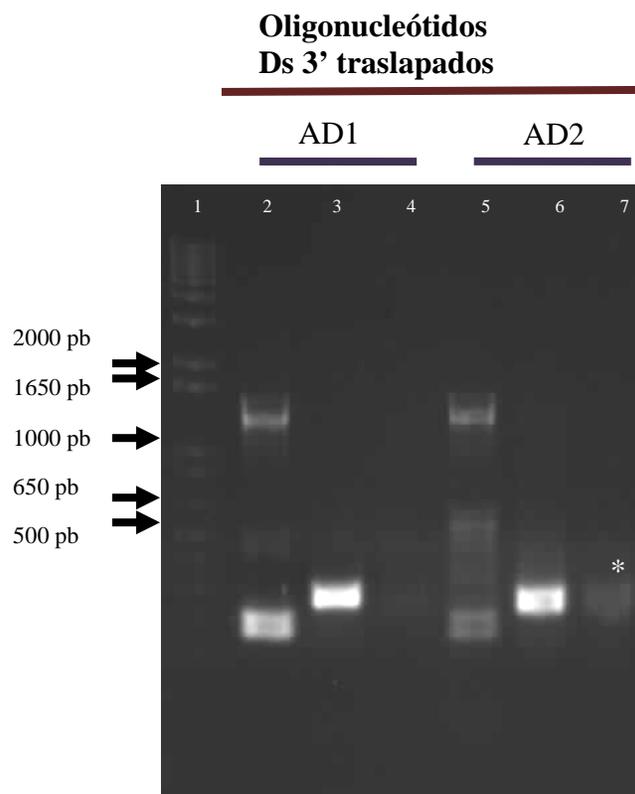


Figura 33.- TAIL-PCR de las líneas MGT 307. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 307; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 4: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 5: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 6: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2; Carril 7: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

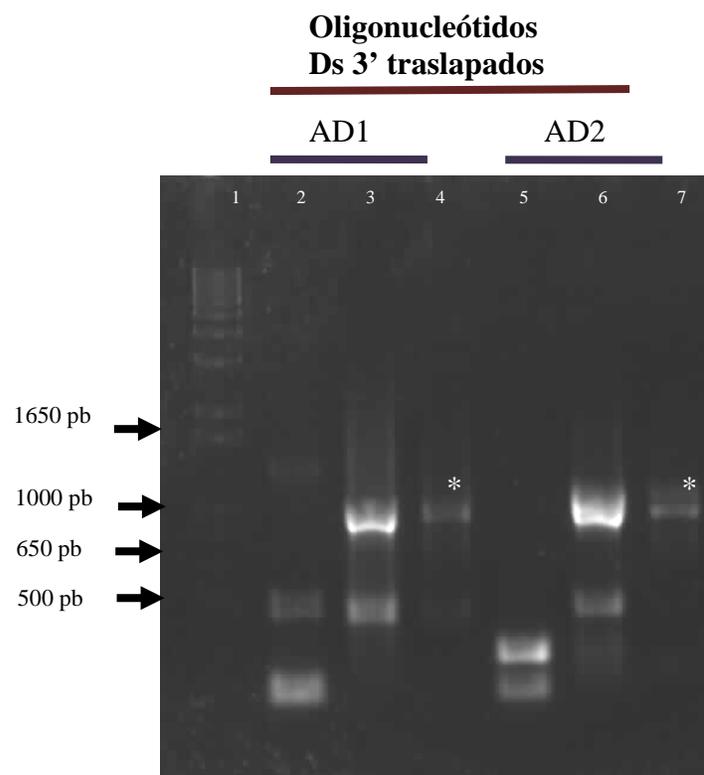


Figura 34.- TAIL-PCR de las líneas MGT 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 22; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 4: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 5: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 6: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2; Carril 7: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

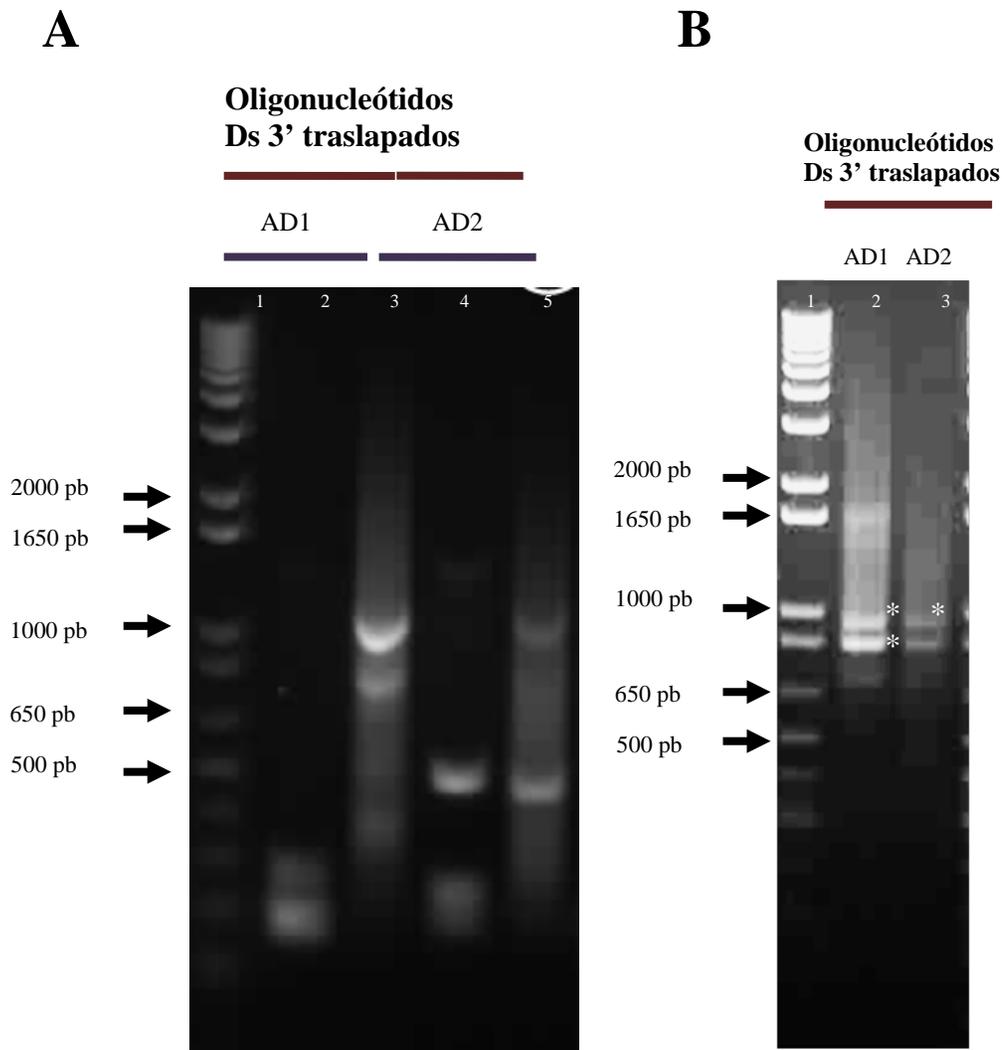


Figura 35.- TAIL-PCR de las líneas MGT 180. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 180; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD1; Carril 3: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD1; Carril 4: reacción primaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y AD2; Carril 5: reacción secundaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'1b y AD2. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos del TAIL PCR de la línea MGT 180; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD1; Carril 3: reacción terciaria, utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y AD2. El asterisco indica la amplificación de la reacción terciaria candidata para su secuenciación.

7.3.2 Análisis molecular de la línea MGT180 L9 (GUS +)

Se realizó un TAIL-PCR con DNA genómico obtenido de la planta transgénica MGT 180 (Figura 35) y MGT180 L9(GUS+, Figura 36). Como se observa en la fotografía, se obtuvieron productos de la reacción secundaria y terciaria que predice la posibilidad de haber rescatado un fragmento específico asociado a la inserción en estas plantas transgénicas. Los productos de amplificación obtenidos en la reacción terciaria se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy Vector y con este plásmido se transformaron células competentes de *DH5α* de *E. coli*, se extrajo el DNA plasmídico y se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, con el fin de identificar los plásmidos que contienen las inserciones correspondientes a las amplificaciones obtenidas en reacción terciaria del TAIL-PCR, se realizó una digestión con la endonucleasa de restricción específica *EcoRI*, para identificar las clonas que contienen los fragmentos referidos. Finalmente se mandaron secuenciar 4 plásmidos producto de dos TAIL-PCR independientes, 1 correspondiente a una planta de la línea MGT 180 y 3 plásmidos correspondientes a la línea MGT180 L9 (GUS+). Las 4 bandas secuenciadas correspondientes a 2 TAIL-PCR independientes presentaron la secuencia del borde Ds 3' de la inserción indicativo de un TAIL-PCR exitoso, la secuencia adyacente en una de las clonas correspondió a una región de DNA de *Arabidopsis thaliana*, localizada en el cromosoma 3 en la posición 93955-94290 del BAC T4C2 ($e=4e-167$) y una pequeña región distal correspondiente a Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8 ($e=1e-167$). Las otras 3 clonas la secuencia adyacente al borde Ds 3' tuvo gran similitud a secuencias de vectores, entre ellos Cloning vector pAJ1 (Figura 37).

