



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la función antagónica de los factores
epigenéticos CLF y ATX1 en *Arabidopsis thaliana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

María del Rosario Vega León



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez
2016

Ciudad Universitaria, CD. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad
Facultad
Carrera
Número de cuenta

1. Datos del alumno

Vega
León
María del Rosario
5531442529
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308328862

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

2. Datos del tutor

Dra.
Ma. De La Paz
Sánchez
Jiménez

3. Datos del sinodal
rado

G
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Yamel
Ugartechea
Chirino

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Rosalinda
Tapia
López

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Dra.
María Elena
Álvarez-Buylla
Roces

7. Datos del trabajo escrito.

Título
Subtítulo
Número de páginas
Año

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la función antagonista
de los factores epigenéticos CLF y
ATX1 en Arabidopsis thaliana
73 pp
2016

Agradecimientos

Agradecimientos académicos

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Álvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo, Berenice García Ponce de León y Ma. De La Paz Sánchez Jiménez, y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo Ríos; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios, y materiales diversos importantes.

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

CONACYT: 240180, 180380, 167705, 152649

UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN203113, IN 203214, IN203814, IN211516

Esta tesis también se realizó gracias al apoyo de beca para tesis de licenciatura del proyecto CONACYT CB-2010 152649

Agradecimientos personales

Al profesor Alfonso Vilchis, por sus aportaciones y su excelente labor docente que siempre reflejó lo maravilloso de la biología.

A la Dra. Rosalinda Tapia, por sus acertadas contribuciones a este trabajo.

A la Dra. Yamel Ugartechea, por su invaluable asesoría técnica y sus minuciosos comentarios que ayudaron a trascender el análisis y la discusión de esta tesis.

A la Dra. Elena Álvarez-Buylla, por su ejemplar desempeño en la investigación en México y su importante labor social.

A la Dra. María De La Paz Sánchez, por toda su paciencia y por enseñarme siempre a hacer de la ciencia el reflejo más honesto de nosotros.

A Estephania, por toda su ayuda en el desarrollo y análisis de la PCR cuantitativa.

A mi familia, porque siempre me impulsaron incondicionalmente ayudándome a romper todo tipo de fronteras.

A mis compañeros del laboratorio, por su amistad y todo su apoyo moral y técnico; con ustedes la ciencia es un acto que supera lo académico.

A mis amigos de la universidad, por hacer de esta etapa la más enriquecedora de mi vida, porque esas risas perduren hasta el final.

A Ttetsuya, Rodrigo y Pamela, por estar conmigo en todo momento, por su inquebrantable amistad y sus consejos.

A Leonardo, por ser la extensión más transparente de mi alma, por lo infinito de esta historia, por seguir pisándono los pies...

“El punto de vista dialéctico insiste en que la persistencia y el equilibrio no son el estado natural de las cosas, sino que requieren de una explicación, que debe ser buscada en las acciones de las fuerzas opuestas”¹

¹Levins, R y Lewontin, R. C. *The dialectical biologist*, 1985.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 El paradigma epigenético	2
2.1.1 Primeras aproximaciones al paradigma epigenético	2
2.1.2 La epigenética de Waddington, un concepto dinámico	3
2.1.3 Importancia práctica e implicaciones teóricas de la epigenética	4
2.2 Mecanismos de regulación epigenética	5
2.2.1 Metilación del ADN	6
2.2.2 Regulación por ARN's no codificantes	6
2.2.3 Modificaciones postraduccionales de histonas	7
2.3 Los grupos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) en <i>Arabidopsis thaliana</i>.	10
2.3.1 El grupo Polycomb (PcG)	10
2.3.2 El grupo Trithorax (TrxG)	14
2.4 La Función de los factores ATX1 y CLF en el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.4.1 Activación transcripcional regulada por ATX1	17
2.4.2 La función de CLF durante los procesos de represión transcripcional	18
2.4.3 Evidencias de antagonismo entre ATX1 y CLF	18
2.5 Antecedentes inmediatos	19
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
5. Materiales y métodos	23
5.1 Material biológico	23
5.2 Condiciones de crecimiento	23
5.3 Obtención de plantas dobles mutantes <i>atx1/clf</i>	24
5.3.1 Fertilización cruzada	24
5.3.2 Genotipificación	24
5.4 Clonación del gen completo <i>CLF</i> (pCLF:CLF:GFP)	25
5.4.1 Mutagénesis dirigida	25
5.5 Caracterización fenotípica de raíces.	25
5.5.1 Cinética de crecimiento	25
5.5.2 Análisis por microscopía de luz	26
5.6 Análisis de expresión.	26
5.6.1 Extracción de ARN	26

5.6.2	RT-PCR.	27
5.6.3	PCR semicuantitativa	28
5.6.4	PCR cuantitativa	28
6.	Resultados	29
6.1	Clonación del gen <i>CLF</i> completo con su propio promotor	29
6.2	Generación de plantas dobles mutantes <i>atx1/clf</i>	31
6.3	Las plantas dobles mutantes <i>atx1/clf</i> revierten parcialmente el fenotipo de raíz .	33
6.4	El tamaño del meristemo de las plantas dobles mutantes en <i>atx1/clf</i> es igual al fenotipo silvestre	36
6.5	ATX1 y CLF regulan antagónicamente la expresión de genes MADS-box implicados en el desarrollo de la raíz.	38
7.	Discusión	43
7.1	Caracterización fenotípica.	43
7.2	Análisis de expresión genética.	45
8.	Conclusiones	48
9.	Referencias	49
10.	Anexos	55

Índice de figuras

Figura 1	Mecanismos de regulación epigenética.	7
Figura 2	Complejos proteicos de PcG que actúan en el desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	13
Figura 3	Mecanismo de acción de TrxG.	14
Figura 4	Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	20
Figura 5	Caracterización de la clona pCLF:CLF 2B.	30
Figura 6	Esquema de los genes <i>ATX1</i> y <i>CLF</i>	32
Figura 7	Genotipificación de las familias dobles mutantes <i>atx1/clf-7</i> y <i>atx1/clf-11</i> por PCR.	33
Figura 8	Fenotipo aéreo presente en plantas de los fondos silvestres (Col-0), mutantes sencillos (<i>atx1-3</i> y <i>clf-29</i>) y dobles mutantes (<i>atx1/clf-7</i> y <i>atx1/clf-11</i>).	34
Figura 9	Longitud de la raíz en de plantas silvestres (Col-0), mutantes simples (<i>atx1-3</i> y <i>clf-29</i>) y dobles mutantes (<i>atx1/clf-7</i> y <i>atx1/clf-11</i>).	35
Figura 10	Meristemo de plantas silvestres (Col-0), mutantes simples (<i>atx1-3</i> y <i>clf-29</i>), y dobles mutantes (<i>atx1/clf-7</i> y <i>atx1/clf-11</i>).	37
Figura 11	Expresión de los factores de transcripción MADS-box	39
Figura 12	Expresión relativa obtenida a partir de PCR cuantitativa en plantas de 5 dps	42
Figura A1	Digestión enzimática con XbaI	58
Figura A2	PCR semicuantitativa de tres réplicas biológicas.	59
Figura A3	Curvas de amplificación entre dos concentraciones de templado (1 ng y 10 ng).	60
Figura A4	Curvas de <i>melting</i> obtenidas para cada gen analizado por PCR cuantitativa	62
Figura A5	Expresión relativa de cada réplica medida en los ensayos de PCR cuantitativa.. . . .	64
Figura A6	Secuenciación de la clona pCLF:CLF 2B.	72

Índice de Tablas

Tabla A1	. Función de los miembros de los grupos PcG y TrxG	55
Tabla A2	Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la genotipificación de la doble mutante <i>atx1-clf</i> por PCR de punto final.	55
Tabla A3	Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para el análisis de expresión por PCR semicuantitativa.	56
Tabla A4	Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para el análisis de expresión por PCR cuantitativa.	57
Tabla A5	Eficiencias obtenidas con el software Real-time PCR Miner para cada par de oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR cuantitativa.	58

1. Resumen

Los grupos de proteínas Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) son dos complejos epigenéticos muy conservados con la capacidad de catalizar marcas postraduccionales en las histonas. A través de estas marcas, PcG y TrxG modifican la estructura de la cromatina y regulan la expresión de numerosos genes; mientras PcG reprime su expresión, TrxG la activa. En *Arabidopsis*, CLF es una de las principales proteínas que constituyen a PcG, tiene actividad de metiltransferasa mediante la cual cataliza la deposición de la marca H3K27me3 para inducir la represión transcripcional. Por otra parte, ATX1 fue la primera metiltransferasa caracterizada del grupo TrxG y es capaz de catalizar la deposición de la marca H3K4me3, una marca asociada a activación transcripcional. Esta función antagónica entre ATX1 y CLF ha sido ampliamente caracterizada de manera individual, sobre todo en la regulación transcripcional que controla el proceso de floración. El efecto pleiotrópico de estos dos factores ha sido evidenciado por el fenotipo de sus mutantes. Las mutantes de *ATX1* presentan floración temprana, defectos en el tamaño, número y posición de los órganos florales, raíz corta y hojas pequeñas y ligeramente aserradas, mientras que las mutantes de *CLF* son pequeñas, también de floración temprana, son más sensibles a estímulos ambientales, presentan raíces ligeramente más largas, aberraciones en los órganos florales y hojas curvadas. En contraste con la parte aérea, el papel de ATX1 y CLF ha sido menos estudiado en la raíz.

En el presente trabajo se evaluó el papel de estos factores de manera conjunta sobre el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* a través del estudio de mutantes simples y dobles para ambos factores epigenéticos. Los análisis fenotípicos realizados en este estudio corroboraron el fenotipo de raíz corta y meristemo reducido de las mutantes *atx1* y demostraron que las mutantes *clf* no presentan alteraciones significativas en la longitud total de la raíz ni en el tamaño del meristemo comparados con el control. De manera interesante, las dobles mutantes *atx1/clf* mostraron una recuperación parcial de la longitud total de la raíz y una recuperación total en el tamaño del meristemo, mientras que su fenotipo aéreo fue muy similar a las mutantes *clf*. Por otra parte, análisis de expresión genética demostraron que ATX1 regula de manera positiva a los genes homéoticos de la familia MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*, mientras que CLF lo hace de manera negativa. Sorprendentemente se observó que en las dobles mutantes la expresión de estos genes, con excepción de *XAL1/AGL12*, es muy similar a la observada en las mutantes *clf*. En conjunto, estos datos evidencian la importancia de estos factores epigenéticos sobre el desarrollo de *Arabidopsis* e indican que ATX1 y CLF regulan antagónicamente a los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*, sin embargo parece ser que el papel de CLF tiene un efecto epistático sobre ATX1, lo cual también se ve reflejado en el fenotipo aéreo.

2. Introducción

2.1 El paradigma epigenético

Actualmente el estudio de la epigenética representa un importante desafío para las ciencias biológicas. A pesar de que los orígenes del concepto se remontan a principios del siglo XIX, la epigenética como campo de estudio formal es relativamente reciente e incluso en nuestros días su definición es objeto de debate entre la comunidad científica.

2.1.1 Primeras aproximaciones al paradigma epigenético

Una de las piedras angulares que constituyen la base histórica del *paradigma* epigenético se encuentra en el trabajo del zoólogo francés Jean-Baptiste Lamarck, cuando a partir de 1802 dio a conocer formalmente su teoría sobre la evolución orgánica, misma que se puede resumir en dos leyes fundamentales: 1) Los animales que no han alcanzado el final de su desarrollo, poco a poco ganan o pierden características durante su vida mediante el constante uso y desuso de sus partes 2) Las características adquiridas durante la vida de los organismos, debido a las circunstancias a las que fueron expuestos, se conservan a través de las nuevas generaciones siempre y cuando los cambios adquiridos estén presentes en ambos progenitores (Burkhardt, 2013).

Un importante fragmento de la teoría Darwiniana también hace referencia a las ideas de Lamarck. En su libro *Variación en plantas y animales bajo domesticación*, Darwin introduce la hipótesis de la pangénesis, donde plantea que las señales ambientales pueden inducir células somáticas para arrojar “gémulas” microscópicas o “pangenes” que circulan y se acumulan en las células germinales. Las gémulas transfieren información de las células somáticas a las células germinales afectando así a las siguientes generaciones (Darwin, 1868).

Ambos planteamientos comparten dos aspectos fundamentales, por un lado está la influencia de estímulos ambientales sobre el cambio en la forma de los organismos y por el otro la conservación de estos cambios a través de las generaciones. En su conjunto, estas ideas fueron claves para estructurar el concepto contemporáneo de epigenética.

A lo largo del siglo XIX surgieron numerosos opositores de las ideas lamarckianas, sin embargo, fue el nacimiento de la genética clásica con el descubrimiento de las leyes de Mendel y el posterior desarrollo de la síntesis moderna de la evolución lo que revolucionó el estudio de la herencia, misma que adoptó una tendencia genocéntrica que rechazaba cualquier posibilidad de evolución a través de los rasgos adquiridos (Ho, 2014).

A pesar del éxito obtenido por la genética clásica, durante el siglo XX se dieron a conocer distintos casos de estudio que no presentaban herencia de tipo mendeliana, a lo que Ernst Mayr denominó “herencia suave” (Mayr, 1980). Los casos que no eran explicados por las leyes de Mendel llevaron a cuestionar los mecanismos genéticos como únicos factores hereditarios, en consecuencia, el estudio de procesos alternativos más allá de los genes resultaba necesario.

2.1.2 La epigenética de Waddington, un concepto dinámico

El término “epigenética” fue introducido por Conrad Hal Waddington en 1942 para referirse al estudio de los mecanismos causales por el cual el genotipo provoca efectos fenotípicos (Haig, 2004). El origen de la palabra deriva del concepto aristotélico de epigénesis enlazado al estudio de la herencia, donde el prefijo “epi” (sobre o encima) y su complemento “genética” reflejan la necesidad de estudiar los acontecimientos “sobre” o más allá del gen (Jablonka y Lamb, 2002). Para ilustrar su pensamiento, Waddington desarrolló el término “paisaje epigenético”, en el que refleja cómo se produce la especialización celular durante el desarrollo. En este paisaje, el desarrollo avanza como una canica que rueda por una ladera salpicada de valles y colinas, la cual es controlada por los genes y sus interacciones. En el camino, la superficie irregular de la pendiente guía a la canica a lo largo de un camino único, hasta su destino, siendo éste el fenotipo final (Ho, 2014). La epigenética de Waddington evoca una estrecha relación con la biología del desarrollo, no obstante, algunas precisiones sobre su carácter hereditario serían integradas posteriormente.

Entre las definiciones de epigenética que surgieron en años posteriores destacan la de Hall, para quien la epigenética o control epigenético “es la suma de los factores genéticos y no genéticos que actúan sobre las células para controlar selectivamente la expresión de los genes, produciendo aumento de la complejidad fenotípica durante el desarrollo” (Hall, 1992). Posteriormente Holliday define la epigenética como “el estudio de los cambios en la expresión génica, que se producen en los organismos con células diferenciadas, y la herencia mitótica de patrones dados de la expresión génica”

(Holliday, 1994). Por otro lado, para Russo y colaboradores la epigenética es “el estudio de los cambios mitóticamente y/o meióticamente heredables en la función de los genes que no pueden explicarse por cambios en la secuencia del ADN” (Russo et al., 1996).

Ante este escenario lleno de diversas acepciones es importante destacar que no todos los cambios epigenéticos son heredables trans-generacionalmente, debido a esto Jablonka y Raz hacen una pertinente acotación sobre la distinción entre epigenética y herencia epigenética; para ellos la epigenética es “el estudio de los procesos que subyacen a la plasticidad del desarrollo y canalización y que provocan persistentes efectos en el desarrollo en procariontes y eucariontes”, mientras que la herencia epigenética “es un componente de la epigenética que ocurre cuando las variaciones fenotípicas que se transmiten a las siguientes generaciones de células u organismos no se derivan de las variaciones en la secuencia de bases del ADN” (Jablonka y Raz, 2009).

Aún no existe una definición universalmente aceptada, sin embargo, existe una continuidad entre la epigenética de Waddington y la epigenética de hoy, dado que ambas se centran en vías de desarrollo alternativas, en las redes de desarrollo que subyacen a la estabilidad y la flexibilidad, y en la influencia de las condiciones ambientales en las que se desarrollan las células y los organismos (Jablonka y Lamb, 2002).

2.1.3 Importancia práctica e implicaciones teóricas de la epigenética

Los recientes descubrimientos de los mecanismos moleculares de regulación epigenética permiten conocer los alcances teóricos y prácticos de esta disciplina. En la actualidad sabemos que los mecanismos epigenéticos regulan una amplia variedad de procesos como el desarrollo, la diferenciación celular, la reparación del ADN y la senescencia (Kouzarides, 2007). Adicionalmente, la epigenética ha contribuido al estudio de enfermedades hereditarias, cáncer, epidemias y mecanismos celulares de defensa, pero también tiene una importancia potencial en los campos de la agricultura y la ecología (Jablonka y Lamb, 2002; Jablonka y Raz, 2009).

En un contexto teórico, el carácter hereditario de algunas variaciones y mecanismos epigenéticos demanda replantear el concepto de herencia biológica y sus implicaciones evolutivas. Si se acepta que las variaciones epigenéticas heredables pueden ser parte de un cambio evolutivo, entonces la evolución no puede ser vista únicamente en términos de cambio de frecuencias génicas, ya que las frecuencias de las

variantes epigenéticas tienen que ser consideradas también (Jablonka y Lamb, 2002). La importancia evolutiva de la epigenética ha sido abordada en la Síntesis Extendida (ES) la cual surge ante la evidente necesidad de expandir la Síntesis Moderna, el enfoque evolutivo predominante actualmente. La ES ha surgido recientemente como un marco conceptual que pretende entender los procesos evolutivos desde una perspectiva más inclusiva, considerando la biología evolutiva del desarrollo, una teoría ampliada de la herencia, elementos de la teoría de la complejidad, la labilidad evolutiva¹ y una reevaluación de los niveles de selección, entre otros campos de estudio (Pigliucci, 2009).

En su libro *La estructura de las revoluciones científicas* Thomas Kuhn define a un paradigma como “realizaciones científicas universalmente reconocidas que, durante cierto tiempo, proporcionan modelos de problemas y soluciones a una comunidad científica” (Kuhn, 1971). Para Kuhn, el desarrollo de la ciencia madura se da a través de revoluciones científicas que generan la transición de un paradigma a otro. En este sentido, es evidente que la epigenética y sus implicaciones sobre el concepto de desarrollo y herencia constituyen un nuevo paradigma que complementa actualmente el estudio de numerosos procesos biológicos.

2.2 Mecanismos de regulación epigenética

La dinámica epigenética en las plantas resulta particularmente interesante. Dado que su condición sésil les impide escapar de condiciones desfavorables, éstas han desarrollado complejos mecanismos de adaptación. Además, su proceso de organogénesis, a diferencia de los animales, se da mayoritariamente en un periodo post embrionario, de tal manera que la relación con el medio ambiente resulta particularmente estrecha. Ambas características suponen mecanismos de regulación epigenética involucrados en procesos del desarrollo, diferenciación celular y respuesta al medio ambiente.

En la actualidad se han caracterizado principalmente tres mecanismos epigenéticos que subyacen a los procesos de desarrollo y respuesta a estímulos ambientales en plantas: la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de histonas y los ARN's no codificantes (Fig. 1) (Jones y Sung, 2014). Tales mecanismos se encuentran involucrados en la regulación de la expresión genética y tienen una importante influencia sobre la dinámica de la cromatina. Numerosos procesos de desarrollo y respuesta a estímulos ambientales pueden estar regulados dinámicamente por más de un mecanismo epigenético.

¹Traducción no oficial de “evolvability”

2.2.1 Metilación del ADN

En plantas, la metilación del ADN puede ocurrir en citosinas ubicadas en tres contextos genéticos diferentes: CG, CNG (N representa cualquier nucleótido) y CHH (H puede ser A, T o C), siendo la metilación de CG la más abundante (Zhang et al., 2006). Aunque la metilación de las citosinas es la más común, también se ha demostrado que las adeninas pueden estar metiladas. Poco se sabe sobre esta inusual marca, sin embargo algunos estudios sugieren que puede asociarse al control de la replicación y la expresión genética (Vanyushin y Ashapkin, 2011). Una hiper metilación de las citosinas en regiones promotoras usualmente inhibe la transcripción, al igual que en los elementos transponibles (Zhang et al., 2010). La metilación de las citosinas consiste en la adición de un grupo metilo en la posición C-5 y en cada contexto está catalizada por distintas enzimas con actividad metiltransferasa (Jones y Sung, 2014), adicionalmente tiene una importante influencia sobre la remodelación de la cromatina pues es capaz de atraer proteínas de unión a sitios metilados las cuales a su vez, reclutan desacetilasas de histonas y proteínas remodeladoras de cromatina para formar un complejo que evita la unión de factores de transcripción (Fig. 1a) (Fransz y de Jong, 2002).

2.2.2 Regulación por ARN's no codificantes

En muchos organismos, la transcripción intergénica o antisentido da lugar a diferentes clases de ARN's no codificantes (ncRNAs), los ARN's cortos (<200 nt) y los ARN's largos (>200 nt). Los ARN's pequeños (sRNA) son capaces de modificar la cromatina y la expresión genética por la vía de ARN de interferencia mediante la cual regulan la metilación de histonas y del ADN (Holoach y Moazed, 2015). El mecanismo mejor conocido de regulación epigenética mediado por sRNA's es la metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM por sus siglas en inglés) (Fig. 1b). Por otra parte, los ARN's largos (lncRNA) pueden actuar como reguladores cis o trans y contienen señales para el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina, son capaces de atraer factores de splicing y pueden funcionar como competidores para los sitios de unión de mini ARN's (Heo et al., 2013).

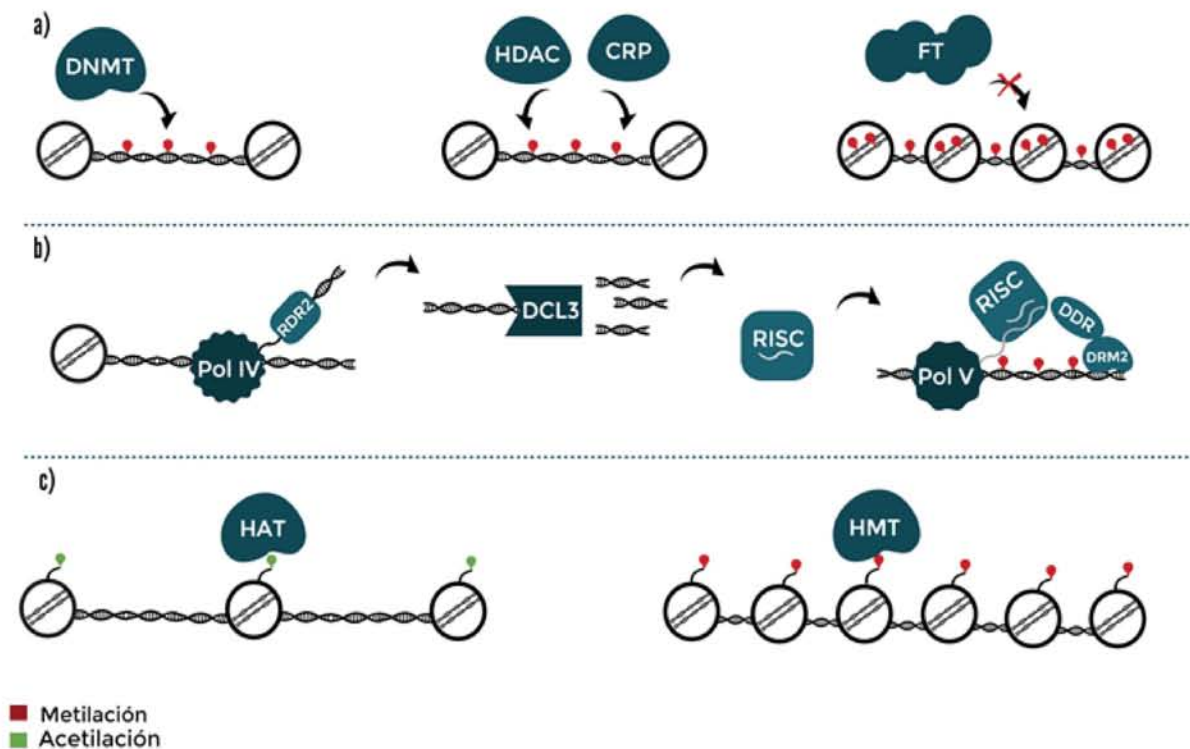


Figura 1. Mecanismos de regulación epigenética. a) La metilación del ADN es catalizada por ADN metiltransferasas (DNMT's), posteriormente se reclutan desacetilasas de histonas (HDACs) y proteínas remodeladoras de cromatina (CRP) para formar un complejo que evita la unión de factores de transcripción (FT's) y así impedir la transcripción. b) Los ARNs no codificantes (ncRNAs) son transcritos por la polimerasa IV, posteriormente una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR2) genera ARN's de doble cadena los cuales son cortados por DICER-LIKE 3 (DCL3), los fragmentos obtenidos son cargados por ARGONAUTA (AGO) para formar el complejo RISC (RNA-Induced Silencing Complex). El complejo RISC censa los lncRNA's transcritos por la Polimerasa V (Pol V) hasta encontrar su complementario y mediante el complejo DDR (DRD1, DMS3 y RDM1) forma un puente con la metiltransferasa DOMAINS MEARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2) quien finalmente cataliza la metilación *de novo* en el ADN. c) La acetilación de las histonas es catalizada por Histona Acetiltransferasas (HATs) que alteran las propiedades físicas de los nucleosomas debilitando su asociación con el ADN. Las Histona Metiltransferasas (HMTs) catalizan la marca de metilación la cual atrae otras proteínas que tienen diversos efectos sobre procesos específicos.

2.2.3 Modificaciones postraduccionales de histonas

La dinámica estructural de la cromatina es crucial para regular los patrones de expresión genética al permitir o impedir el acceso de factores de transcripción o de la propia ARN polimerasa al ADN. Los nucleosomas son las unidades fundamentales de la cromatina y se componen de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual se enrollan 147 pb de ADN (Luger et al., 1997). La cromatina es una estructura dinámica que puede clasificarse en dos tipos fundamentales: heterocromatina y eucromatina. La heterocromatina es altamente condensada, con baja densidad

génica y poco activa transcripcionalmente, en contraste, la eucromatina es poco condensada, rica en genes y está asociada a regiones transcripcionalmente activas (Huisinga et al., 2006).