A

AGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATAT
 GGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATCACTAGTGATTGTATTTATCCCGTTCGTTTTCG
 TTACCGGTATATCCCGTTTTCGTTTTCCGTCCCGCAAGTTAAATATGAAAATGAAAACGG
 TAGAGGTATTTACCGACCGTTACCGACCGCA TGTAGGAGAGAAAAGGGTTTGAAAT
 GTGGAGGTTTAGGGTTTAAGTTGTGGCTTAAGGTAAACAAATCAGAAGGATGATG
 GTTTCTGTTATGGCAATAACACAAGAGCGTGCCCCATGGTGCGGTATATGGGTT
 CCACTAGTTTTGGTCTTTTGGGGTGTGATGTTCAAGGAAAAACAAAGAGTTGAAT
 AAGAAAATGAAAATATGAAGCAATCTAACAAACAAACAAAAGTAAAGATGAGGC
 GCTTTTGAAGGATACACCAAGGAATTACCGTTAACCGTGATGGTGAAATTTATG
 AAAAGGGAAAGATTTGAATGGGCGTGAAACCGATACGAAAACG
 GTATTTATCCCGTTCGTTTTCGTATCGGTTTCACGCCATTCAAATCTTTCCCTTTT
 CATAAATTTACCATCACGGTTAACGGTAATTCCTTGGTGTATCTTTTCAAAAAGC
 GCCTCATCTTTACTTTTGTGTTGTTGTTAGATTGCTTCATATTTTTCATTTTCTTAT
 TCAACTCTTTGTTTTCTTGAACATCACACCCCAAAGACCAAACACTAGTGGAAC
 CCATATACCGCACCATGGGGGCACGCTCTTGTGTTATTGCCATAACAGAACCCAT
 CATCCTTCTGATTTGTTTACCTTAAGCCACAACCTTAAACCCTAAACCTCCACATTT
 CAAACCCTTTTCTCTCTACATG CGGTCGGTAACGGTCGGTAAAATACCTCTACCGTT
 TTCATTTTCATATTTAACTTTCGGGGACGGAAACGAAAACGGGATATACCGGTAACGAA
 AACGAACGGGATAAATACAATCACTAG TGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTGCACCATA
 TGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAAT

B

GCTCCCGGCCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGTATTTATCCCGTTCGTTTTCGT
 TACCGGTATATCCCGTTTTCGTTTTCCGTCCCGCAAGTTAAATATGAAAATGAAAACGGT
 AGAGGTATTTTACCGACCGTTACCGACCGTTTTTCATCCCTA CCGTGACCCGGCCGCGCG
 GGGGATCCACAGGACGGGTGTGGTTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGT
 AGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCCGCAAGCGGTTCGGACGGTGCTCCGAGAACG
 GGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTACTGG
 CGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAA
 GCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTA
 GATTTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATT
 AAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCATCATGGTGATTTCTCACTTGATAAC
 CTTATTTTGGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGC
 AGACCGATACGAAAACGAACGGGATAAATACAATCACTAG TGAATTCGCGGCCCGCCTG
 CAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT
 AGTGTACCTAAAT AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT
 TATCC

Figura 37.-Secuencias del producto de amplificación obtenido por TAIL-PCR de la línea MGT 180. A. Secuencia del producto de amplificación por TAIL-PCR de la línea MGT180 L9 (GUS+), el borde de la inserción Ds 3' se muestra en rojo, la región en naranja corresponde a una región de DNA de *Arabidopsis thaliana*, específicamente en el cromosoma 3 en la posición 93955-94290 del BAC T4C21 (e=4e-167), la región en rojo oscuro corresponde a Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8 (e=1e-167), el vector de clonación utilizado se muestra en amarillo. **B.** Secuencia del producto de amplificación por TAIL-PCR de la línea MGT 180 (GUS-) y MGT180 L9 (GUS+), el borde de la inserción Ds 3' se muestra en rojo, la región

subrayada corresponde a una región de vector (e=2e-174), el vector de clonación utilizado se muestra en amarillo.

Con el objetivo de confirmar la posición de la inserción en el DNA genómico de la línea MGT180 L9 (GUS+) se diseñaron oligonucleótidos específicos para el DNA genómico de *A. thaliana* adyacente al que fue amplificado por el TAIL-PCR (www.tair.org, Figura 38). Se realizaron amplificaciones utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos específicos, Ds 3'3 como oligonucleótido sentido y Proximal 3' como oligonucleótido antisentido, Ds 3'2 como oligonucleótido sentido y Proximal 3' como oligonucleótido antisentido, Ds 3'3 como oligonucleótido sentido y Distal 3' como oligonucleótido antisentido, y Ds3'1 como oligonucleótido sentido y Distal 3' como oligonucleótido antisentido. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (50°C-60°C) y se utilizó el DNA genómico de plantas de la línea transgénica MGT180 L9 (GUS+) (Figura 39). Debido a que se utilizaron oligonucleótidos específicos y temperaturas de alineamiento estrictas, los productos de amplificación en la electroforesis confirmaron el sitio de la inserción en el genoma de *A. thaliana*; como control negativo se realizaron reacciones de PCR en las mismas condiciones y utilizando DNA genómico de una planta de tipo silvestre (*Ler*). Como control positivo se realizaron amplificaciones con los oligonucleótidos específicos Proximal 5' como oligonucleótido sentido y Distal 3' como oligonucleótido antisentido, y Proximal 5' como oligonucleótido sentido y Proximal 3' como oligonucleótido antisentido obteniéndose productos de amplificación de peso molecular esperado (Figura 40). La inserción DsG amplificada mediante el TAIL-PCR se localizó entre los genes At3g60860 y At3g60870. El Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8 encontrado rio abajo se localizó en la región 5'UTR putativa del gen At3g60870 (Figura 41).

A**SECUENCIA DE DNA GENOMICO DE *A. thaliana***

5'

GGATTAGCATTTC AATTATACATACACGAATATATATAGGTCTGGTTCTGACAT **AATTT**
ACAAAGATAAAGACTAAGATCGACAAATCAATGAATATAGACAGAAAGAGAAGTCTT
 ATTTTCTTCTACTAATTTAAAATAGCCAAAAGGGACTAATGTAGTAATGTAGTAGAATG
 GTAAACTATGAGTAGTTCTATATCCCACAAGACACGGTCTGACTCGTTGTGTTTTGTAA
 TCTGACTTCATTAGTGTTGTTTGGGTCCCAATCCAATTCCCCATGTCCGGCACATGCTC
 GTCTTT**CTCGGTTTCACGCCATTCAAATCTTTCCCTTTTCATAAAATTTACCATCA**
CGGTTAACGGTAATTCGTTGGTGTATCTTTTCAAAAAGCGCCTCATCTTTACTTTT
GTTTGTGTTAGATTGCTTCATATTTTTCATTTTCTTATTCAACTCTTTGTTTTTC
CTTGAACATCACACTTCAAAAAGACCAAAACTAGTGGAACCCATATACCGCACCAT
GGGGGCACGCTCTTGTTATTGCCATAACAGAACCCATCATCCTTCTGATTTGTT
TACCTTAAGCCACA ACTTAAACCC**TAAACCTCCATATTTCAAACCC****TTTTCTCTCCT**
ACATGTATCACTGCTTCACTTCCACTTTTCATCAACCTCACGTTCCAAGCCCTAACTA
 TATGTATATATAAATAACTCTATATTTGATTCATTAATTTAGGGACACCAAATCTATTC
 AACCTAAAAGCCTTCTTTTCCCCTATATTGACCAACTTTTTAGCGAATCAGAAGAGG**AA**
TGGATGAGGTATCTCGTTCTCATACACCGCAATTTCTATCAAGTGATCATCAGCACTAT
 CACCATCAAAACGCTGGACGACAAAACGCGGCAGAGAAGAAGAAGGAGTTGAACCC
 AACAATATAGGGGAAGACCTAGCCACCTTTCCTTCCGGAGAAGAGAATATCAAGAAG
 AGAAGGCCACGTGGCAGACCTGCTGGTTCCAAGAACAACCCAAAGCACCAATCATA
 GTCACTCGCGA^{3'}

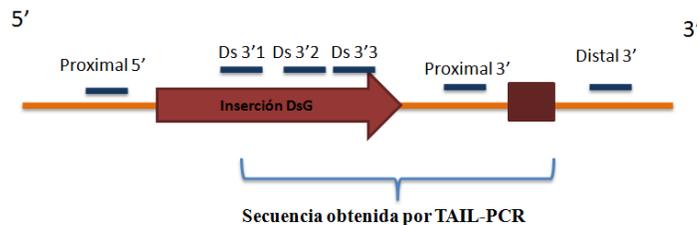
B**OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS DE DNA GENOMICO DE *A. thaliana*****Proximal 3'**5'GGGTTTGAAATATGGAGGTTTA^{3'}**Distal 3'**5'ATGAGAACGAGATACCTCATCCATT^{3'}**Proximal 5'**5'AATTTACAAAGATAAAGACTAAGA^{3'}**C**

Figura 38.- Secuencia de oligonucleótidos empleados para confirmar la posición de la inserción en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. **A.** Secuencia del cromosoma 3 en la posición 93955-94290 del BAC T4C21 ($e=4e-167$), la región en verde corresponde a la amplificada mediante TAIL-PCR. La región en azul se tomo como plantilla para diseñar los oligonucleótidos específicos. **B.** Oligonucleótidos específicos de DNA genómico de *A. thaliana*. **C.** Esquema general de la posición de los oligonucleótidos empleados para confirmar la posición de la inserción en el genoma de *A. thaliana*. Las líneas azules representan la posición de los oligonucleótidos específicos empleados, la flecha roja representa la inserción DsG y el recuadro rojo esquematiza la secuencia del Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8.