Entre los múltiples mecanismos epigenéticos que modifican la arquitectura de la cromatina para regular la expresión genética, las modificaciones postraduccionales de histonas juegan un papel fundamental. La mayoría ocurren en el extremo amino-terminal de las histonas y dentro de éstas se incluyen las acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones y ADP ribosilaciones (Lauria y Rossi, 2011), su efecto sobre la expresión genética depende de su tipo, posición, cantidad y combinación con otras modificaciones (Pfluger y Wagner, 2007), de tal manera que algunas marcas pueden llegar a tener funciones antagónicas dependiendo del contexto en el que se encuentren. Estas características en conjunto construyen un intricado esquema estructural de la cromatina, denominado código de histonas.

La acetilación de las histonas altera las propiedades físicas de los nucleosomas debilitando la asociación entre las histonas y el ADN, mientras que otras modificaciones, incluyendo la metilación, a menudo crean sitios de unión para otras proteínas que tienen efectos sobre procesos específicos (Fig. 1c) (Deal y Henikoff, 2011). En plantas, las acetilaciones ocurren exclusivamente en residuos de lisina y suelen correlacionar con regiones activas transcripcionalmente, por otra parte, las metilaciones pueden ocurrir en residuos de lisinas y de argininas y pueden estar asociadas a represión o activación transcripcional (Lauria y Rossi, 2011).

Las principales marcas de activación y represión transcripcional en plantas se encuentran en la histona H3. Dentro de las marcas de activación se incluyen la acetilación de la lisina 9 y 27 (H3K9ac y H3K27ac), la di y tri metilación de la lisina 36 (H3K36me2 y H3K36me3) y la di y tri metilación de la lisina 4 (H3K4me2 y H3K4me3) (Du et al., 2013; Lauria y Rossi, 2011). H3K9ac y H3K27ac co-localizan en el extremo 5' de los genes mientras que H3K36me2 y H3K36me3 se acumulan en la región transcrita, H3K4me3 también está enriquecida hacia el extremo 5' y es mutuamente excluyente con citosinas metiladas del ADN (Lauria y Rossi, 2011). Por otra parte, existen fundamentalmente 2 marcas asociadas a regiones transcripcionalmente inactivas, la dimetilación de la lisina 9 (H3K9me2), que está asociada exclusivamente a regiones repetitivas en la heterocromatina, y la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me3), presente en 18% de los genes de *Arabidopsis thaliana*, principalmente en factores de transcripción y genes del desarrollo. Esta marca se encuentra presente en regiones transcritas del gen pero presenta un enriquecimiento mayor hacia el extremo 5' (Pfluger y Wagner, 2007).

Novedosos estudios han sugerido una clasificación funcional de la cromatina de *Arabidopsis* en 9 estados discretos, tomando en cuenta características como la secuencia de ADN, variantes de histonas, metilación de CGs y modificaciones postraduccionales de histonas. Dentro de esta clasificación los estados 5, 4 y 2 son particularmente ricos en la marca H3K27me₃, mientras que los estados 1, 2 y 4 contienen altas cantidades de H3K4me₃ (Sequeira-Mendes et al., 2014), estos resultados indican una amplia participación de ambas marcas a lo largo del genoma, asimismo su co-localización en los estados 2 y 4 puede sugerir una regulación conjunta y potencialmente dinámica.

Las modificaciones postraduccionales de histonas involucran un mecanismo que requiere fundamentalmente de tres tipos de proteínas: proteínas encargadas de colocar la marca, proteínas efectoras capaces de leerla y proteínas que la borren (Kouzarides, 2007).

En el caso de las acetilaciones, las proteínas Histona Acetiltransferasas (HATs) catalizan la adición del grupo acetil desde el donador Acetil-CoA y pueden clasificarse dentro de 4 familias: GNAT, MYST, CBP/p300 y TAFI/TAFII250 (Berr et al., 2011). El bromodominio es un módulo de proteína capaz de unirse a histonas con lisinas acetiladas; está presente en diversos remodeladores de cromatina y HATs que funcionan como efectores mediante la remodelación directa o el reclutamiento de más HATs que, a su vez, son capaces de amplificar la marca (Yun et al., 2011). La acetilación es removida por proteínas Histona Desacetilasas (HDACs) que en *Arabidopsis* se han clasificado en 3 familias: RPD3/HDA1, HD2-like y SIR2 (Berr et al., 2011).

Las proteínas Histona Metiltransferasas (HMTs) catalizan las marcas de metilación y en *Arabidopsis*, todas tienen un dominio SET (Berr et al., 2011). Algunas de las metiltransferasas más importantes forman parte de dos grupos de proteínas con funciones antagónicas, el grupo Polycomb (PcG) que cataliza la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me₃) y el grupo Trithorax (TrxG) que es capaz de catalizar la di y tri metilación de la lisina 36 (H3K36me₂ y H3K36me₃) y la trimetilación de la lisina 4 (H3K4me₃). Dentro de los efectores capaces de leer las marcas de metilación se encuentran proteínas con dominios Tudor, CW, PHD, WD40 y Cromodominios (Yun et al., 2011). Aunque comparada con otras modificaciones postraduccionales la metilación es relativamente estable, existen proteínas Histona Desmetilasas (HDMs) que son capaces de borrar la marca, entre ellas predominan las que contienen el dominio Jumonji (JMJ) (Berr et al., 2011).

Aunque los mecanismos de propagación de las modificaciones postraduccionales de histonas durante la replicación del ADN siguen siendo poco claros, existen ejemplos bien caracterizados que demuestran su carácter hereditario en procesos de desarrollo y respuesta a señales endógenas y exógenas, los cuales se discutirán más adelante.

2.3 Los grupos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) en *Arabidopsis thaliana*

Los grupos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) son complejos de proteínas capaces de regular la arquitectura de la cromatina para mantener estados de represión y activación transcripcional, respectivamente. Fueron inicialmente descritos en *Drosophila* como reguladores antagónicos de los genes *HOX*, un grupo de factores de transcripción que especifican la identidad celular a través del eje anteroposterior de animales segmentados (Schuettengruber et al., 2007). Específicamente, PcG se ha definido como un grupo de genes cuya mutación resulta en fenotipos similares a los mutantes de *Polycomb* (*Pc*) (mutaciones que conducen a la transformación global de segmentos embrionarios en los segmentos más posteriores), o que puede potenciar los fenotipos de alelos mutantes de *Pc*, mientras que los genes de TrxG se han definido por su capacidad de contrarrestar la actividad de PcG en la regulación de los genes homeóticos (Grimaud et al., 2006).

En plantas se han descrito genes homólogos a PcG y TrxG (Tabla A1), algunos de ellos con la capacidad de regular genes homeóticos de la familia MADS-box (acrónimo de los primeros miembros descritos, MCM1, AG, DEF y SRF) que, a diferencia de los genes *Hox*, no se encuentran agrupados adyacentemente (Alvarez-Venegas, 2010; Pien y Grossniklaus, 2007). En comparación con los animales, se sabe menos sobre el funcionamiento de PcG y TrxG, no obstante, se han descrito detalladamente mecanismos involucrados en importantes procesos de desarrollo incluyendo el mantenimiento de células troncales, reprogramación celular, floración, dormancia y respuesta al estrés (Sanchez et al., 2015).

2.3.1 El grupo Polycomb (PcG)

Las proteínas que componen a PcG se encuentran evolutivamente conservadas entre los eucariontes y destacan por su papel en el establecimiento y mantenimiento de la identidad celular. Tanto en plantas como en metazoarios, PcG actúa principalmente a través de dos complejos: POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2), que cataliza la trimetilación de la lisina 27 en

la histona H3 (H3K27me₃), y POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 1 (PRC1), que cataliza la monoubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119 en metazoarios y 121 en plantas (H2AK119ub y H2AK121ub) (Pu y Sung, 2015; Xiao y Wagner, 2015).

Se han reconocido fundamentalmente cuatro proteínas en el complejo PRC2 de *Drosophila*, Enhancer of zeste (E(z)), que cataliza la H3K27me₃ a través de su dominio SET; Extra sex combs (Esc), que contiene un dominio WD40 y estimula la acción catalítica de E(z) mediante la unión a la H3K27me₃; Suppressor of zeste 12 (Su(z)12), con dominios de dedos de Zinc y caja VEFS, puede potenciar la metilación de la H3K27; y Nucleosome remodeling factor 55 (NURF55), que contiene un dominio WD40 y es capaz de unirse a histonas y a (Su(z)12) (Kim y Sung, 2014; Pu y Sung, 2015). A diferencia de *Drosophila* donde no hay duplicación génica en los componentes de PRC2, en *Arabidopsis* algunos de sus homólogos están duplicados, permitiendo formar diferentes complejos PRC2, los cuales pueden ser tejido dependientes. Así, *MEDEA* (*MEA*), *CURLY LEAF* (*CLF*) y *SWINGER* (*SWN*) son homólogos de E(z); *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2* (*FIS2*), *VERNALIZATION2* (*VRN2*) y *EMBRYONIC FLOWER2* (*EMF2*) son homólogos de Su(z)12; *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1-5* (*MSI1-5*) son los cinco homólogos de NURF55; y finalmente el único homólogo de Esc es *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM* (*FIE*) (Bemer y Grossniklaus, 2012). Con base en los homólogos de (Su(z)12), los componentes de PRC2 en *Arabidopsis* pueden formar tres subcomplejos con funciones específicas, éstos son FIS-PRC2, EMF-PRC2 y VRN-PRC2. Mientras que FIS-PRC2 controla el desarrollo del endospermo, EMF-PRC2 y VRN2-PRC2 son esenciales para el desarrollo vegetativo y reproductivo (Fig. 2a) (Kim y Sung, 2014).

El primer complejo identificado en *Arabidopsis* fue FIS-PRC2 y está constituido por cuatro proteínas: MEA o SWN, FIS2, FIE y MSI1 (Fig. 2a). Mientras que FIE y MSI1 se expresan constitutivamente y pueden formar parte de otros complejos, MEA y FIS2 se expresan exclusivamente en el gametofito femenino y en la semilla en desarrollo (Bemer y Grossniklaus, 2012; Xiao y Wagner, 2015). FIS-PRC2 evita la formación del endospermo en ausencia de fertilización (Ohad et al., 1999). Adicionalmente, después de la fertilización, la pérdida de función de FIS-PRC2 causa insuficiencia en la celularización del endospermo y en la translocación de nutrientes hacia el embrión, lo que provoca su arresto, esto puede deberse a la desrepresión de *AGAMUS LIKE 62* (*AGL62*), un factor de transcripción de la familia de genes MADS-box (Hehenberger et al., 2012). Estudios recientes revelan que los complejos EMF-PRC2 y VRN2-PRC2 también contribuyen a la formación de la semilla, principalmente en el desarrollo de la cubierta (Roszak y Kohler, 2011).

EMF2-PRC2 está constituido por CLF o SWN, EMF2, FIE y MSI1 (Fig. 2a). Es necesario para la transición de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva mediante la represión de reguladores florales como *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *AGAMOUS (AG)* y *APETALA3 (AP3)* (Bemer y Grossniklaus, 2012). También está involucrado en la transición del estado embrionario al estado vegetativo, lo que requiere del silenciamiento de genes involucrados en la maduración de la semilla (Bouyer et al., 2011), cabe destacar que se han identificado componentes de PRC1 que también actúan en la represión del programa embrionario y que además inician el silenciamiento que posteriormente es mantenido por EMF2-PRC2 (Yang et al., 2013).

El complejo VRN2-PRC2 contiene a SWN o CLF, VRN2, FIE y MSI1 (Fig. 2a). Promueve la transición a la floración después de la vernalización mediante la represión de *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Bemer y Grossniklaus, 2012). Se ha demostrado que VRN2 se asocia a *FLC* en ausencia de frío, por lo que, para asegurar la represión estable de *FLC*, VRN2-PRC2 requiere asociarse con VRN5 y VIN3, dos proteínas con dominio PHD que son inducibles ante bajas temperaturas durante periodos específicos (De Lucia et al., 2008).

La existencia de un complejo PRC1 en plantas ha sido debatido debido a la ausencia de un homólogo funcional de *Polycomb (Pc)*, una subunidad central de PRC1 en metazoarios (Xiao y Wagner, 2015). No obstante, estudios recientes han demostrado la existencia de familias de genes con funciones propias de este complejo (Fig. 2b).

En *Drosophila*, los componentes de PRC1, Posterior sex combs (Psc), drosophila RING (dRING), Polyhomeotic (Ph) y Polycomb (Pc), pueden unirse a la H3K27me3 generada por PRC2 y catalizar la H2AK119ub para estabilizar el estado represivo (Bemer y Grossniklaus, 2012), aunque también puede actuar de manera independiente (Calonje, 2014). En *Arabidopsis* se han identificado dos familias de proteínas con dominio RING-finger (AtRING1a/b y AtBMIa/b/c) que pueden monoubiquitinar la H2A en la lisina 121. Adicionalmente, también se ha reconocido una proteína con función homóloga a Pc, LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1), la cual puede reconocer la H3K27me3 a través de su Cromodominio en el extremo N-terminal. Finalmente, *EMF1* se ha reconocido como un homólogo estructural y funcional de *Psc* (Xiao y Wagner, 2015), ya que se ha demostrado que puede interactuar con AtRING1a/b y AtBMI1a/b *in vitro*, es requerido para colocar la H2Aub1 y se encuentra enriquecido en *loci* marcados con H3K27me3 (Kim y Sung, 2014). En su conjunto, estos datos sugieren que la existencia de un complejo PRC1 se encuentra conservada en plantas y animales.