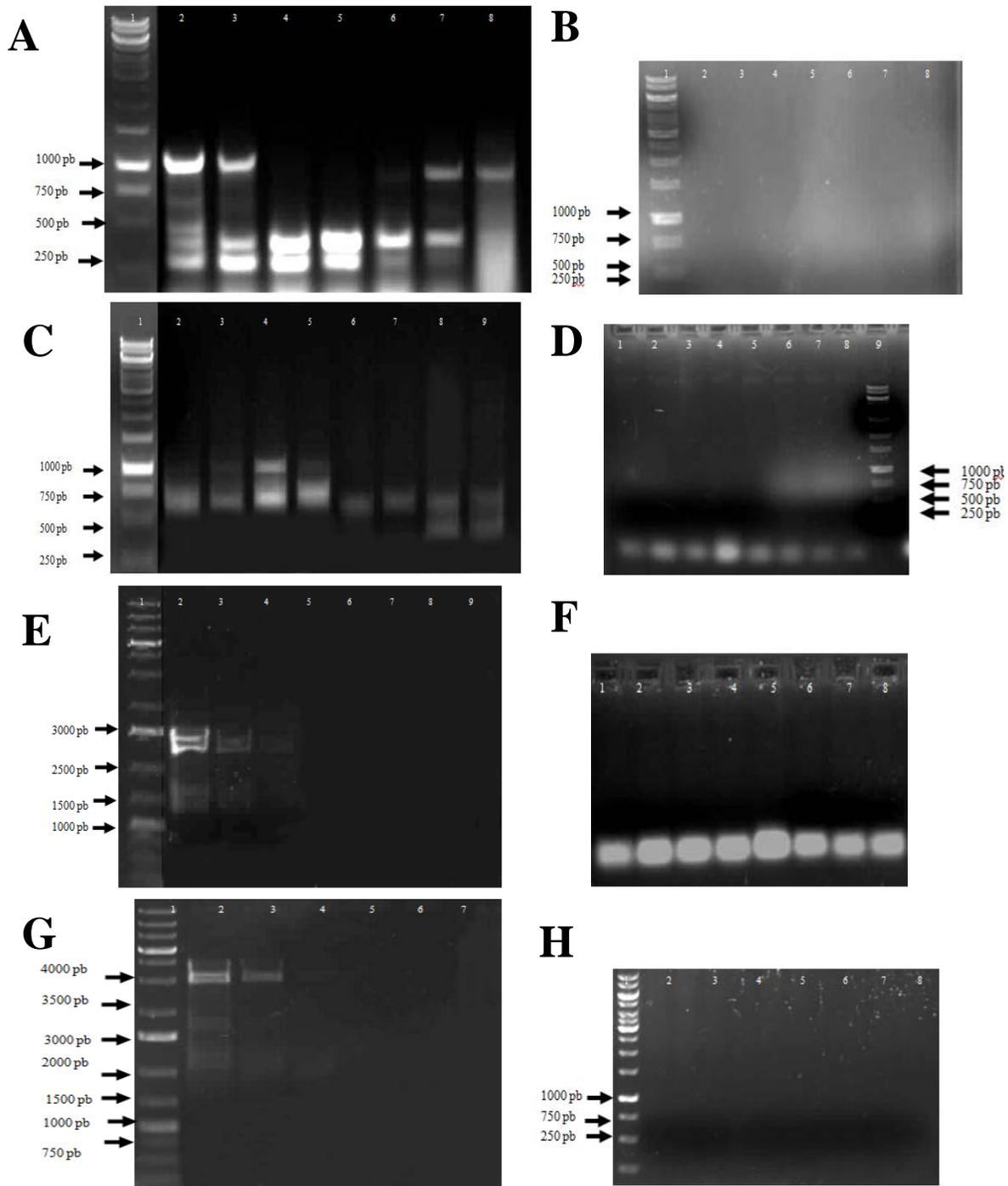


Figura 39. PCR para confirmar la posición de la inserción en el genoma de la línea MGT180 L9 (GUS+). Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación del extremo Ds 3' del inserto y de un sitio cercano a la inserción en el genoma de la línea MGT180 L9, se utilizó un gradiente de temperatura de 50°C-60°C. **A.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2-8: producto de amplificación utilizando oligonucleótidos Ds3'3 y proximal 3'. **C.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2-8: producto de amplificación utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y proximal 3'. **E.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2-8: producto de amplificación utilizando oligonucleótidos Ds3'3 y Distal 3'. **G.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2-8: producto de amplificación utilizando oligonucleótidos Ds3'1 y distal 3'. **B, D, F, H.** Control negativo, PCR utilizando DNA genómico de plantas de tipo silvestre (*Ler*)

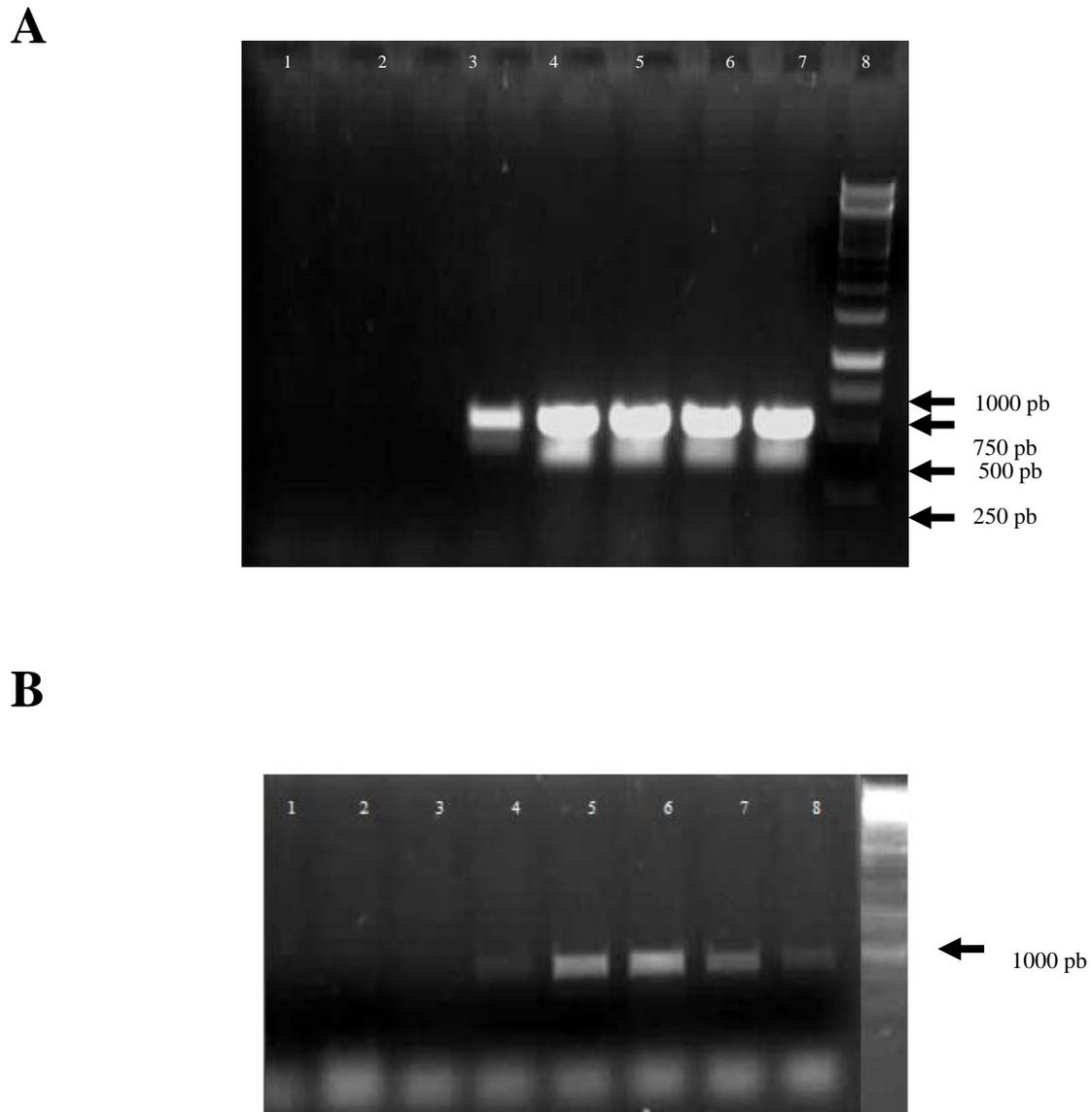


Figura 40. PCR control positivo utilizando DNA genómico de *A. thaliana*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación del extremo Ds 3' del inserto y de un sitio cercano a la inserción en el genoma de la línea MGT180 L9 (GUS+), utilizando los oligonucleótidos Ds 3'2 y proximal, se utilizó un gradiente de temperatura de 48°C-60°C; Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2-8: producto de amplificación utilizando oligonucleótidos Ds3'2 y proximal.

Los genes candidatos encontrados en este trabajo para ser responsables de la actividad de GUS observada en los primordios de raíces laterales en la línea transgénica MGT 180 son el gen At3g60870 ya que una inserción esta posicionada en su región UTR 5' putativa y el gen At3g60860 por su cercanía al lugar de la inserción. El gen At3g60870 codifica para una proteína nuclear con un dominio AT ("AT-hook"), la proteína AHL18. El gen At3g60860 codifica para una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina (ARF-GEFs) localizada intracelularmente.

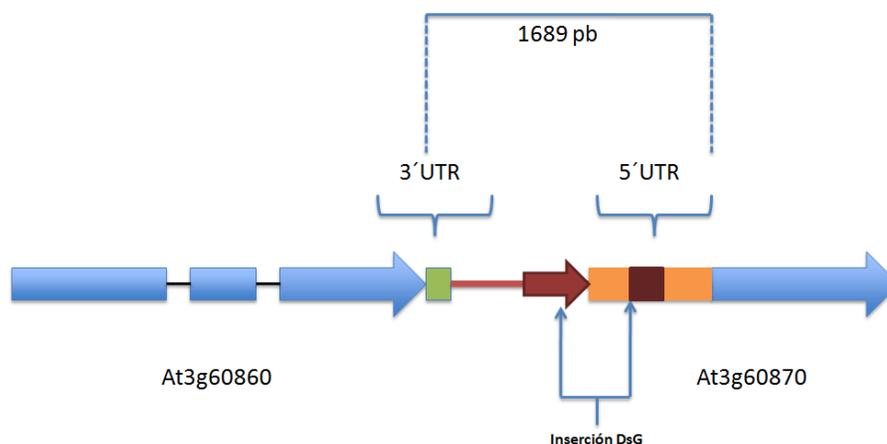


Figura 41. Mapa genético de At3g60860 y At3g60870. Indica la ubicación y sentido de la inserción DsG e inserción del Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8. Las flecha azules representan los marcos de lectura de los genes At3g60860 y At3g60870, la región en verde esquematiza la región 3'UTR del gen At3g60860, la región naranja corresponde a la región 5'UTR putativa del gen At3g60870, la flecha roja representa la inserción DsG y el recuadro rojo al Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8.

8 DISCUSIÓN

La raíz es un órgano esencial para la planta ya que le brinda entre otras funciones fijación al suelo, absorción y transporte de nutrientes para que pueda llevar a cabo la fotosíntesis en la parte aérea (Rost *et al.*, 1998). Hoy en día se conoce bien la biología del sistema radical pero aún se sabe poco sobre los mecanismos moleculares y/o celulares que regulan la iniciación de raíces laterales, un punto cardinal en el desarrollo de la raíz lateral y base de la formación del sistema radical en plantas. Entre las estrategias para la identificación de genes involucrados en un proceso específico, está el uso de plantas mutantes, a través de cuya caracterización es posible determinar los mecanismos genéticos y bioquímicos que desempeña un gen determinado.