Estudios recientes sugieren que, de manera similar a *Drosophila*, el complejo PRC1 en *Arabidopsis* puede actuar antes o independientemente de PRC2 (Calonje, 2014). Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de al menos dos variantes de complejos PRC1 según su capacidad de influir sobre la marca H2Aub, éstos son PRC1-BMI1 y PRC1-EMF1, con la capacidad de ubiquitinar histonas y compactar la cromatina respectivamente. Ambos complejos pueden actuar en conjunto o independientemente en diferentes genes diana (Pu y Sung, 2015).

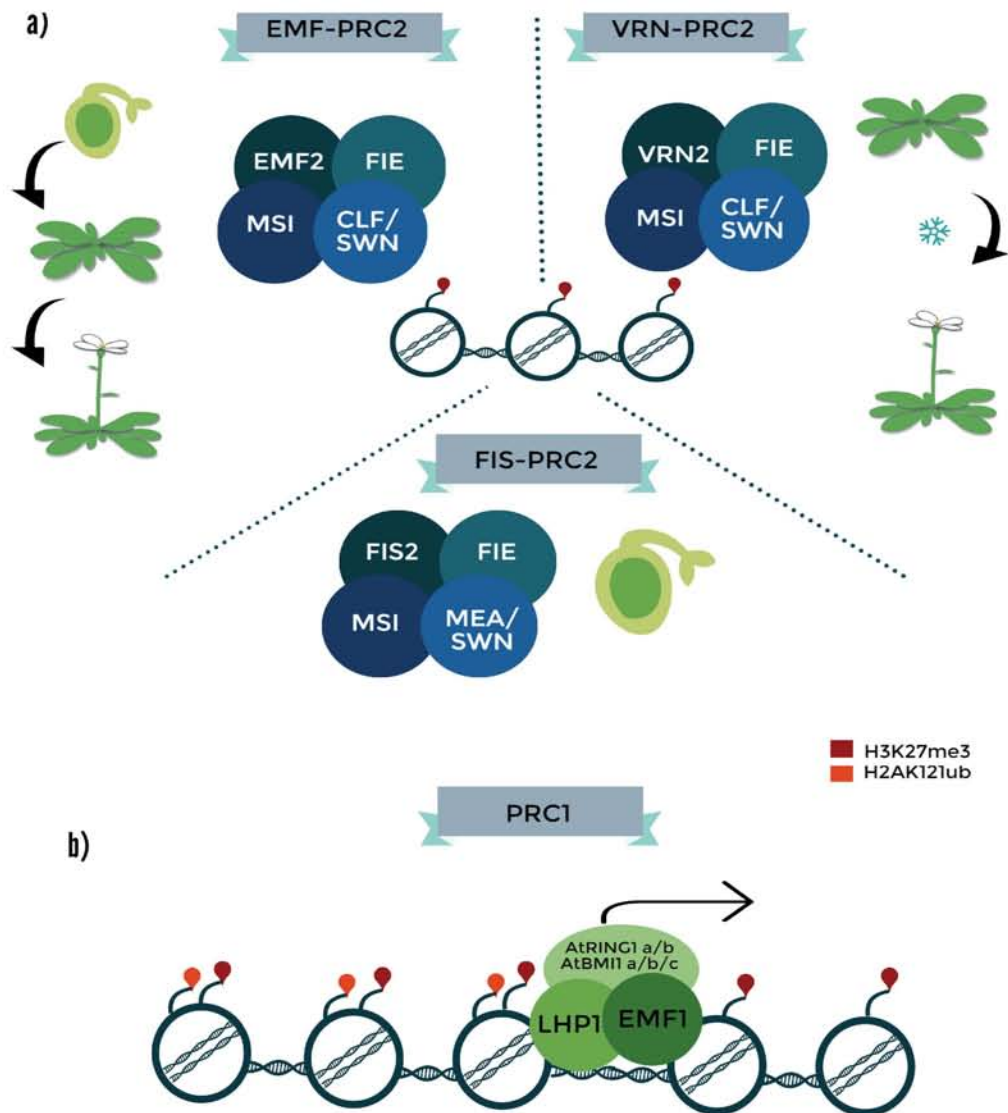


Figura 2. Complejos proteicos de PcG que actúan en el desarrollo de *Arabidopsis*. a) Los tres subcomplejos de PRC2 tienen funciones específicas. FIS-PRC2 evita la formación del endospermo en ausencia de fertilización. EMF2-PRC2 es necesario para la transición de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva y para la transición del estado embrionario al estado vegetativo. VRN2-PRC2 promueve la transición a la floración después de la vernalización. b) Proteínas del complejo PRC1. Mientras que LHP1 es capaz de reconocer la H3K27me3, AtRING1a/b y AtBMI1a/b/c pueden monoubiquitinar la H2A en la lisina 121 mediante su asociación con EMF1.

2.3.2 El grupo Trithorax (TrxG)

El estudio de los componentes de TrxG es reducido en comparación con PcG. No obstante, se ha demostrado su participación en la regulación de procesos críticos como el ciclo celular, la senescencia, el daño al ADN y el mantenimiento de células troncales (Schuettengruber et al., 2011). De manera general, los factores de TrxG pueden clasificarse en tres categorías; la primera incluye a proteínas con dominio SET, la segunda comprende factores remodeladores de cromatina dependientes de ATP y la tercera categoría contiene proteínas asociadas a metiltransferasas que junto con éstas pueden formar complejos denominados COMPASS-like (Schuettengruber et al., 2011) (Fig. 3). Elementos de cada categoría se han identificado en *Arabidopsis*.

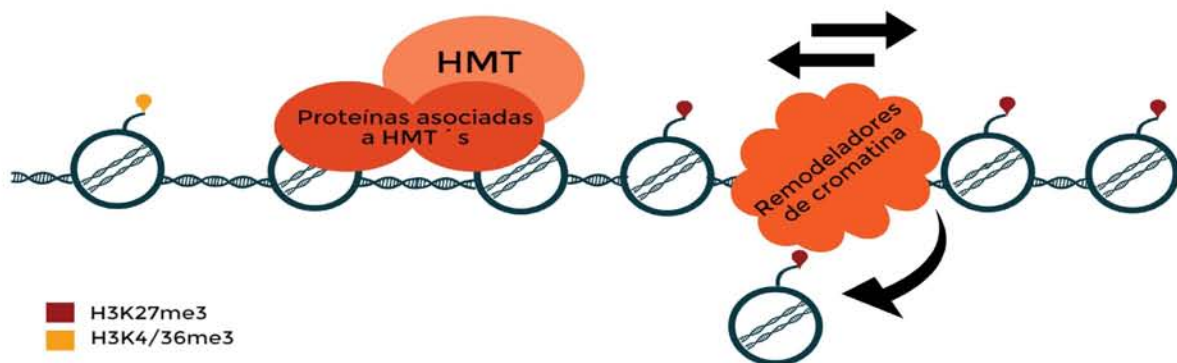


Figura 3. Mecanismo de acción de TrxG. En *Arabidopsis*, TrxG actúa mediante tres tipos de proteínas. Las Histonas Metiltransferasas (HMTs) que colocan la marca de metilación suelen asociarse a otras proteínas como ARABIDOPSIS ASH2 RELATIVE (ASH2R), RbBP5-like (RBL) y WD repeat-containing a (WDR5a) para formar diferentes complejos denominados COMPASS-like. Las proteínas remodeladoras de cromatina son capaces de desplazar histonas o remover aquellas marcadas con la H3K27me3.

Análisis filogenéticos realizados con el dominio SET indican que las proteínas de la familia TRITHORAX (proteínas con actividad metiltransferasa) pueden dividirse en dos subfamilias: SET1 y TRX. En *Arabidopsis* se han detectado cinco genes homólogos a *TRX* que pueden clasificarse en dos grupos hermanos: *Arabidopsis Trithorax 1* (*ATX1*) y *ATX2*, formando el primer grupo, y *ATX3*, *ATX4* y *ATX5* formando el segundo, ambos grupos se diferencian por la presencia y ausencia respectivamente de un dominio DAST (Domain associated with SET in Trithorax) (Baumbusch et al., 2001). *ATX1* regula positivamente genes involucrados en distintas etapas del desarrollo a través de la H3K4me3, por otro lado *ATX2* muestra un papel más restringido que *ATX1* y es capaz de depositar la marca

H3K4me₂, aunque su capacidad para trimetilar no ha sido descartada (Saleh et al., 2008). Ninguna actividad enzimática se ha demostrado en ATX3, ATX4 y ATX5, sin embargo ATX3 presenta un patrón de expresión específico en la célula central de *Arabidopsis* (Johnston et al., 2007) lo que podría indicar algún papel en la reproducción o en el desarrollo del gametofito femenino.

Es probable que la duplicación de los genes de *ATX* en *Arabidopsis* ilustre interesantes tendencias evolutivas como la adquisición de nuevas funciones, la complementación de la función del gen ancestral o simplemente el silenciamiento del propio gen (Avramova, 2009).

Siete miembros de la familia ARABIDOPSIS TRITHORAX RELATED (*ATXR 1-7*) también han sido identificados en *Arabidopsis* (Baumbusch et al., 2001), aunque sólo dos presentan funciones propias de TrxG. *ATXR3* es requerido para depositar globalmente la H3K4me₃ y su pérdida de función resulta en fenotipos pleiotrópicos similares a mutantes de PcG (Berr et al., 2010). *ATXR7* también es capaz de metilar la lisina 4 de la histona H3. Mutantes de *atxr7* florecen prematuramente y muestran una disminución de la H3K36me₂ en *FLC*, lo que indica un papel en su regulación (Alvarez-Venegas, 2010). Contrario a lo esperado, *ATXR5* y *ATXR6* son metiltransferasas que pueden catalizar la H3K27me₁ y, aunque no son homólogos de *E(z)*, se han visto involucradas en la condensación de la cromatina y la represión genética (Jacob et al., 2009).

En *Arabidopsis* se han identificado 4 homólogos al gen *Absent, Small or Homeotic Discs1 (Ash1)*, un miembro de TrxG con dominio SET en *Drosophila*, éstos son *ABSENT, SMALL OR HOMEOTIC DISCS1 HOMOLOG/SET DOMAIN GROUP 26 (ASHH1/SDG26), ASHH2/SDG8, ASHH3/SDG7* y *ASHH4/SDG24*. Adicionalmente también se han identificado 3 genes relacionados con *ASHH*: *ABSENT, SMALL OR HOMEOTIC DISCS1 RELATED/ SET DOMAIN GROUP 37 (ASHR1/SDG37), ASHR2/SDG39* y *ASHR3/SDG4* (Baumbusch et al., 2001). Sólo algunos de estos genes han sido parcialmente caracterizados.

ASHH2/SDG8, también conocido como EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (EFS), regula diversos procesos de desarrollo, entre ellos el tiempo de floración y la formación de órganos florales. A pesar de que no se ha demostrado una actividad de metilación específica en residuos de la histona H3, *ASHH2/SDG8* tiene un efecto sobre la abundancia de las marcas H3K36me₂/me₃, H3K9me₃ y H3K4me₃ (Tang et al., 2012). En contraste con los mutantes de *ashh2/sdg8*, los cuales

muestran una reducción en la expresión de *FLC* y floración temprana, los mutantes de *ashh1/sdg26* presentan floración tardía y una sobre expresión de *FLC* (Xu et al., 2008). Paradójicamente, también se ha demostrado que ASHH1/SDG26 es requerido para depositar la H3K4me3 y la H3K36me3 en el *locus* de *AGL20*, un importante regulador de la floración, induciendo así su expresión (Berr et al., 2015). Pese a estas contrastantes funciones, no se ha encontrado evidencia de que ASHH1/SDG26 tenga directamente funciones duales en la regulación de la expresión génica.

Se han descrito dos proteínas más de TrxG exclusivas de plantas, las proteínas ULTRAPETALA 1 y 2 (ULT1 y ULT2) las cuales contienen un dominio SAND (Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1) de unión al ADN y un motivo “B-box-like” que puede participar en interacciones proteína-proteína o proteína-ARN (Carles y Fletcher, 2009). Ambas proteínas muestran funciones redundantes, sus funciones comprenden la regulación del tamaño e identidad del meristemo apical y floral, así como el desarrollo de órganos reproductivos (Monfared et al., 2013). ULT1 se ha descrito como un anti-represor que se une a los genes homeóticos *AGAMOUS (AG)* y *APETALA3 (AP3)*, limita el depósito de la marca H3K27me3 catalizada por CLF y promueve marcas de activación en la lisina 4 de la histona H3 posiblemente funcionando como coactivador de ATX1 (Carles y Fletcher, 2009). Las dobles mutantes *ult1-clf* presentan un fenotipo silvestre, en contraste con las mutantes simples de *clf* que muestran floración temprana y hojas curvadas (Carles y Fletcher, 2009). Estos resultados representan una importante evidencia del antagonismo entre las funciones de TrxG y PcG.

En *Arabidopsis*, las H3K4 metiltransferasas se asocian con tres proteínas más, ARABIDOPSIS ASH2 RELATIVE (ASH2R), RbBP5-like (RBL), y WD repeat-containing a (WDR5a) para formar el complejo COMPASS (COMPLEX PROTEINS ASSOCIATED WITH SET1)-like. Se ha sugerido la existencia de diferentes complejos COMPASS-like conformados por distintas H3K4 metiltransferasas que pueden controlar múltiples procesos del desarrollo, incluyendo el desarrollo de la semilla, la transición a la floración y el crecimiento de las hojas (Jiang et al., 2011). Adicionalmente, el complejo COMPASS-like es indispensable para la trimetilación de histonas y para facilitar el ensamble del complejo de preiniciación de la transcripción (Fromm y Avramova, 2014).

La familia de remodeladores de cromatina SWI/SNF juega un papel crucial en el desarrollo de las plantas mediando la activación o represión transcripcional. Se han descubierto dos ATPasas de esta familia en *Arabidopsis*, SPLAYED (SYD) y BRAHMA (BRM) (Reyes, 2014). Algunos estudios sugieren que estos remodeladores podrían remover histonas marcadas con la H3K27me3 para permitir

la unión de ATX1 y ULT1 (Wu et al., 2012). Similar a *ULT1*, las mutantes de *SYD* y *BRM* rescatan el fenotipo de las mutantes *clf* (Wu et al., 2012). PKL es otro remodelador de cromatina de la subfamilia CHD (Chromodomain Helicase DNA binding) que ha demostrado tener funciones propias de TrxG, entre ellos destacan la activación de genes del grupo Polycomb y el rescate del fenotipo mutante de *clf* en las dobles mutantes *pkl-clf* (Köhler y Aichinger, 2010).

Aunque son numerosos los ejemplos que demuestran el antagonismo entre PcG y TrxG, también existen evidencias sobre actividad represiva por parte de algunos factores de TrxG (Pu y Sung, 2015). No obstante, en algunos casos, aún son necesarios estudios más profundos para corroborar los resultados.

2.4 La Función de los factores ATX1 y CLF en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

2.4.1 Activación transcripcional regulada por ATX1

ATX1 fue la primera proteína de TrxG identificada en *Arabidopsis* (Bemer y Grossniklaus, 2012). Como ya se ha mencionado con anterioridad, ATX1 tiene actividad metiltransferasa y cataliza la H3K4me₃, una marca asociada con la activación transcripcional. Mutantes de *ATX1* presentan floración temprana, defectos en el tamaño, número y posición de los órganos florales, raíz corta, hojas pequeñas y ligeramente aserradas, así como desregulación en genes homeóticos como *FLC*, *APETALA 1 (AP1)*, *AP2*, *AP3*, *AG*, y *PISTILLATA (PI)* (Alvarez-Venegas et al., 2003; Napsucialy-Mendivil et al., 2014; Pien et al., 2008; Saleh et al., 2007). Análisis masivos de expresión demuestran que los mutantes de *ATX1* presentan alteraciones en la expresión de aproximadamente 1,640 genes en *Arabidopsis*, esto indica que su función va más allá de los genes MADS-box (Alvarez-Venegas et al., 2006), sin embargo la influencia directa o indirecta de ATX1 sobre genes no homeóticos es poco conocida.

La función de ATX1 en el proceso de transcripción aún no es clara, sin embargo novedosos estudios indican que ATX1 desempeña dos tareas distintas en la activación transcripcional. En primera instancia, ATX1 recluta a TBP (TATA binding protein) y a Pol II (RNA Polymerase II) en el promotor de los genes diana, subsecuentemente ATX1 es reclutado por una forma fosforilada de Pol II en la región transcrita, donde coloca la marca H3K4me₃ (Ding et al., 2011). Adicionalmente se ha demostrado que la H3K4me₃ no es requerida para el inicio de la transcripción, sino que funciona como una marca de activación para la elongación (Ding et al., 2012).

2.4.2 La función de CLF durante los procesos de represión transcripcional

El primer factor identificado de PcG en plantas fue CURLY LEAF (CLF) (Goodrich et al., 1997). Dentro PcG existen tres metiltransferasas capaces de catalizar la H3K27me₃, una marca asociada a la represión transcripcional. Aunque existe cierta redundancia entre ellas (Makarevich et al., 2006), el factor CLF ha sido implicado en la regulación de procesos específicos. Los mutantes de *CLF* son pequeñas y de floración temprana, son más sensibles a estímulos ambientales, presentan raíces ligeramente más largas, aberraciones en los órganos florales y hojas curvadas (atributo al que debe su nombre) (Aichinger et al., 2011; Goodrich et al., 1997).

La función de CLF en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz (RAM por sus siglas en inglés) y del meristemo apical (SAM por sus siglas en inglés) ha sido evidenciado por los mutantes de pérdida de función, estos mutantes presentan un incremento en la actividad del RAM, lo cual puede ser explicado por la regulación de *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*), *AGL21* y *AGL42*, indicando que CLF es requerido para mantener la identidad celular del RAM (Aichinger et al., 2011). Por otro lado, CLF también es fundamental para la determinación del meristemo floral mediante la represión de *WUSCHEL* (*WUS*). En el SAM, *WUS* mantiene el estado totipotente de las células del centro organizador y del meristemo de inflorescencia, cuando el meristemo de inflorescencia se determina para dar inicio a la formación del órgano floral, CLF es reclutado por AG en el *locus* de *WUS* para reprimir su expresión (Liu et al., 2011).

2.4.3 Evidencias de antagonismo entre ATX1 y CLF

A pesar de que existe cierta redundancia funcional entre los componentes de PcG y TrxG, se han caracterizado algunos ejemplos que sugieren una actividad antagónica entre los factores ATX1 y CLF particularmente.

Quizá el ejemplo más contundente de antagonismo entre CLF y ATX1 es la regulación de *AGAMOUS* (*AG*), un gen homeótico de la floración. CLF suprime la expresión de *AG* (Goodrich et al., 1997) mientras que ATX1 la induce (Alvarez-Venegas et al., 2003), por otra parte, los mutantes simples de *atx1* y *clf* pierden las marcas de H3K4me₃ y H3K27me₃, respectivamente en el *locus* de *AG*. Al generar plantas dobles mutantes de *atx1/clf* el fenotipo de floración temprana y hojas curvadas presente en las mutantes simples de *clf* es rescatado, adicionalmente las marcas de H3K4me₃ y

H3K27me₃ son parcialmente restauradas (Saleh et al., 2007). Estos resultados indican que en ausencia de la represión por CLF, la activación por ATX es innecesaria, consistente con el hecho de que ATX1 actúa como un antagonista de CLF (Alvarez-Venegas et al., 2003).

Otro ejemplo de este antagonismo es la regulación del gen *FLC*, el cual codifica para un factor de transcripción con dominio MADS-box que funciona como un represor de la transición a la fase reproductiva. *FLC* y *ATX1* son coexpresados de una manera espacio temporal; ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP por sus siglas en inglés) han demostrado que ATX1 se une directamente al *locus* de *FLC* donde cataliza la H3K4me₃ y subsecuentemente activa su transcripción (Pien y Grossniklaus, 2007; Saleh et al., 2008). Adicionalmente, ATX1 no sólo activa la transcripción de *FLC* sino que también previene su represión, dado que mutantes de pérdida de función *atx1* inducen una ganancia de la marca H3K27me₃ en el *locus* de *FLC* (Pien y Grossniklaus, 2007). Por otra parte, la represión de *FLC* después de un periodo de vernalización es mediada por el complejo VRN-PRC2 que contiene a CLF. VRN-PRC2 es reclutado en el *locus* de *FLC* por un ARN no codificante llamado COLDAIR para depositar y expandir la marca de H3K27me₃, reprimiendo así la expresión de *FLC* y permitiendo la floración (Song et al., 2012). Estos resultados sugieren que ATX1 y CLF regulan estados de transcripción antagónicos de *FLC*.

2.5 Antecedentes inmediatos

Como ya se ha ilustrado con anterioridad, el papel de PcG y TrxG ha sido relativamente bien estudiado en procesos como la floración o la embriogénesis, sin embargo poco se sabe sobre su influencia en el desarrollo de la raíz. La raíz de *Arabidopsis* resulta ser un excelente modelo de estudio debido a que se pueden encontrar distintos tipos celulares dentro de una estructura ordenada como son células en estado quiescente, células en proliferación y células diferenciadas. La raíz de *Arabidopsis* se compone de tres capas concéntricas; epidermis, córtex y endodermis, arregladas alrededor del tejido vascular o estele central (Fig. 4b). En el extremo apical, la raíz está protegida por la columela y la capa lateral. Cada tipo celular se origina de un grupo de células iniciales que mantienen su estado indiferenciado gracias al centro quiescente (CQ) (Fig. 4b). Las células más jóvenes se encuentran en una región denominada zona meristemática (ZM), la ZM a su vez se divide en dos dominios: el dominio de proliferación (DP), donde las células se dividen rápidamente y crecen lentamente; y el dominio de transición (DT), donde las células comienzan a elongarse y la probabilidad de que se dividan es muy baja. Posterior a la ZM se encuentra la zona de elongación (ZE) donde las células aumentan de tamaño y dejan de dividirse

para comenzar su proceso de diferenciación y culminarlo en la zona de diferenciación (ZD) (Fig. 4a) (Cederholm et al., 2012; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

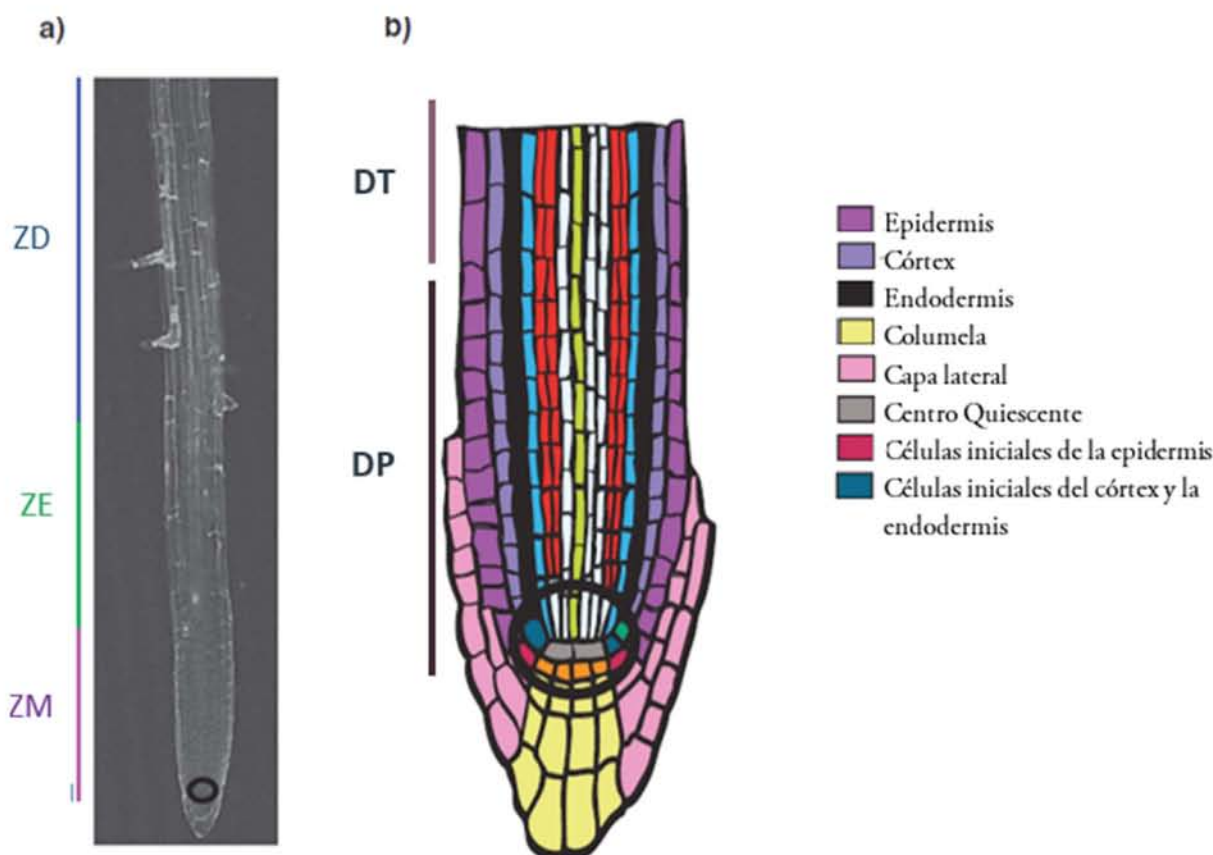


Figura 4. Estructura de la raíz de *Arabidopsis*. Modificado de (Cederholm et al., 2012). a) Raíz de 5 días de crecimiento mostrando la Zona meristemática (ZM), la Zona de elongación (ZE) y la Zona de diferenciación (ZD). b) Esquema longitudinal de la zona meristemática donde se pueden apreciar el dominio de proliferación (DP) y el dominio de transición (DT). Las células de la epidermis, el córtex y la endodermis se encuentran en un arreglo concéntrico. Se muestra además el extremo apical protegido por la columela y la capa lateral. Indicado con un círculo negro se aprecia el CQ rodeado de las células iniciales.