El estudio de plantas mutantes por inserción posee varias ventajas, la más importante es que proporciona una marca molecular que facilita enormemente el aislamiento del gen afectado, por ejemplo mediante TAIL-PCR (Grossniklaus, 1998; Acosta-García and Vielle-Calzada, 2004; Ito *et al.*, 2004). Adicionalmente, las plantas mutantes por inserción de genes reporteros permite el aislamiento de genes relacionados al proceso, por ejemplo la selección de líneas transgénicas con base en el patrón de actividad de GUS en algún tejido de interés. El gen de GUS depende de que se haya insertado cerca de regiones reguladoras del gen afectado, por lo que es posible relacionar la expresión de GUS con el gen de interés.

8.1 Análisis detallado de los patrones de actividad de GUS de plántulas de 12 líneas transgénicas.

En el presente trabajo se analizaron 12 líneas transgénicas generadas mediante la inserción de elementos transponibles (sistema Ac/Ds). Se escogieron 10 de tipo “gene trap” (MGT) y 2 de tipo “enhancer trap” (MET) con base en la información preliminar de su patrón de actividad de GUS en células de periciclo.

La identificación de líneas transgénicas con patrones de actividad de GUS específicas a un tejido o grupo de tejidos es muy valioso, ya que sugiere que la función del gen involucrado está confinada en un tejido podría ser importante para el proceso bajo estudio. Particularmente el patrón de actividad de GUS de las líneas MGT 22 y MGT 821 se presentó únicamente en tejidos vasculares a lo largo de toda la planta (Figura 6 y Figura 16). Esto sugiere un posible papel de los genes involucrados en la regulación genética de algunos procesos de desarrollo y/o metabolismo del tejido vascular en general. Adicionalmente, la línea transgénica MGT 821 presentó un aparente fenotipo relacionado a la distribución y morfología de los primordios de raíces laterales (Figura 17). Se ha

reportado que el patrón de emergencia de raíces laterales en sentido longitudinal es variable y no puede ser explicado por mecanismos que requieren un tiempo específico, distancia o número de células de periciclo entre iniciaciones (Dubrovsky *et al.*, 2006). La curvatura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* influye en la distribución de auxinas en las células de periciclo y con ello, en la posición de órganos laterales a lo largo de la raíz (Laskowski *et al.*, 2008). La formación de raíces laterales puede ser inducida por incrementos globales en la concentración de auxinas (Boerjan *et al.*, 1995) y más específicamente, la acumulación local de auxinas en células del periciclo es una señal necesaria y suficiente para adquirir la identidad de célula fundadora de raíces laterales (Dubrovsky *et al.* 2008).

La línea transgénica MGT 821 tiene varias características interesantes que sugieren afectar un gen relacionado al desarrollo de primordios de raíces laterales. Por supuesto, es necesario confirmar la información preliminar relacionada al fenotipo de distribución anormal de primordios de raíces laterales de la línea MGT 821 mostrada en este trabajo.

Otra línea transgénica con patrón tejido específico es la línea transgénica MGT 303, la cuál fue seleccionada porque se encontró actividad de GUS localizada en células de periciclo. Sin embargo, en este estudio la línea presentó un patrón de actividad únicamente en primordios de hoja verdadera (Figura 7). Se revisaron plántulas provenientes de la misma generación que el Dr. Ales Soukup estudió y plántulas pertenecientes a generaciones posteriores. Las diferencias encontradas en la expresión de GUS podrían ser por un error al etiquetar los sobres de las semillas de las líneas transgénicas o al nombrar las fotografías presentadas en el trabajo de el Dr. Ales Soukup.

Se analizó una cantidad significativa de plantas de las líneas MGT 307 y MET 115 y no se observó actividad de GUS. Existen genes que son activados únicamente bajo algún estímulo físico o químico, en ciertas etapas de desarrollo de la planta, etc. Por ejemplo los genes que tienen un patrón de expresión temporal, como el gen A9 específico del tapetum de *A. thaliana* (Paul *et al.*, 1992). El no haber encontrado actividad de GUS en estas líneas transgénicas puede ser porque el gen o enhancer involucrados se activan bajo condiciones de crecimiento específicas. Otra causa podría ser que la inserción que lleva el gen que codifica para GUS sufrió alguna alteración después o durante la transposición.

Las plantas de las líneas transgénicas MGT 511, MGT 512, MGT 521 y MGT 582 presentaron un patrón de actividad similar pero no idéntico. Es notable la diferencia en la intensidad de la tinción entre ellas y cada una posee detalles únicos en su patrón de tinción (Figuras 9 a 13). Por el momento sería muy difícil tratar de relacionar los genes involucrados a algún proceso específico ya que la actividad de GUS se observó en múltiples tejidos y en casi toda la planta, lo que nos sugiere posible pleiotropía o la existencia de más de una inserción en las líneas transgénicas. Se encontraron primordios de raíces laterales en etapas tempranas teñidos pero no fue una característica constante que sugiera una posible relación con el desarrollo de primordios de raíces laterales, por lo tanto estas líneas no fueron seleccionadas para un estudio más detallado. La línea transgénica MET 441 tampoco fue seleccionada por la misma razón. Si se confirman los datos obtenidos en este trabajo en relación a las alteraciones morfológicas de la línea MGT 511

es posible que la inserción de esta línea MGT 511 se localize en genes involucrados con el desarrollo del periciclo. Esto debido a la presencia constante de células de periciclo cortas y desarrolladas en gran parte de la longitud de la raíz (Figura 10). El proceso de formación de nuevas raíces laterales proviene de un limitado número de células de periciclo, adyacentes a los polos del xilema, llamadas células fundadoras (Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2001). Sin embargo, el mecanismo que restringe las divisiones formativas a estas pocas células, así como el mecanismo genético que proporciona la identidad de la célula fundadora sigue siendo un misterio sin resolver, por lo cual la caracterización de esta mutante podría generar información en relación a este proceso.

Para trabajos posteriores se debe tener en cuenta que no necesariamente la inserción que da la actividad de GUS está directamente relacionada con el fenotipo.

8.2 La línea MGT 180 se seleccionó como la línea de mayor interés en relación al desarrollo de raíces laterales.

La línea transgénica MGT 180 fue seleccionada como la más interesante para continuar su estudio pues presentó un patrón de expresión de GUS estable (Figura 20). La actividad de GUS se observó en primordios de raíces laterales en etapas tempranas, en tanto que en etapas más avanzadas permanecieron en la base del primordio. Rara vez se observaron primordios sin actividad de GUS. El patrón de expresión de GUS en la línea MGT 180 nos indica que es posible que el gen involucrado con la expresión de GUS tenga alguna relación con el desarrollo de primordios de raíces laterales.

8.3 El análisis genético de la línea MGT 180 sugiere la existencia de al menos dos inserciones en la línea.

Entre las plantas analizadas de la progenie de la línea MGT 180 se seleccionaron dos plantas. Una de ellas la planta MGT180 L9 GUS+ fue seleccionada porque su progenie presentó actividad de GUS en la totalidad de las plantas analizadas. La segunda planta, la MGT180 L8 GUS- no presentó actividad de GUS en su progenie. Sin embargo, la progenie de ambas plantas presentó resistencia a kanamicina. Estos datos sugirieron la posibilidad de dos inserciones segregadas en las líneas MGT180 L9 (GUS+) y MGT180 L8 (GUS-).

Las líneas transgénicas MGT 180 L8 (GUS-) y L9 (GUS+) presentaron fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre en las raíces laterales. Se encontró dicho fenotipo tanto en la línea MGT180 como en la línea MGT180. Esto sugirió que el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre no está relacionado con la inserción responsable de la actividad de GUS en primordios de raíces laterales. Adicionalmente, el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre se encontró incluso en plantas sin resistencia a kanamicina lo que apoya nuevamente que el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre no está relacionado a la expresión de GUS observada en la línea MGT180 L9(GUS+). El análisis de plantas de

diferentes edades enfocado en la observación del fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre mostró un incremento en el número de raíces laterales afectadas en una planta conforme a la edad de la planta. Sin embargo, debido a que el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre sólo se presentó en plantas de tipo silvestre de 20 días de edad, es poco probable que el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre sea causado por algún proceso de desarrollo normal. Se obtuvo una proporción muy baja de raíces laterales afectadas en las plantas de tipo silvestre (*Ler*) en comparación con la totalidad de raíces laterales afectadas en la línea MGT 180 lo que sugiere que las plantas de esta están respondiendo de manera exagerada a algún tipo de estímulo externo. Es probable que el acortamiento del meristemo de raíces laterales sea causado por la mutación de algún gen relacionado a la respuesta a estímulos medio ambientales.

El hecho de que la línea MGT180 L8 (GUS-) presentó heterocigocidad para la resistencia a kanamicina y al mismo tiempo meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre en raíces laterales en la totalidad de las plantas analizadas de 20 días de edad indicó que el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre no tiene relación con la resistencia a kanamicina.

El análisis genético de la línea MGT180 L9 (GUS+) también dio algunos datos inesperados. El análisis de la progenie indicó homocigocidad para la actividad de GUS y para la resistencia a kanamicina. Sin embargo, estos datos no descartaron la existencia de la inserción que le da la característica de no tinción y resistencia a kanamicina a la línea MGT180 L8 (GUS-). Por lo tanto, se realizó una retrocruza de la línea MGT180 L9 (GUS+) para verificar el número de inserciones. Sorpresivamente, solo se obtuvieron los resultados correspondientes a una planta homocigota para la actividad de GUS en la progenie de una sola planta (MGT180 L9-2) de tres plantas analizadas.

Algunas de las posibles explicaciones a estos datos contradictorios son las siguientes: Se ha publicado que el sistema Activador/Disociador (Ac/Ds) puede tener silenciamiento de los elementos Ds (Szeverenyi *et al* 2006). El silenciamiento del gen reportero (GUS) fue reportado por Kloti *et al* (2002), la pérdida de la expresión en el tejido vascular se correlacionó con metilación de la región promotora. La metilación del transposón es responsable de la inhibición de la expresión del transgén y la transposición en líneas enhancer trap (Ac/Ds) de arroz. (Greco *et al.*, 2003). Estudios genómicos en *A. thaliana* ha revelado que muchos genes son metilados en sus regiones promotoras o en parte de su marco de lectura y que la metilación del gen está altamente correlacionada con el nivel de transcripción (Zhang *et al.*, 2006; Zilberman *et al.*, 2007). Por lo tanto tomando en cuenta los datos experimentales y los datos reportados sobre el sistema Ac/Ds se puede decir que es probable que al menos una inserción existente en la línea MGT 180 se esté silenciando. Esto daría lugar a los tres tipos de plantas observados, una planta con una inserción aparentemente integra con actividad de GUS y resistencia a kanamicina (GUS⁺/Kan^R). Otra planta donde la inserción perdió la expresión de GUS por silenciamiento o por rearreglo, pero sin afectar la resistencia (GUS⁻/Kan^R) y una planta

silenciada en los dos caracteres dándonos la planta GUS^-/Kan^S . Probablemente la inserción en la planta (GUS^-/Kan^S) sería la causante de los meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre en las raíces laterales. Es posible también que el fenotipo no sea causado por alguna inserción silenciada sino por alguna mutación puntual en cualquier otra parte del genoma.