En años recientes se han descubierto genes homeóticos de la familia MADS-box involucrados en el desarrollo de la raíz (Smaczniak et al., 2012), entre ellos destacan *XAANTAL1/AGL12*, que regula el crecimiento de la raíz controlando el ciclo celular probablemente regulando auxinas (Tapia-Lopez et al., 2008); *XAANTAL2/AGL14*, que modula el transporte de auxinas durante el desarrollo de la raíz mediante la regulación de transportadores de auxinas tipo PIN (Garay-Arroyo et al., 2013); y *AGL17* el cual controla la elongación de raíces laterales en respuesta al nitrato y tiene una función en la respuesta a nutrientes en la raíz (Gan et al., 2005). Finalmente, algunos genes como *AGL19* se han visto expresados específicamente en la raíz, sugiriendo un papel específico en su desarrollo (Alvarez-Buylla et al., 2000).

Existen importantes evidencias sobre la regulación epigenética de los genes MADS-box en raíz, por un lado se ha encontrado que CLF y LHP1 se requieren para reprimir la expresión de *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* (Sánchez & Flores, datos no publicados), mientras que ATX1 es necesario para la activación transcripcional de *XAL2/AGL14*, *AGL19* y probablemente de *XAL1/AGL12* y *AGL17* (Petrone, 2015). Ambos trabajos indican un importante papel de PcG y TrxG sobre la regulación genética de los programas de desarrollo en la raíz de *Arabidopsis*.

Por lo anterior, en el presente estudio se pretende aportar elementos que contribuyan a la caracterización de la regulación antagónica por parte de los factores ATX1 y CLF sobre los genes homeóticos *XAANTAL1/AGL12*, *XAANTAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* en la raíz de *Arabidopsis*. Estos resultados permitirán avanzar en el estudio de los mecanismos epigenéticos que subyacen a los procesos de desarrollo, diferenciación celular y respuesta a cambios ambientales en las plantas, particularmente en la raíz, cuyo conocimiento es menos extenso.

3. Hipótesis

El desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* requiere de la función de los factores epigenéticos ATX1 y CLF, cuya función antagónica es reflejada en las características fenotípicas y los patrones de expresión genéticos de las dobles mutantes *atx1/clf*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Como objetivo general este trabajo se propone evaluar la función antagónica de los complejos TrxG y PcG en *Arabidopsis thaliana* a través del estudio de los factores epigenéticos ATX1 y CLF.

4.2 Objetivos particulares

De manera particular se plantearon los siguientes objetivos:

- Clonar el gen de *CLF* con su propio promotor y fusionado con la proteína reportera GFP para profundizar en el estudio de las plantas mutantes.
- Generar plantas dobles mutantes de pérdida de función para los factores epigenéticos ATX1 y CLF.
- Caracterizar el fenotipo que tienen las plantas dobles mutantes (*atx1/clf*) y contrastarlo con el de las plantas mutantes simples y silvestres.
- Determinar la función antagónica de ATX1 y CLF durante el desarrollo de la raíz mediante el análisis de expresión génica en las dobles mutantes *atx1-clf*.

5. Materiales y métodos

5.1 Material biológico

Todas las plantas utilizadas en este estudio provienen de la especie *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0). Las dos líneas mutantes con las que se trabajó fueron alelos generados por inserción de T-DNA, éstos son *atx1-3* (SALK_105214) y *clf-29* (SALK_021003).

5.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaClO, Cloralex) al 20% y polisorbato-20 (Tween 20, Sigma-Aldrich) al 0.01% manteniéndolas en agitación durante 10 min, enseguida se lavaron 5 veces con agua estéril y se estratificaron en condiciones de oscuridad a 4°C durante 72 horas, esto con la finalidad de sincronizar la germinación y el metabolismo.

Las semillas estratificadas fueron sembradas en cajas Petri con medio MS, cuya composición consta de MS al 0.2x (Murashige y Skoog 1962, MP Biomédicals), MES monohidratado al 0.05% (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1% (Sigma-Aldrich) y agar al 1% (Becton, Dickinson y Company) ajustado a un pH de 5.6 con KOH 1M. Cuando se requería, después de 9 o 10 días de crecimiento en medio MS, las plántulas se transfirieron a tierra esterilizada (Sunshine Professional Growing Mix MVP). Durante el proceso de germinación y crecimiento las plantas se mantuvieron a una temperatura constante de 22°C, en condiciones de día largo (16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad) y con luz blanca y fría con una intensidad aproximada de 110 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

5.3 Obtención de plantas dobles mutantes *atx1/clf*

5.3.1 Fertilización cruzada

Las plantas dobles mutantes se obtuvieron mediante fertilización cruzada a partir de mutantes simples para cada gen. Para ello se tomó como madre a la mutante de *atx1-3* y como padre a la mutante de *clf-29*. Dado que *A. thaliana* es una especie hermafrodita, los estambres de cada flor de la planta madre fueron emasculados en una etapa temprana con la finalidad de evitar su autopolinización, posteriormente se tomaron flores maduras de la planta padre y se frotaron con los pistilos de la flores

emasculadas, para así inducir su fertilización. Las semillas obtenidas se crecieron bajo las condiciones mencionadas.

5.3.2 Genotipificación

Para asegurar la homocigosis de las plantas obtenidas, se realizaron extracciones individuales de ADN a partir de hojas recién cortadas. Para ello, el tejido fue triturado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente a cada muestra se le agregaron 500 μ l de buffer de extracción (100 mM de Tris-HCl pH=8, 50 mM de EDTA, 500 μ M de NaCl, 1% de SDS y 0.07% de β -mercaptoetanol) y se incubaron durante 10 min a 65°C. Enseguida se agregaron 130 μ l de KAc 5 M y se incubaron a 4°C por 5 min. A continuación se adicionaron 150 μ l de cloroformo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo donde el ADN se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol y 1/10 de volumen de AcNa 3M. Las muestras se mantuvieron a -20°C durante al menos una hora, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. El pellet obtenido fue lavado tres veces con EtOH al 70% y se resuspendió con H₂O miliQ. Finalmente cada muestra se cuantificó en un equipo nanodrop (Nanodrop 2000 Thermo scientific).

La presencia o ausencia de cada alelo se corroboró realizando ensayos de PCR (Polymerase Chain Reaction) de punto final. Cada reacción contenía 1X PCR Rnx Buffer, 1.5 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, 0.4 mM de oligonucleótidos, ~150 ng de ADN y 1 U Taq DNA Polimerasa (Invitrogene) en un volumen final de 15 μ l. Las condiciones y oligonucleótidos ocupados para cada alelo se especifican en la Tabla A2.

5.4 Clonación del gen completo *CLF* (pCLF:CLF:GFP)

La clonación del gen *CLF* se inició a partir del gen insertado en el vector pCR⁸/GW/TOPO del sistema Gateway utilizando el kit pCR⁸/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] de Invitrogen. Las clonas obtenidas a partir de esta reacción se comprobaron por medio de ensayos de digestión para identificar aquellas que tuvieran el gen *CLF* insertado en la dirección correcta, una vez obtenida la clona adecuada, ésta se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Dado que la clona presentó mutaciones en un exón, se procedió a revertirlas mediante mutagénesis dirigida.

5.4.1 Mutagénesis dirigida

Para realizar la mutagénesis dirigida se diseñaron oligonucleótidos con las mutaciones de interés revertidas (MP-CLFmut-F y MP-CLFmut-R), con ellos se intentó amplificar todo el vector utilizando 2.5 U de la enzima AccuPrime (Invitrogene). Para eliminar los vectores que aún contenían las mutaciones, la reacción se digirió con la enzima de restricción DPN1 (Invitrogene), la cual digiere ADN metilado. Finalmente, el producto de digestión se utilizó para transformar células competentes TOP10 de *E. coli*. Las bacterias que contenían el plásmido fueron seleccionadas en medio sólido con 100 µg/ml de espectinomicina.

5.5 Caracterización fenotípica de raíces

5.5.1 Cinética de crecimiento

El crecimiento de la raíces se monitoreó durante los primeros 9 días posteriores a la siembra (dps). Cada 24 horas se colocó una marca en la caja Petri con medio MS que indicara el tamaño actual de cada raíz principal. Al finalizar el periodo indicado, la distancia entre marcas se midió con el procesador de imágenes Fiji (Schneider et al., 2012) respetando la forma de crecimiento.

5.5.2 Análisis por microscopía de luz

Para visualizar de manera óptima las raíces, éstas se sometieron a dos tratamientos distintos. En un primer tratamiento, las raíces se fijaron a 4°C durante 12 horas en metanol al 50% y ácido acético al 10%, a continuación se lavaron y se incubaron con ácido peryódico al 1% durante 40 min a 40°C, enseguida se enjuagaron y se incubaron por dos horas con reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio 100 mM y HCl 0.15 N), finalmente se permeabilizaron añadiendo DMSO al 2% y glicerol al 30% durante dos días [modificado de (Baum and Rost, 1996)]. Aunque este tratamiento no presentó una resolución óptima, sí permitió obtener fijaciones permanentes para análisis posteriores. Un segundo tratamiento consistió en incubar las raíces durante algunos segundos en una solución de lugol al 1%, a continuación se aclararon con una solución de 80% de hidrato de cloral y 10% de glicerol (Willemsen et al., 1998). Este tratamiento, a pesar de no ser permanente, concede una mejor resolución y permite identificar los gránulos de almidón presentes en la cofia. Todas las raíces fueron de 5 dps y se observaron bajo óptica Nomarski en un microscopio Olympus BX60 (aumento 40x, apertura numerica = 0.85).

Para determinar el tamaño del meristemo se midió el tamaño de su dominio de proliferación. Los bordes entre los dominios del meristemo suelen ser difusos por lo que no existen características determinantes que los definan, no obstante, en este trabajo se consideraron los parámetros propuestos por Ivanov y Dubrovsky. Para definir el dominio de proliferación se contó sólo una fila de células del córtex a partir del centro quiescente y hasta la primera célula que comenzaba a aumentar su longitud en comparación a las células más distales (Ivanov and Dubrovsky, 2013).

5.6 Análisis de expresión

5.6.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir de raíces de plantas de 5 dps y mediante dos métodos distintos. En ambos el tejido se trituró en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. En el primer método, cada muestra fue resuspendida en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se realizaron dos extracciones con 0.2 ml de cloroformo centrifugando a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue precipitado con 1 ml de isopropanol frío y se incubó durante 20 min a -20°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet obtenido se lavó 3 veces con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O miliQ.

En un segundo método la extracción se realizó usando el kit Quick-RNA Miniprep (Zymo Research), en este método las células de cada muestra se lisaron agregando 600 µl de RNA Lysis Buffer, después de mezclar por inversión, las muestras se centrifugaron durante 1 min a 11000 rpm, el sobrenadante obtenido se transfirió al filtro Spin-Away y se centrifugó durante 1 min a 11000 rpm para eliminar la mayoría del ADN genómico. El eluyente obtenido se mezcló con 1 volumen de etanol al 100% y se transfirió a la columna Zymo-Spin IIICG, posteriormente se centrifugó durante 30 s a 11000 rpm. La columna Zymo-Spin IIICG fue sometida a un tratamiento con DNasa, para ello primero se lavó con 400 µl de RNA Wash Buffer, se centrifugó durante 30 s a 11000 rpm y en seguida se agregaron 80 µl de DNase I Reaction Mix. Transcurridos 30 min, se agregaron 400 µl de RNA Prep Buffer, en seguida se centrifugó durante 30 s y se adicionaron 700 µl de RNA Wash Buffer para después centrifugar nuevamente por 30 seg. Este último paso se repitió usando 400 µl de RNA Wash Buffer. Finalmente, el ARN se eluyó agregando 50 µl de agua MiliQ y centrifugando durante 30 s a 11000 rpm. En ambos métodos las muestras se cuantificaron en nanodrop.

Para corroborar la integridad del ARN y calibrar su concentración, se diluyeron ~150 ng de ARN en 12 µl de Buffer de carga (13% de buffer MOPS 10x, 16% formaldehído, 65% de formamida y 0.9% de Bromuro de etidio <10mg/ml>), posteriormente se incubaron a 65°C durante 10 min e inmediatamente se colocaron en hielo, finalmente cada muestra se corrió en un gel desnaturalizante de agarosa al 1% y buffer MOPS 1x (MOPS <Sigma-Aldrich> 0.02 M y Acetato de sodio 2.5 mM ajustados a pH7 con NaOH, y EDTA 0.05 mM pH8). La integridad de las muestras se determinó mediante la visualización de los ARN's ribosomales 28S y 18S. Las concentraciones se calibraron mediante densitometría usando el editor de gráficos Adobe Photoshop CS6 versión 13.0 para Windows.

5.6.2 RT-PCR

Una vez calibradas las muestras se procedió a realizar la síntesis de ADN complementario (cDNA) utilizando el kit "First Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT" (Invitrogen). Para cada reacción se agregó en un principio 0.5 µM de oligonucleótido polidT, 0.5 mM de dNTPs y 500 ng - 1 µg de RNA, enseguida se incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1x de buffer First Strand, 10 mM de DTT, 40 U de RNAsa-out y 200 U de la enzima SuperScript II RT, a continuación las muestras se incubaron a 42°C durante 50 min. Finalmente la enzima se inactivó a 70°C por 15 min.

5.6.3 PCR semicuantitativa

El cDNA obtenido se utilizó para realizar ensayos de PCR semicuantitativos, cada reacción contenía 1x PCR Rnx Buffer, 1.5 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, 0.4 mM de oligonucleótidos, ~150 ng de cDNA y 1 U Taq DNA Polimerasa en un volumen final de 15 µl. Las condiciones y oligonucleótidos ocupados para cada gen se especifican en la Tabla A3.

5.6.4 PCR cuantitativa

Todos los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron a partir de tres réplicas biológicas, para cada una de ellas se realizaron dos síntesis de cDNA y cada cDNA se probó a través de tres réplicas técnicas. En cada reacción se utilizaron 1 o 10 ng de cDNA, 5 µl de SYBR Green Master Mix (Thermo scientific) y 300 nM de cada oligonucleótido, en un volumen final de 10 µl. Todas las corridas se

realizaron en un equipo StepOnePlus (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 50°C por 2 min → 95°C por 10 min → (95°C por 15 s → 60°C por 1 min) (x50) → 95°C por 15 s → 60°C por 1 min → 95°C por 15 s +0.3°C.

La eficiencia de los oligonucleótidos utilizados se verificó mediante el algoritmo Real-time PCR Miner (Zhao y Fernald, 2005) y se muestran en la Tabla A5; las secuencias de cada uno de ellos se muestran en la Tabla A4. Para identificar el número de genes normalizadores adecuados para el análisis y validar la estabilidad de cada uno de ellos, se utilizó el algoritmo geNorm (Vandesompele et al., 2002). Finalmente, las diferencias de expresión entre cada fondo genético se estimaron por el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta CT$) utilizando el software qBase+ versión 2.6.1, para ello se sustituyeron previamente los valores de CT originales por aquellos corregidos por el algoritmo Real-time PCR Miner.

5.7 Análisis estadísticos

Todos los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey para múltiples comparaciones. Para comprobar que los datos fueran normales se realizó una prueba de Kolmogorov-Sminov. Para aquellos datos que no cumplían el supuesto de homoscedasticidad o normalidad se realizó una transformación log-normal y raíz cuadrada (Zar, 2010). Todos los análisis se realizaron con el software R versión 3.2.3 (R Core Team, 2015)

6. Resultados

6.1 Clonación del gen *CLF* completo con su propio promotor

Para iniciar este estudio y profundizar en el análisis de la función de ATX1 y CLF, así como su antagonismo en el desarrollo de la raíz, se generaron algunas herramientas moleculares. Para ello, primero se procedió a clonar el gen *CLF* con intrones y su propio promotor mediante el sistema Gateway. La clonación de genes en vectores con proteínas reporteras permite generar plantas transgénicas en las cuales se puede dar seguimiento a la proteína codificada por el gen de interés. Incluir regiones importantes para la regulación transcripcional como son las regiones intrónicas y el propio promotor permite observar un patrón fiel de expresión de la proteína. En este trabajo se dio continuidad a este proceso a partir de seis clonas generadas previamente en nuestro laboratorio las

cuales fueron obtenidas a partir de una amplificación por PCR de punto final usando ADN genómico de plantas Col-0 y los oligonucleótidos CLFg-F y CLFg-R para amplificar 551 pb que comprende toda la región 5' intergénica que podría funcionar como región promotora y toda la región codificante de *CLF* incluyendo sus intrones y excluyendo el codón de paro. Este ensayo generó un amplicón de 5,097 pb, el cual se introdujo en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogene) a través de una topoisomerasa asociada al vector.

Mediante digestión enzimática se verificó en las clonas obtenidas que el inserto del gen *CLF* estuviera en la dirección 5'-3' (Fig. A1), aquellas que mostraron un patrón de digestión correcto fueron corroboradas por PCR con oligonucleótidos que amplificarán un fragmento del gen de *CLF*. Este ensayo reveló que únicamente la clona 2B (en adelante denominada pCLF:CLF 2B) presentó el amplicón esperado de 1,277 pb (Fig. 5a).

Para comprobar que el gen no mostrara ninguna mutación, la clona pCLF:CLF 2B fue secuenciada por el método de Sanger en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (Fig. A6). La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia reportada en las bases de datos <https://www.arabidopsis.org>. Esta comparación demostró que la clona pCLF:CLF 2B presentó 5 mutaciones puntuales intrónicas y 2 mutaciones puntuales no silenciosas en el segundo exón, éstas últimas dieron lugar a cambios de los aminoácidos lisina por arginina (K/R) y ácido glutámico por glicina (E/G) (Fig. 5b).

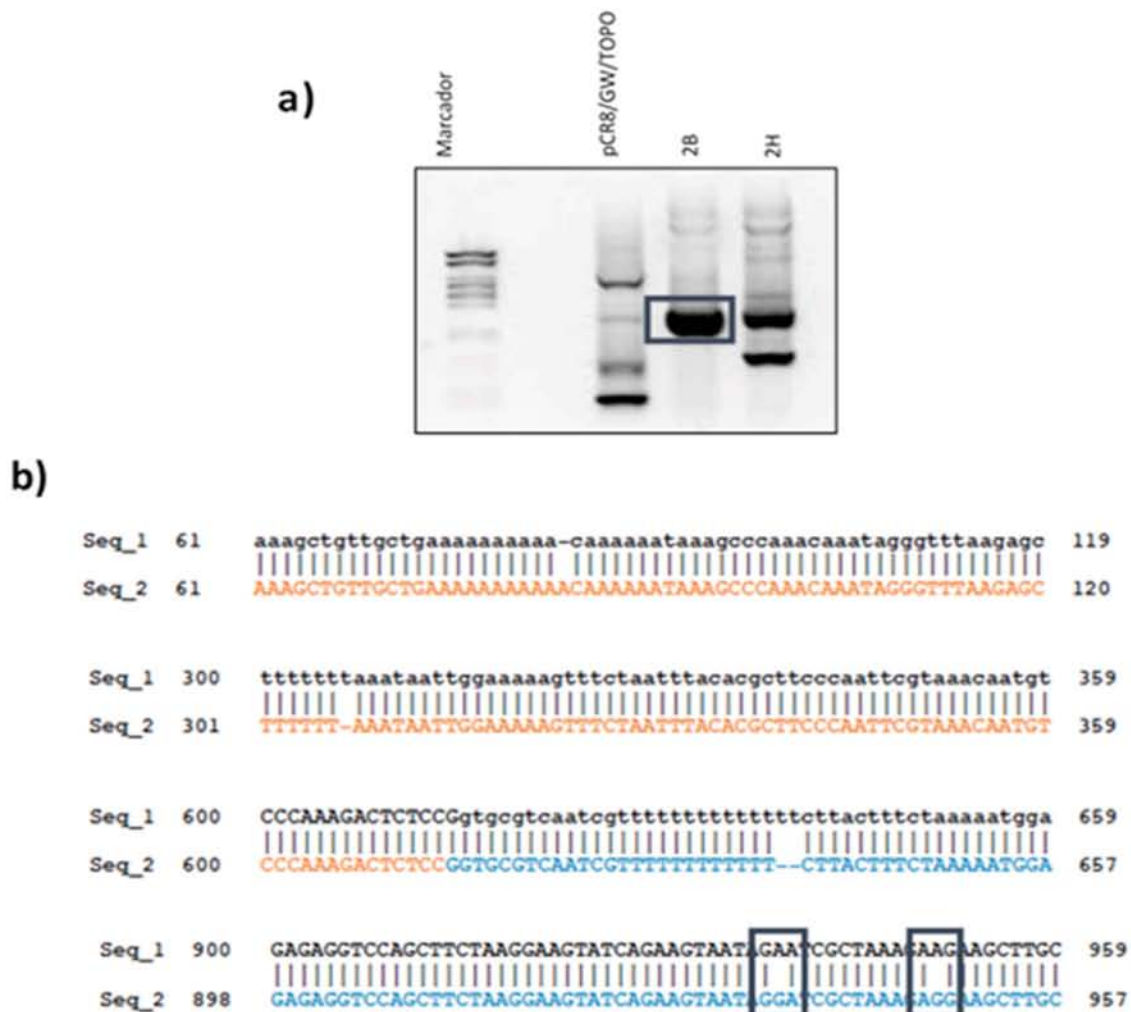


Figura 5. Caracterización de la clona pCLF:CLF 2B. a) PCR usando los oligonucleótidos CLF-TDAR y CLF-TDAF que indica la presencia del gen *CLF*. b) Mutaciones presentes en la clona pCLF:CLF 2B. La secuencia superior representa la secuencia reportada en la base de datos, la inferior representa la secuencia de la clona pCLF:CLF 2B. Los nucleótidos en minúsculas constituyen las regiones intrónicas y los nucleótidos en mayúsculas las regiones exónicas. Las mutaciones de interés para la mutagénesis dirigida se resaltan con recuadros azules.

Este tipo de mutaciones pueden tener un efecto importante sobre la función de la proteína, un ejemplo de ello se ha observado en el propio *locus* de *CLF*, donde el cambio de una prolina por una serina en el dominio catalítico SET genera un alelo de ganancia de función (Doyle y Amasino, 2009)

Para revertir estas mutaciones se realizó un ensayo de mutagénesis dirigida, usando oligonucleótidos que contuvieran las dos bases que revertirían las mutaciones de interés. Cada uno de los oligonucleótidos se probó exitosamente por separado para descartar un posible mal apareamiento debido al cambio de bases. Al realizar la amplificación no se obtuvo ningún amplicón, esto probablemente se deba a que la

enzima de alta fidelidad utilizada (AccuPrime High Fidelity) carecía de la procesividad suficiente para amplificar el vector con el inserto de *CLF* cuyo tamaño alcanzaba 8,159 pb. Por lo anterior, se realizaron diversas modificaciones al protocolo incluyendo el diseño de un par de oligonucleótidos ligeramente distintos a los iniciales, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos. Otras estrategias basadas en la sustitución del fragmento que contenía las mutaciones fueron implementadas, no obstante, debido a dificultades técnicas de índole distinta, las mutaciones no fueron revertidas. Ante este escenario, una opción coherente es comenzar de nuevo el proceso de clonación utilizando desde el principio una polimerasa de mayor fidelidad y alta procesividad que permita evitar la ocurrencia de mutaciones.

6.2 Generación de plantas dobles mutantes *atx1/clf*

El uso de líneas mutantes por T-DNA ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la biología molecular pues permite identificar el papel de elementos genéticos mediante la anulación de su función. De la misma manera, la obtención de dobles mutantes permite el estudio de procesos compartidos que involucren la intervención de dos elementos genéticos.

Para profundizar en el estudio de la función de los factores epigenéticos ATX1 y CLF se utilizaron dos líneas mutantes por inserción de T-DNA a partir de las cuales se generaron dobles mutantes *atx1/clf*. El proceso se llevó a cabo mediante fertilización cruzada tomando a las mutantes de *ATX1* como madres y a las mutantes de *CLF* como padres. El alelo mutante *atx1-3* presenta la inserción de T-DNA en el intrón 19, inmediatamente antes del dominio catalítico SET, mientras que el alelo *clf-29* presenta la inserción de T-DNA en el exón 3, también antes de su dominio catalítico SET (Fig. 6).

La presencia del alelo mutante y el alelo endógeno se corroboró mediante 2 pares de oligonucleótidos para cada gen, donde un par que flanquea la zona de inserción de T-DNA indica la presencia del alelo endógeno (ATX1-F1 y ATX1-R1 para *ATX1*; CLF-TDNAF y CLF-TDNAR para *CLF*), mientras que el otro par, el cual consta de un oligonucleótido dentro del T-DNA y otro fuera de él, indica la presencia del alelo mutante (LBC1 y ATX1-R1 para *ATX1*; LBC1 y CLF-TDNAR para *CLF*) (Fig. 6).

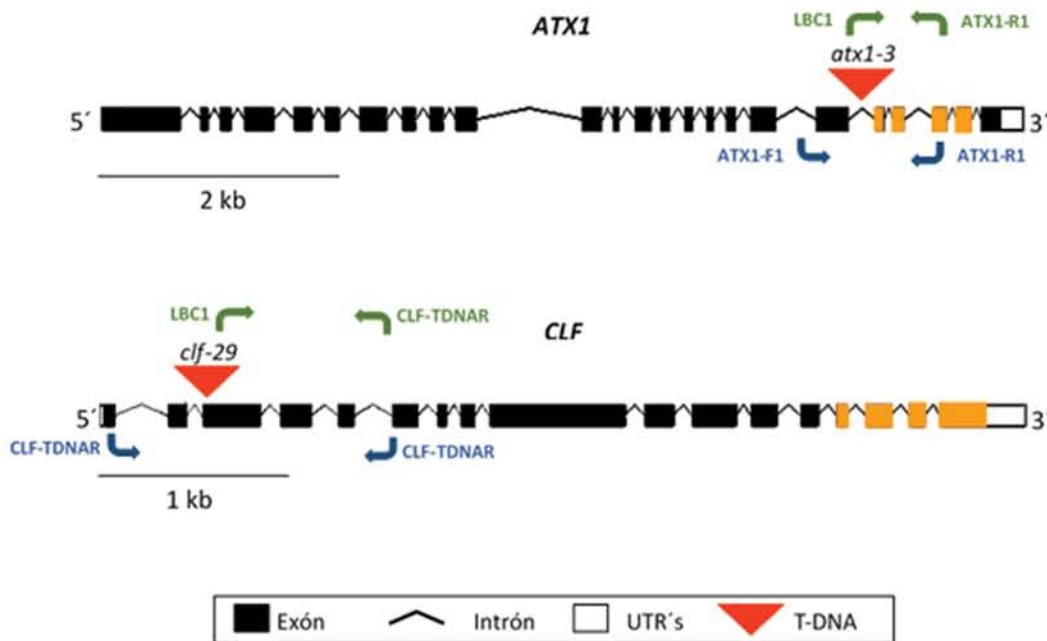


Figura 6. Esquema de los genes *ATX1* y *CLF*. Los oligonucleótidos utilizados para genotipificar los alelos mutantes se muestran en verde y para los alelos endógenos se muestran en azul. La ubicación del dominio catalítico SET se indica en amarillo y la inserción de T-DNA en rojo.