Otra posible explicación del fenotipo de meristemos cortos independiente al silenciamiento de la inserción Ds, es que dicho fenotipo es producto de una mutación causada por la movilización de la inserción Ds posterior a la creación de la colección de líneas transgénicas. Este suceso también explicaría los tres tipos de plantas (GUS^+/Kan^R , GUS^-/Kan^R y GUS^-/Kan^S). La mutación producto de la movilización de la inserción Ds daría como consecuencia el fenotipo de meristemos más cortos que en la planta de tipo silvestre y sería la planta de tipo GUS^-/Kan^S . Si este fuera el caso, la posición de la mutación responsable del fenotipo de meristemos cortos no se podría determinar mediante TAIL-PCR debido a la ausencia del marcador molecular que nos proporciona la inserción Ds. Sería posible encontrar el gen afectado si quedara algún fragmento de la inserción en la posición inicial, de no ser así sería necesario buscar la mutación por mapeo genético o secuenciación.

Si se decidiera seguir trabajando con esta línea MGT 180 L9-3 se debe realizar el análisis en la progenie muchas plantas con el fin de encontrar la línea cuya progenie ayude a lograr el objetivo que se haya planteado o elegir la línea parental MGT180 L9 (GUS^+).

Un dato relevante fue que en la progenie de una de las plantas de la generación F2 de la retrocruza de la planta MGT180 L9(GUS^+), se observó la totalidad de plantas con resistencia a kanamicina, sin embargo, solo una tercera parte de las plantas presentó actividad de GUS, la prueba estadística χ^2 realizada con los datos obtenidos de la progenie de tres plantas analizadas apoya la existencia de más de una inserción en la línea parental MGT180 L9 (GUS^+).

La línea transgénica MGT 821 (Figura 17) podría presentar una situación muy similar a la de la línea transgénica MGT 180. Esta línea claramente presentó un fenotipo mutante al observarse dos tipos de plantas, una mucho más pequeña y delgada que la planta de tipo silvestre (*Ler*) y otra planta de tamaño y apariencia similar a la planta de tipo silvestre (*Ler*). El fenotipo de distribución y morfología anormal de primordios se presentó en ambos tipos de plantas. Sin embargo, sólo se observó actividad de GUS en las plantas más pequeñas. Este fenómeno simplemente puede deberse a que se cuenta con al menos 2 inserciones o a heterocigocidad de la planta.

8.4 El análisis molecular indica la posición de una inserción Ds en el genoma de la línea MGT 180 y confirma la existencia de más de una inserción en esta línea.

El análisis molecular se inició con la estandarización de la técnica de TAIL-PCR, se puede decir que fue exitosa. Se realizaron 2 TAIL-PCR independientes de la línea MGT 180, se obtuvieron 7 amplificaciones con el patrón de bandas esperado, 3 correspondientes a la línea MGT 180 y 4 correspondientes a la línea MGT 180-L9 (Figura 35 y Figura 36). Solo se secuenciaron 4 amplificaciones al azar. Hay probabilidad de que las amplificaciones no secuenciadas correspondieran a la inserción localizada por el Dr. Ales Soukup, quién identificó una inserción en la línea MGT 180 dentro de la región 5'UTR del gen At2g01140 (Figura 42), utilizando oligonucleótidos no empleados en este trabajo, los oligonucleótidos sobre el extremo Ds 5'.

A

5' GCGTAGGTGCCTATAGAATACAGCGGCCGCGAGCTCGGGCCCCCACACGTGT
 GGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTTCGACGAATTCAGATTAGTGG
 AGAAGCATAGGTGTGAGCAGAGGAGCGTTGGCCGATCCATGGAGAAGAGAGG
 GTGTTAGGCTTAACGAAGCTAGCAGACGCCATAGGTAGTACAAGGAAG CAGGG
 ATGAAAGTAGGATGGGAAAATCCCGTACCGACCGTTATCGTATAACCGATTTT
 GTTAGTTTTATCCCGATCGATTTTGAACCCGAGGTAATAATCACGAATTCTGGAT
 CCGATACGTAACGCGTCTGCAGCATGCGTGGTACCGAGCTTTCCTATAGTGAG
 TCGTATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTT
 ATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC
 TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCC
 GCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
 GCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC
 TCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGC
 GGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGAAAGAACATGTGAGC
 AAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTC
 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAGTCAGAGGT
 GGCGAAACCCGACAGACTATAAAGATACAGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCG
 TGCGCTCTCTGTTTCGACCTGCCGCTACGGAACCTGTCCGCTTCTCCTCGGGAGG
 GTGGCGCTTCTCATAGCTTCACGCTGAGATCTCAGGTCCGGTGAGGTCGTCCGCT
 CAGCTGGGCTGGTGACGGACCTCCGTCAGCCCGACCGGTGGCCTTATCCGTACC
 TTCGCTGGATCACGTAGACCGCACTATCCCATGGCACGCATGAACGATCCACC
 GGAATAGGCGGTCCAAGAGCTCTAT 3'

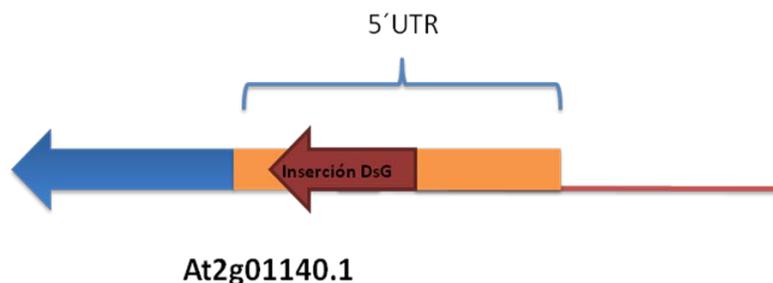
B

Figura 42.- Secuencia del producto de amplificación obtenido por TAIL-PCR de la línea MGT 180 y mapa genético del gen At2g01140.1. A. Secuencia del producto de amplificación obtenido por TAIL-PCR de la línea MGT 180, el borde de la inserción Ds 5' se muestra en rojo, la región en naranja corresponde a una región de *Arabidopsis thaliana* al gen **AT2G01140** ($e=1e-45$) **B.** Esquema general del gen At2G01140 indicando la ubicación y sentido de la inserción DsG dentro de la región 5'UTR. La flecha azul representa el marco de lectura del gen, la región naranja corresponde a la región 5'UTR del gen y la flecha roja representa la inserción DsG.

Tres de las secuencias obtenidas en este trabajo fueron idénticas entre sí. Por lo tanto, solo se recuperaron dos secuencias diferentes en la región adyacente al borde Ds 3'. Debido a que el borde Ds 3' existe solo una vez en cada inserción, este dato sugiere fuertemente la existencia de por lo menos dos inserciones en el genoma de la línea MGT 180.

Una de las secuencias correspondió a una región en el cromosoma 3 en la posición 93955-94290 del BAC T4C21 del genoma de *Arabidopsis thaliana* ($e=4e-167$). Sorpresivamente, una región río abajo de aproximadamente 100 pb correspondió a Gene trapping Ds/T-DNA vector pDsG8 ($e=1e-167$). Esta secuencia resultó ser de la construcción que se utilizó para la realización de la colección de líneas transgénicas mediante el sistema Ac/Ds. Por lo tanto, este dato sugirió la presencia de una segunda inserción muy cerca de la inserción amplificada por el TAIL-PCR. Ya ha sido reportado en esta misma colección de líneas transgénicas la existencia de dos inserciones Ds a sólo 740 pb de distancia entre ellas (Acosta-García and Vielle-Calzada, 2004). Estos datos indican la existencia de dos inserciones separadas por aproximadamente 350 pb, cuya cercanía prácticamente impide segregación. De tal manera las dos inserciones que segregan en la línea MGT 180 deben ser diferentes a éstas. Es muy probable que las dos inserciones indicadas por el análisis genético correspondan a la inserción indicada por el Dr. Ales Soukup y la inserción aquí reportada. Hay probabilidad de que las amplificaciones no secuenciadas obtenidas en el TAIL-PCR de las líneas MGT 180 y MGT 180 L9(GUS+) obtenidas en este trabajo correspondieran a la inserción localizada por el Dr. Ales Soukup.

La otra secuencia adyacente al borde Ds 3' correspondió a un vector de transformación de *A. thaliana* ($e=2e-174$). Es posible que la construcción DsG/T-DNA aún permanezca íntegra en el genoma de la línea MGT 180; es decir, el transposón no fue movilizado durante la transposición. La existencia de una construcción DsG/T-DNA íntegra podría deberse simplemente a que no hubo una buena selección durante la creación de la colección o a una fuga de esta línea transgénica.

Durante la confirmación de la posición de la inserción en el genoma de la línea MGT 180 por PCR se obtuvieron varios productos de amplificación. Esto podría explicarse por la naturaleza de la inserción, los transposones normalmente contienen secuencias repetidas invertidas en los extremos que incrementarían el número de productos. Hay reportes de adiciones de secuencias repetidas invertidas pequeñas en los extremos de la inserción Ds. (Colot *et al* 1998). Adicionalmente, una de las secuencias sugiere una segunda inserción en dirección 5' a tan solo 350 pb de la inserción amplificada por TAIL-PCR, por lo que dos inserciones con secuencias iguales aumentarían el número de amplificaciones.

El análisis molecular indicó la posición de las inserciones entre los genes At3g60870 y At3g60860. Para el gen At3g60860 la inserción está integrada en su región UTR 5' putativa cercana al gen At3g60870. La inserción en el gen At3g60870 está a 170

pb de inicio del marco de lectura. Se conoce muy poco acerca de la región regulatoria del gen At3g60870 (www.tair.org), se predicen varias regiones correspondientes a la caja TATA y otros grupos de elementos regulatorios (<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>), algunos de estos sitios están localizados río arriba del sitio de inserción, las cajas TATA putativas más alejadas del marco de lectura se encuentran a 600 pb, 830 pb y 970 pb, esta región esta localizada incluso río arriba de la inserción más alejada del marco de lectura del gen At3g60870 que se encuentra a 500 pb del primer ATG de la región codificante. Sólo por comparación, algunos genes homólogos al gen At3g60870 localizados en el cromosoma 1 y 2 (At1g14490, At1g20900, At1g76500, At2g35270) tienen el sitio de inicio de transcripción y caja TATA a 100 pb, 300 pb, 500 pb, 200 pb respectivamente en dirección 5' del primer ATG del marco de lectura del gen (<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>; www.tair.org). Por lo tanto, la inserción localizada a 170 pb del marco de lectura del gen At3g60870 se podría transcribir con mayor probabilidad.

8.5 Breve descripción bibliográfica de los genes candidatos a proporcionar la actividad de GUS en los primordios de raíces laterales en la línea MGT 180.

Tenemos tres genes candidatos que podrían estar involucrados con la expresión de GUS observada en primordios de raíces laterales de las plantas de la línea MGT 180. Uno de ellos, el gen At3g60860 codifica para una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina (ARF-GEFs) localizada intracelularmente. Se le relaciona con la regulación de la transducción de señales de las proteínas ARF (ARF: “Adenosyl ribosylation factor”) y estimulando el intercambio de nucleótidos de guanina (GTP/GDP) asociados con la GTPasa-ARF. (www.arabidopsis.org). En el genoma de *Arabidopsis* hay 15 genes ARF-GAP (ARF-GAPs: “ADP-ribosylation factor-GTPase-activating protein”) y 8 genes ARF-GEFs (ARF-GEFs: “guanine-nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factor GTPases”) potencialmente regulando 21 ARF-GTPasas (Vernoud *et al.*, 2003). Los factores ARG-GEFs incrementan los niveles de la proteína ARF activa enlazada a GTP. Las proteínas ARF-GAPs regeneran la proteína inactiva ARF enlazada a GDP mediante estimulación de la hidrólisis de GTP (Inoue and Randazzo, 2007). La brefeldina A, una toxina fúngica que interfiere con varios procesos de tráfico vesicular tiene como blanco específico a las proteínas ARF GEFs (Donaldson and Jackson 2000). Se ha observado que en plántulas de *Arabidopsis* bajo tratamiento de brefeldina A la proteína PIN1 rápidamente desaparece de la membrana plasmática (Steinmann *et al.* 1999). Este proceso es reversible porque la remoción de la brefeldina A causa la relocalización de las proteínas PIN a su posición original en las membrana plasmática (Geldner *et al.* 2001).

Uno de los genes relacionados con las proteínas ARF-GTPasas es el gen *GNOM* que codifica para una proteína ARF-GEF. El gen *GNOM* juega un papel fundamental en el tráfico vesicular endosomal de la proteína transportadora de auxinas PIN1 participando con ello en la regulación del transporte de auxinas, el gen *GNOM* se requiere para la inducción

y organización del primordio de raíz lateral. (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2001; Geldner *et al.*, 2003). Las mutantes *gnom* por pérdida de función parcial tienen muy pocas o ninguna raíz lateral (Geldner *et al.*, 2003). La flexibilidad del transporte de auxinas a nivel celular resulta del continuo reciclo de las proteínas PIN entre la membrana plasmática y los endosomas (Geldner *et al.*, 2001, 2003). Es bien conocido que la iniciación de primordios de raíces laterales está asociado a cambios en el transporte polar de auxinas en periciclo (Bénkova *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003). Se sabe que la acumulación local de auxinas en células del periciclo es una señal necesaria y suficiente para adquirir la identidad de células fundadoras de raíz lateral (Dubrovsky *et al.*, 2008).

Otro gen candidato involucrado con la expresión de GUS observada en primordios de raíces laterales de las plantas de la línea MGT 180 es el gen At3g60870. Este gen codifica para una proteína nuclear con un dominio tipo AT (“AT-hook”), la proteína AHL18. El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para 29 AHL (AHL: “AT-hook motif nuclear localized”) (www.arabidopsis.org). El “AT-hook” es un pequeño motivo de enlace a DNA que puede encontrarse en proteínas involucradas en los cambios globales de la estructura de la cromatina, controlando con ello la transcripción. Las proteínas con “AT-hook” regulan la expresión genética a través de interacciones del “AT-hook” con el surco menor del DNA en secuencias ricas en nucleótidos A-T (Harrer *et al.*, 2004; Grasser *et al.*, 2007, Launholt *et al.*, 2006). Se ha publicado que las proteínas “AT-hook”, están involucradas en varias funciones entre ellas el mantenimiento de la identidad del meristemo apical del brote (Su *et al.*, 2006), la fotomorfogénesis y el desarrollo de flor y hoja (Street *et al.*, 2008). Cuando se realizó un análisis de la expresión de genes AHL en trabajos anteriores, se observó su expresión genética concentrada en el sistema vascular de la raíz. Esto se realizó fusionando un gen reportero bajo promotores de genes que codifican para proteínas “AT-hook” (AHL27 y AHL29) (Street *et al.*, 2008). El patrón de expresión genética del gen que codifica para la proteína AHL22 fue encontrado en la zona de transición entre raíz e hipocotilo y sistema vascular (Xiao *et al.*, 2009). Algo interesante es que las proteínas AHL se afectan por la cantidad y longitud de onda de la luz, por ejemplo en plantas mutantes con sobre-expresión de la proteína AHL22 la disminución de la floración es dependiente del fotoperiodo y es más pronunciado bajo días largos que bajo días cortos (Xiao *et al.*, 2009). La expresión de los genes *AHL27* y *AHL29* se afecta y modula por la luz (Street *et al.*, 2008). Sin embargo, en los trabajos mencionados no hay estudios sobre la función de estos genes en relación al desarrollo de raíces laterales a pesar de que en las figuras en estos trabajos también se observó expresión genética de estos genes AHL en raíces laterales y en el meristemo apical de la raíz (Matsushita *et al.*, 2007; Street *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009).

El tercer gen candidato involucrado con la expresión de GUS observada en primordios de raíces laterales es el gen At2g01140 encontrado por el Dr. Ales Soukup. Dicho gen codifica para una proteína con actividad putativa fructosa-bifosfato aldolasa. La

aldolasa es una enzima que cataliza la conversión reversible de fructosa 1-6 bifosfato a gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato, un proceso por medio del cual la glucosa es oxidada, y acoplada a la síntesis de NADPH (www.arabidopsis.org). En trabajos anteriores se ha relacionado al gen At2g01140 con respuestas a procesos biológicos relacionados a la exposición al ion cadmio (Sarry *et al.*, 2006) y con el estrés oxidativo, proceso en el cual disminuye su expresión (Sweetlove *et al.*, 2002; www.arabidopsis.org). Es bien sabido que el estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente las especies reactivas de oxígeno (ROS). El desbalance en el estado normal de oxido-reducción (REDOX) celular puede causar efectos tóxicos a través de la producción de ROS. La relación de especies GSH/GSSG (glutación reducida/glutación oxidada) y AA/DHA (Ascorbato/dehidroascorbato) son los principales complejos REDOX en los sistemas biológicos (Conklin and Barth 2004; De Tullio and Arrigoni, 2003; Potters *et al.*, 2004). Jiang *et al.*, en el 2003 propusieron que las auxinas afectan el ciclo celular vía cambios en el estado REDOX. Adicionalmente se ha reportado que los cambios en las cantidades absolutas y/o promedios de especies REDOX afectan la proliferación celular. Esto fue demostrado con la mutante *rml1*, la cual tiene una síntesis menor de glutación por causa de una mutación en una proteína GAMMA-GLUTAMILCISTEINA SINTETASA. La mutante *rml1* no es capaz de mantener un meristemo post-embionario activo (Vernoux *et al.*, 2000). Este fenómeno también se observó en raíces provenientes de callos de *rml1* (Cheng *et al.*, 1995). De manera similar en tratamientos de células vegetales crecidas en presencia de un inhibidor de la proteína GAMMA-GLUTAMILCISTEINA SINTETASA hay bloqueo del ciclo celular (Potters *et al.*, 2004), confirmando con ello que la transición de la fase G₁ a la fase S requiere de niveles elevados de glutación (GSH) propuesto por Vernoux *et al.*, 2000. Interesantemente, el gen *RML1* es alélico al gen *CADMINUM SENSITIVE2* (Cobbett *et al.*, 1998).

Se ha reportado que los residuos de cisteína de algunas proteínas en células de vertebrados forman un puente disulfuro con GSH resultando en la modulación de la función de la proteína (Cotgreave and Gerdes 1998). Dos enzimas del metabolismo de los carbohidratos, una aldolasa y la triosa fosfato isomerasa son blancos para GSH (Ito *et al.*, 2003). Su papel aún se mantiene en discusión.

9 CONCLUSIONES

- De las 12 líneas transgénicas analizadas, en 10 de ellas se definió el patrón de expresión de GUS.
- Se seleccionó la línea MGT 180 como la más interesante en relación al desarrollo de raíces laterales en base a la estabilidad de la expresión de GUS presentada en primordios de raíces laterales.
- El análisis genético basado en la resistencia a kanamicina y expresión de GUS nos indicó la existencia de al menos dos inserciones en el genoma de las plantas de la línea MGT 180.
- El análisis molecular confirmó la existencia de al menos dos inserciones en el genoma de las plantas de la línea MGT 180.
- Mediante la técnica de TAIL-PCR se identificó una inserción en el cromosoma 3 en la posición 94290 del BAC T4C21 del genoma de plantas de la línea MGT 180.
- Mediante PCR se realizó la confirmación de la posición de la inserción en el genoma de la línea MGT 180 entre los genes At3g60870 y At3g60860.
- Se determinó que el gen candidato a presentar un papel relacionado con el desarrollo de raíces laterales es el gen At3g60870 porque tiene una inserción cercana al primer ATG del marco de lectura.

10 PERSPECTIVAS

De manera general el siguiente paso será conocer cuál de los genes candidatos esta verdaderamente relacionado con la actividad de GUS en primordios de raíces laterales observada en la línea MGT 180, algunos experimentos en este sentido serían:

1.- Mediante la técnica de hibridación *in situ* es posible observar la expresión específica de cada uno de los genes candidatos, esta técnica nos indicaría directamente cual gen es el que está relacionado con la actividad de GUS observada en primordios de raíces laterales. Alternativamente, el aislamiento de la inserción que provee la expresión de GUS en primordios de raíces laterales mediante retrocruza de la línea MGT180 L9-3 y posteriormente un análisis por PCR nos confirmaría si la inserción que proporciona la expresión de GUS en primordios de raíces laterales corresponde a alguna de las inserciones localizadas. La comparación del patrón de expresión de GUS con el patrón de expresión de otro gen reportero como GFP mediante la transformación de plantas de tipo silvestre con fusiones transcripcionales o traduccionales también nos indicaría si alguno de los genes candidatos tiene la inserción que nos proporciona la expresión de GUS en los primordios de raíces laterales. Alternativamente, se podría descartar alguno de los genes candidatos con un análisis mediante PCR de las líneas que contienen una sola inserción y no presentan expresión de GUS (MGT180 L8(GUS-) y MGT 180 L9-1).

2.- La realización de un Southern blot indicaría exactamente el número de inserciones en la línea transgénica MGT180 o MGT180 L9(GUS+).

3.- Dos genes candidatos tienen una inserción en su región no traducida UTR5', posiblemente sin afectar el marco de lectura de los genes, una manera de conocer si los genes At3g60860, At3g60870 y At2g01140 tienen afectada su transcripción sería mediante ensayos RT-PCR en la línea MGT 180.

4.- El análisis fenotípico de mutantes independientes en los genes candidatos de las colecciones existentes para trabajo experimental nos confirmaría de manera definitiva si el fenotipo de meristemas más cortos que en la planta de tipo silvestre está relacionado o no a alguno de los genes candidatos. Sería necesario pedir mutantes que posean la inserción en diferentes regiones del marco de lectura del gen con el fin de encontrar algún fenotipo mutante mediante un análisis minucioso. Si existe algún fenotipo, este deberá confirmarse mediante alguna otra técnica por ejemplo mediante el uso del RNA de interferencia para el gen específico.

5.- En el caso que no se encuentre algún fenotipo en la planta mutante del gen involucrado en la actividad de GUS en los primordios de raíces laterales observado, será necesario hacer mutantes dobles o triples con mutantes en genes relacionados.

Para continuar el trabajo con el gen At3g60860 algunos de los escenarios a desarrollar que nos ayudarían a tratar de deducir su función específica se mencionarán a continuación:

1.- Análisis del patrón de expresión y localización de las proteínas PIN en los primordios de raíces laterales de la mutante en el gen At3g60860. Este análisis se realizaría mediante la cruce de la línea mutante en el gen At3g60860 con las líneas *PIN::GFP* o *PIN::GUS* existentes. El resultado del análisis nos indicaría si existe una relación entre este gen y el transporte polar de auxinas. El estudio descrito anteriormente se realizaría para diferentes proteínas PIN ya que se ha reportado que al menos 6 proteínas PIN participan y se expresan durante el desarrollo de primordios de raíces laterales con patrones parcialmente traslapados (Benková *et al.*, 2003).

2.- Sería interesante determinar la sensibilidad de la mutante en At3g60860 a la inhibición del tráfico vesicular por la brefeldina A mediante la localización intracelular de las proteínas PIN y su respuesta a condiciones en presencia y ausencia de brefeldina A. La planta de estudio podría ser la línea transgénica resultante de la cruce de la mutante en el gen At3g60860 con las líneas *PIN::GFP* descritas anteriormente.

3.- Revelar un posible fenotipo mutante mediante la obtención de mutantes dobles o triples con la planta mutante en el gen *GNOM* o mutantes en los genes del grupo ARF-GEF ó ARF-GAP ayudaría a determinar la función del gen At3g60860. Si se eligiera utilizar una mutante en el gen *GNOM*, algunas candidatas interesantes son las mutantes por pérdida de función parcial descritas por Geldner *et al.*, 2003.

Para continuar el trabajo con el gen At3g60870 algunos experimentos sugeridos para tratar de encontrar información útil y deducir la función del gen serían los siguientes:

1.- Sería interesante realizar un análisis fenotípico de mutantes insercionales en el gen At3g60870. Las plantas mutantes serían germinadas en diferentes periodos de luz/oscuridad y/o con luz de diferente longitud de onda. Algunas mutantes propuestas para el estudio son las mutantes publicadas por Xiao *et al.*, 2009, la planta mutante con sobre-expresión de la proteína AHL18 (*Ahl18ox*), las plantas mutantes RNAi *Ahl18*, la planta cuádruple mutante *ahl18/ahl22/ahl27/ahl29*, etc. El estudio estaría enfocado al desarrollo de raíces laterales y meristemo apical de la raíz.

2.- Sería necesario confirmar la localización de la proteína AHL18 en el núcleo, mediante histoquímica, fluorescencia, etc.

11 BIBLIOGRAFÍA

Acosta-García G. and Vielle-Calzada JP. (2004). A Classical Arabinogalactan Protein Is Essential for the Initiation of Female Gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:2614–2628.

Aloni L. Langhans M. Aloni E. Dreieicher E. and Ullrich C. (2005). Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany*. 56:1535–1544.

Beeckman T. Bursens S. and Inzé D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 52:403–411.

Benková E. Michniewicz M. Sauer M. Teichmann T. Seifertová D. Jürgens, G. and Friml J. (2003). Local, Efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115:591-602.

Boerjan W. Cervera M.-T. Lelarie M. Beeckman T. Dewitte W. Bellini C. Caboche M. Van Onckelen H. Van Montagu M. and Inzé D. (1995). *Superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis* confers auxin overproduction. *Plant Cell*. 7:1405–1419.

Buchanan W. Gruissem W. Jones R. (2000). “Cytokinins”. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of plant Biologists. U.S.A. pp 874-884.

Campisi L. Yang Y. Yi Y. Heiling E. Herman B. Cassista A.J. (1999). Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant Journal*. 17:699-707.

Casimiro I. Marchant A. Bhalerao R. Beeckman T. Dhooge S. Swarup R. Inzé D. Sandberg G. Casero P. J. and Bennett M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*. 13:843–852.

Celenza J. Grisafi P. and Fink G. (1995). A pathway for lateral root formation *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*. 9: 2131–2142.

Conklin P. Barth C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ*. 27:959–70

Cotgreave I. Gerdes R. Schuppe-Koistinen I. and Lind C. (2002). Sglutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. *Methods Enzymology*. 348:175–182.

Davies P. "The Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!". (2004). Kluwer Academic Publishers, Ithaca, NY, U.S.A. Pp. 34-48.

De Smet I. Signora L. Beeckman T. Inzé D. Foyer C. Zhang H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 33:543–555.

De Smet I. Inzé D. and Beeckman T. (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology*. 60:871–887.

De Smet. I. Van Damme D. Van Noorden G. Naudts M. Van G. De Clercq R. Wang J. Meuli N. Vanneste Friml J. Hilson P. Jürgens G. Ingram G. Inzé D. Benfey P. Beeckman T. (2008). Divisions in the *Arabidopsis* Root Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell. *Science*. 322:594-597.

DiDonato R. Arbuckle E. Buker S. *et al.* (2004). *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear localized protein required for lateral root formation. *Plant Journal*. 327:340–353.

Dolan K. Willemsen V. Linstead P. Poethig S. Roberts K. and Scheres B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. 119:71-84.

Dubrovsky J. Doerner P. Colón-Carmona A. and Rost T. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124:1648–1657.

Dubrovsky J. Rost T. Colón-Carmona A. and Doerner P. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 214: 30–36.

Dubrovsky J, Rost T. (2003). "Lateral root Initiation". *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Ed. By Brian T., Denis Murphy, Brian Murray. Academic press. Pp. 1101-1107.

Dubrovsky J. Gambetta G. Hernandez-Barrera A. Shishkova S. Gonzalez I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot (Lond)*. 97: 903–915.

Dubrovsky J. and Shishkova S. (2007). Enigmas de la raíz: la parte oculta de la planta. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario. Pp. 201-212.

Fortin M. Pierce F. Poff K. (1989). The pattern of secondary root formation in curving roots of *Arabidopsis thaliana*. *Heynh Plant Cell Environ*. 12:337-339.

Fukaki H. Tameda S. Masuda H. and Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by again-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 29:153-168.

Gaspar Y. Johnson K. McKenna J. Bacic A. and Schultz C. (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*. 47:161–176.

Geldner N. Friml J. Stierhof Y. Jurgens G. and Palme K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413:425–428.

Geldner N. Anders N. Wolters H. Keicher J. Kornberger W. Muller P. Delbarre A. Ueda T. Nakano A. and Jurgens G. (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin mediated plant growth. *Cell*. 112: 219-230.

Grasser K. Launholt D. Grasser M. (2007a). High mobility group proteins of the plant HMGB family: dynamic chromatin modulators. *Biochim Biophys Acta*. 1769:346–357.

Grasser M. Christensen J. Peterhansel C. Grasser K. (2007b). Basic and acidic regions flanking the HMG-box domain of maize HMGB1 and HMGB5 modulate the stimulatory effect on the DNA binding of transcription factor Dof2. *Biochemistry* 46:6375–6382.

Grossniklaus U. Bellen H. Wilson C. and Gehring W. (1998). P-element-mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development*. 107:189-200.

Himanen K. Boucheron E. Vanneste S. *et al.* (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*. 14: 2339–2351.

Hobbie L. and Estelle M. (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant Journal*. 7:211–220.

Inukai Y. Sakamoto T. Ueguchi-Tanaka M. Shibata Y. Gomi K. Umemura I. Hasegawa Y. Ashikari M. Kitano H. Matsuoka M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17:1387–1396.

Ioio R. Linhares F. Scacchi E. Casamitjana-Martinez E. Heidstra R. Costantino P. y Sabatini S. (2007). "Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation". *Current Biology*. 17:678–682.

Ito Y. Eiguchi M. Kurata N. (2004). Establishment of an enhancer trap system with Ds and GUS for functional genomics in rice. 271: 639–650.

Iwakawa H. Ueno Y. Semiarti E. Onouchi H. Kojima S. Tsukaya H. Hasebe M. Soma T. Ikezaki M. Machida C. Machida Y. (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* 43:467–478.

Jefferson R. Burgess S. and Hirsch D. (1986). β -glucuronidase from *Escherichia* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:117-8151.

Laplaze L. Benková E. Casimiro I. Maes L. Vanneste S. Swarup R. Weijers D. Calvo V. Parizot B. Begon M. Herrera-Rodriguez Offringa R. Graham N. Doumas P. Friml J. Bogusz D. Beeckman T. and Bennett M. (2007). "Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation". The Plant Cell. 19:3889–3900.

Laskowski M. Williams M. Nusbaum H. and Sussex I. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. Development. 121:3303–3310.

Laskowski M Grieneisen V. Hofhuis H. Hove C. Hogeweg Scheres B. (2008). Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. Plos Biology. 6:2721-2735.

Launholt D. Merkle T. Houben A. Schulz A. Grasser K. (2006). *Arabidopsis* chromatin-associated HMGA and HMGB use different nuclear targeting signals and display highly dynamic localization within the nucleus. Plant Cell. 18:2904–2918.

Liu H. Wang S. Yu X. Yu J. He X. Zhang S. Shou H. Wu P. (2005). ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. Plant J 43:47–56.

Liu Y. Mitsukawa N. Oosumi T. and Whittier R. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant Journal. 8:457-463.

Ljung Anna K. Hull Celenza J. Yamada M. Estelle M. Normanly J. and Sandberg G. (2005). Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Roots. The Plant Cell.17:1090–1104.

Lopez-Bucio A. Cruz-Ramírez A. and Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. Current Opinion in Plant Biology. 6:280–287.

Martienssen R. (1998). Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. PNAS. 95:2021–2026.

Martienssen A. (1998). Transposons, DNA methylation and gene control. Trends Genet. 14:263-4.

Malamy J. and Benfey P. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development. 124:33–44.

Malamy J. and Ryan K. (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 127:899–909.

Okushima Y. Overvoorde P. Arima K. Alonso J. Chan A. Chang C. Ecker J. Hughes B. Lui A. Nguyen D. Onodera C. Quach H. Smith A. Yu G. Theologis A. (2005). Functional

genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17:444–463.

Parinov S. Sevugan M. De Y. Yang W. Kumaran M. and Sundaresan V. (1999). Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a databases for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 11:2263-2270.

Paul W. Hodge R. Smartt S. Draper J. and Scott R. (1992). The isolation and characterization of the tapetum specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Molecular Biology*. 19:611–622.

Perez-Perez Serralbo1 O. Vanstraelen M. Gonza C. Criqui M. Genschik P. Kondorosi E. y Scheres B. (2008). Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *The Plant Journal*. 53:78–89.

Raina S. Mahalingam R. Chen F. and Fedoroff N. (2002). A collection of sequenced and mapped Ds Transposon insertion sites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular Biology*. 50:93-110.

Rost T. Barbour M. Stocking C. Murphy M. (1998). “Plant Biology”. Universidad de California. Thomson Brooks/Cole. U.S.A. pp. 69-79.

Sambrook J. and Russel D. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. U.S.A.

Scheres. B. y Weisbeek P. 1994. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*. 120:2475-2487.

Scheres B. Di Laurenzio L. Willemsen V. Hauser M. Jarnnaat K. Weisbeek P. and Benfey, P. (1995). Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throught the embryonic axis. *Development*. 121:53-62.

Seki M. Ito T. Shibata T. and Shinozaky K. (1999). Regional Insertional Mutagenesis of Specific Genes on the CIC5F11/CIC2B9 Locus of *Arabidopsis thaliana* Chromosome 5 Using the Ac/Ds Transposon in Combination with the cDNA Scanning Method. *Plant and Cell Physiology*. 40:624-639.

Shuai B. Reynaga-Pena C. Springer P. (2002). The LATERAL ORGAN BOUNDARIES gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol*. 129:747–761.

Smith D. and Fedoroff N. (1995). LRP1, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 7:735–745.

Steinmann T. Geldner N. Grebe M. Mangold S. Jackson C. Paris S. Galweiler L. Palme K. and Jurgens G. (1999). Coordinated polar localization of the auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*. 286:316-318.

Street I. Shah P. Smith A. Avery N. Neff M. (2008). The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 54:1–14.

Sundaresan V. Springer P. Volpe T. Haward S. Jones J. Dean C. Ma H. Martienssen R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*. 9:1797-1810.

Sundaresan V. S Parinov M. Sevugan De Ye. Wei-Cai Yang. M. Kumaran. (1999). Analysis of Flanking Sequences from *Dissociation* Insertion Lines: A Database for Reverse Genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 11:2263.

Taylor and Scheuring C. (1994). A molecular marker for lateral root initiation: The *RSI-1* gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. *Molecular and General Genetics MGG*. 2:243-251.

Tatematsu K. Kumagai S. Muto H. Sato A. Watahiki M. Harper R. Liscum E. Yamamoto KT. (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 16:379-393.

Tian Q. and Reed J. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development*. 126: 711–721.

Tissier A. Marillonnet S. Klimyuk V. Patel K. Torres M. Murphy G. and Jones J. (1999). Múltiple independent defective suppressor-mutator transposon insertion in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. 11:1841–1852.

Tsugeki, R. and Fedoroff, N.V. (1999). Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 96:12941-12946. 96:12941–12946.

Tsugeki R. Kochieva E. and Fedoroff N. (1996). A transposon insertion in the *Arabidopsis* SSR16 genes causes an embryo-defective lethal mutation. *Plant Journal*. 10:479-489.

Ulmasov T. Murfett J. Hagen G. and Guilfoyle T. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. 9:1963–1971.

Valvenkens D. Montagu M. Lusebettens M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-medated transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by using kanamycin selection. 85:5536-5540.

Vanneste S. *et al.* (2005). Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 17:3035–3050.

Uehara T. Okushima Y. Mimura T. Tasaka M. Fukaki H. (2008). Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 49:1025–1038.

Weijers D. Benková E. Jager K. Schlereth A. Hamann T. Kientz M. Wilmoth J. Reed J. Jurgens G. (2005). Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J*. 24:1874–1885.

Werner T. Motyka V. Laucou V. Smets R. Van Onckelen H. T. Schmüllings. (2003). “Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity”. *The Plant Cell*. 15:2532–2550.

Willemsen H. Wolkenfelt G. de Vriezer P. Weisbeek and Scheres B. (1998). The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development*. 125:521–531.

Wilmoth J. Wang S. Tiwari S. Joshi A. Hagen G. Guilfoyle T. Alonso J. Ecker J. and Reed J. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant Journal*. 43:118–130.

Woodward W. and Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot. (Lond.)* 95:707–735.

Xiao C. Chen F. Yu X. Lin C. Fu Y. (2009). Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 71:39–50.

Xie Q. Frugis G. Colgan D. and Chua N. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Development*. 14:3024–3036.

Xie Q. Guo H. Dallman G. Fang S. Weissman A. and Chua N. (2002). SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*. 419:167–170.

Yang X. Lee S. So J. Dharmasiri S. Dharmasiri N. Ge L. Jensen C. Hangarter R. Hobbie L. and Estelle M. (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCFTIR1. *Plant J*. 40:772–782.

Zhang X. *et al.* (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189–1201.

Zhang H. and Forde B. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal Experimental Botany*. 51:51-59.

Zhao Y. Christensen S. Fankhauser C. Cashman J. Cohen J. Weigel D. and Chory J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*. 291: 306–309.

Zilberman D. Gehring M. Tran R. Ballinger T. and Henikoff S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genet*. 39:61–69.

APENDICE I

Tinción Histoquímica para detectar actividad de GUS.

Solución de Lavado I

0,05M Buffer de fosfatos a pH 7,2.
0,5mM K₃Fe(CN)₆.
0,5mM K₄Fe(CN)₆.
Agua destilada.

Para 10 mM de Solución de lavado I:

Adicionar 684µL del Stock 0,5M Na₂HPO₄ y 316µL de 0,5M NaH₂PO₄.
Adicionar 50 µL de 100 mM K₃Fe(CN)₆
Adicionar 50 µL de 100 mM K₄Fe(CN)₆
Adicionar 8,9mL de agua destilada.

Solución de Lavado II

0,05M Buffer de fosfatos a pH 7,2.
0,5mM K₃Fe(CN)₆.
0,5mM K₄Fe(CN)₆.
2 mM EDTA.
Agua destilada.

Para 10 mM de Solución de lavado II:

Adicionar 684µL del Stock 0,5M Na₂HPO₄ y 316µL de 0,5M NaH₂PO₄.
Adicionar 50 µL de 100 mM K₃Fe(CN)₆
Adicionar 50 µL de 100 mM K₄Fe(CN)₆
Adicionar 40 µL de 0,5M EDTA
Adicionar 8,860 mL de agua destilada.

Solución de Tinción

0,05M Buffer de fosfatos a pH 7,2.

0,5mM K₃Fe(CN)₆.

0,5mM K₄Fe(CN)₆.

2 mM X-gluc.

Agua destilada.

Para 3 mL de Solución de Tinción:

Adicionar 205,2µL del Stock 0,5M Na₂HPO₄ y 94,8µL de 0,5M NaH₂PO₄.

Adicionar 15 µL de 100 mM K₃Fe(CN)₆

Adicionar 15 µL de 100 mM K₄Fe(CN)₆

Adicionar 60 µL de 100mM X-Gluc.

Adicionar 2,610 mL de agua destilada.

SOLUCION STOCK/ PARA ACTIVIDAD DE GUS

Na ₂ HPO ₄	0,5 M	Para 70mL pesar 4,97g de Na ₂ HPO ₄ y aforar al volumen.
NaH ₂ PO ₄	0,5 M	Para 70 mL pesar 4.2g de NaH ₂ PO ₄ y aforar al volumen.
K ₃ Fe(CN) ₆	100mM	Para 1 mL pesar 0,033g de K ₃ Fe(CN) ₆ y aforar al volumen.
K ₄ Fe(CN) ₆	100mM	Para 1 mL pesar 0,042g de K ₄ Fe(CN) ₆ y aforar al volumen.
EDTA	0,5M	Para 70mL pesar 13,027g y aforar al volumen.
X-gluc	100mM	Para 200µL pesar 0,010g de X-gluc y añadir 192µL de Dimetil Formamida.

APENDICE II

Soluciones para extracción de DNA genómico (Dellaporta DNA)

Regulador de extracción Dellaporta (EB)

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

50 mM EDTA (pH 8.0)

500 mM NaCl

10 mM β -Mercaptoetanol

BTE

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

TE

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

10 mg/mL RNAsa A