Las semillas obtenidas por la fertilización cruzada efectuada entre las mutantes *atx1-3* y *clf-29* fueron genotipificadas transgeneracionalmente hasta obtener individuos homocigotos. Los individuos se definieron como homocigotos cuando amplificaban los alelos de T-DNA para ambas líneas mutantes y no mostraban ninguna amplificación en los alelos endógenos (Fig. 7). Como resultado de la fertilización cruzada se obtuvieron dos familias homocigotas (Fig. 7). Con la finalidad de dar mayor robustez a los resultados, ambas familias se evaluaron en la mayoría de los análisis posteriores.

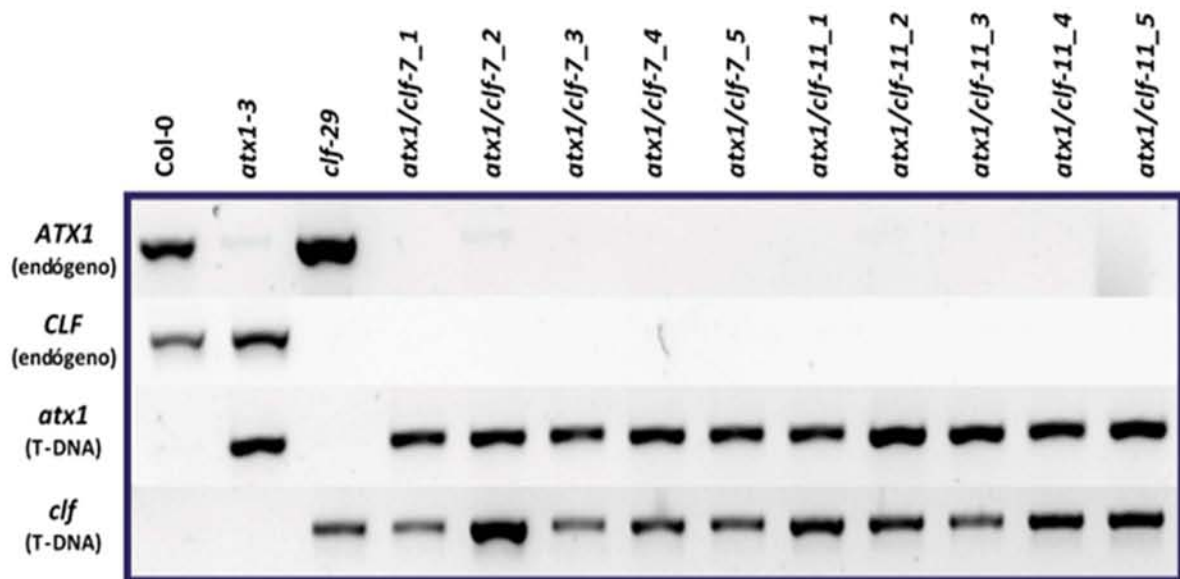


Figura 7. Genotipificación de las familias dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11* por PCR. Gel teñido con Bromuro de etidio donde se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de 5 individuos de cada familia. Como controles se usó ADN de plantas Col-0 y de las mutantes *atx1-3* y *clf-29*.

6.3 Las plantas dobles mutantes *atx1/clf* reversionen parcialmente el fenotipo de raíz

Estudios previos han demostrado que los factores ATX1 y CLF juegan un importante papel en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. En lo que respecta a la morfología, las mutantes de *ATX1* son de floración temprana, tienen defectos en la posición y número de órganos florales y presentan hojas pequeñas (Alvarez-Venegas et al., 2003) (Fig. 8), sus raíces son cortas, presentan un meristemo reducido, una tasa menor de producción celular y menor número de raíces laterales (Napsucialy-Mendivil et al., 2014; Petrone, 2015). Por otro lado, las mutantes de *CLF* también son de floración temprana, exhiben hojas pequeñas y curvadas y muestran aberraciones en órganos florales (Goodrich et al., 1997) (Fig. 8). En cuanto a su raíz, datos obtenidos bajo las mismas condiciones utilizadas en este trabajo indican que las mutantes de *CLF* no muestran una diferencia significativa en la longitud de la raíz ni en el tamaño del meristemo (Sánchez, datos no publicados), aunque también se han reportado datos donde las mutantes de *CLF* sí exhiben un ligero aumento en su longitud, tamaño del meristemo y número de raíces laterales (Aichinger et al., 2011; Gu et al., 2014). Estas discrepancias se abordarán con detalle en la discusión.

Al tener ATX1 y CLF algunas funciones antagónicas, se esperaba que las plantas *atx1/clf* presentaran un fenotipo silvestre, sin embargo el fenotipo aéreo presente en las dobles mutantes fue muy similar a las mutantes *clf-29*, pues presentan floración temprana y hojas pequeñas y curvadas (Fig. 8).



Figura 8. Fenotipo aéreo presente en plantas de los fondos silvestres (Col-0), mutantes sencillos (*atx1-3* y *clf-29*) y dobles mutantes (*atx1/clf-7* y *atx1/clf-11*). a) Roseta de plantas de 18 días pos-germinación. b) Escapo en plantas de 22 días pos-germinación.

Para evaluar el efecto conjunto de ATX1 y CLF sobre el fenotipo de la raíz principal, se realizó una cinética de crecimiento para las mutantes sencillas *atx1-3* y *clf-29*, y para las dos familias de dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11*. Estos análisis revelaron que a los 9 dps las mutantes *atx1-3* alcanzaron una longitud de un 69.9% respecto a las plantas silvestres, en contraste, las mutantes *clf-29* mostraron una longitud de un 99%, mientras que las dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11* presentaron una

longitud de un 86.8% y 86.9% respectivamente (Fig. 9c). Los resultados obtenidos corroboraron parte de los estudios reportados para las mutantes sencillas y, de manera interesante, mostraron que las plantas dobles mutantes recuperan casi en su totalidad el fenotipo silvestre de raíz (Fig. 9a) a diferencia de lo observado en los tejidos aéreos.

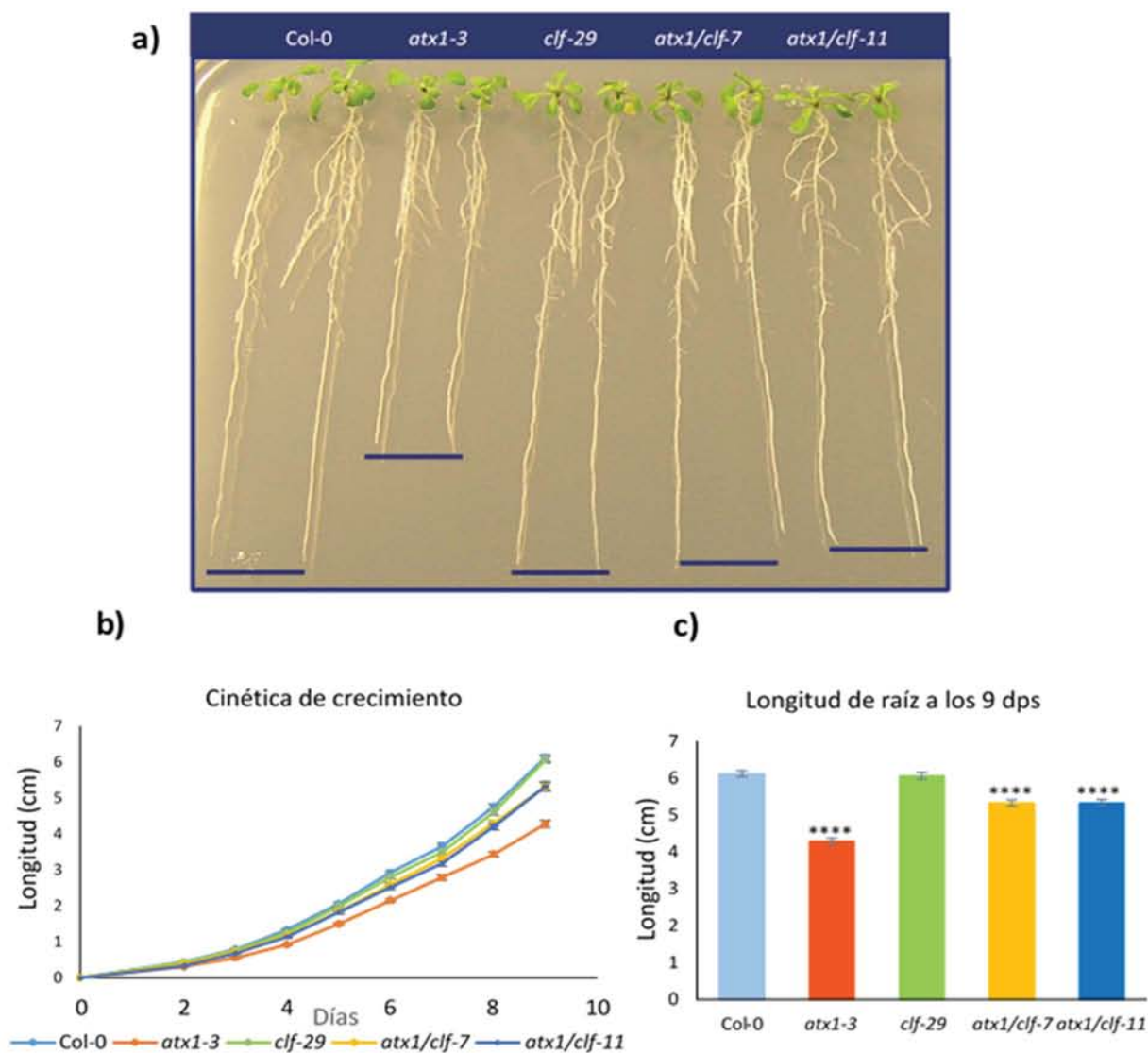


Figura 9. Longitud de la raíz en de plantas silvestres (Col-0), mutantes simples (*atx1-3* y *clf-29*) y dobles mutantes (*atx1/clf-7* y *atx1/clf-11*). a) Fenotipo presente en plántulas de 9 dps. b) Análisis de cinética de crecimiento de raíz. c) Longitud total a los 9 dps. Resultados de 4 réplicas biológicas, Col-0 n=34, *atx1-1* n=36, *clf-29* n=33, *atx1/clf-7* n=35 y *atx1/clf-11* n=27. Los asteriscos (***) indican diferencias significativas para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey en relación a Col-0 con una $p < 0.0001$, las barras indican el error estándar.

6.4 El tamaño del meristemo de las plantas dobles mutantes en *atx1/clf* es igual al fenotipo silvestre

Se ha demostrado que en el ecotipo Columbia existe una relación proporcional entre la longitud de la raíz y el tamaño del meristemo (Cederholm et al., 2012), aunque esta proporción no se cumple en todos los ecotipos (Aceves-García, 2015), es evidente que el papel proliferativo del meristemo tiene una fuerte influencia sobre la longitud de la raíz.

Para corroborar esta relación y evaluar el efecto conjunto de *ATX1* y *CLF* sobre el tamaño del meristemo, se cuantificó el número de células que constituían el dominio de proliferación celular de su meristemo. Como se esperaba, el dominio de proliferación de las mutantes simples *atx1-3* y *clf-29* a los 5 dps fue directamente proporcional con el tamaño total de la raíz, pues *atx1-3* muestra un dominio de proliferación y una longitud total de su raíz principal significativamente menor respecto a las plantas silvestres, mientras que las mutantes *clf-29* no mostraron diferencias significativas en ninguna de las dos características. Por otra parte, es interesante notar que, a diferencia de *atx1-3* y *clf-29*, el dominio de proliferación de las dobles mutantes *atx1/clf* no fue directamente proporcional a la longitud total de su raíz principal (Fig. 9c y 10b). El conteo de células del córtex reveló que, en relación a las plantas silvestres, *atx1-3* exhibe un dominio de proliferación de tan sólo el 80.35%, *clf-29* de 99.11% y las dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11* de un 99.05% y 98.82%, respectivamente (Fig. 10b). La mutante *atx1-3* fue la única que presentó diferencias significativas, lo cual fue coherente con resultados previamente reportados (Petroni, 2015), mientras que las mutantes sencillas *clf-29* y las dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11* mostraron un dominio de proliferación y una longitud de raíz muy similar a las plantas silvestres, indicando que el fenotipo de meristemo pequeño de la mutante *atx1-3* es revertido por la ausencia de *CLF*.

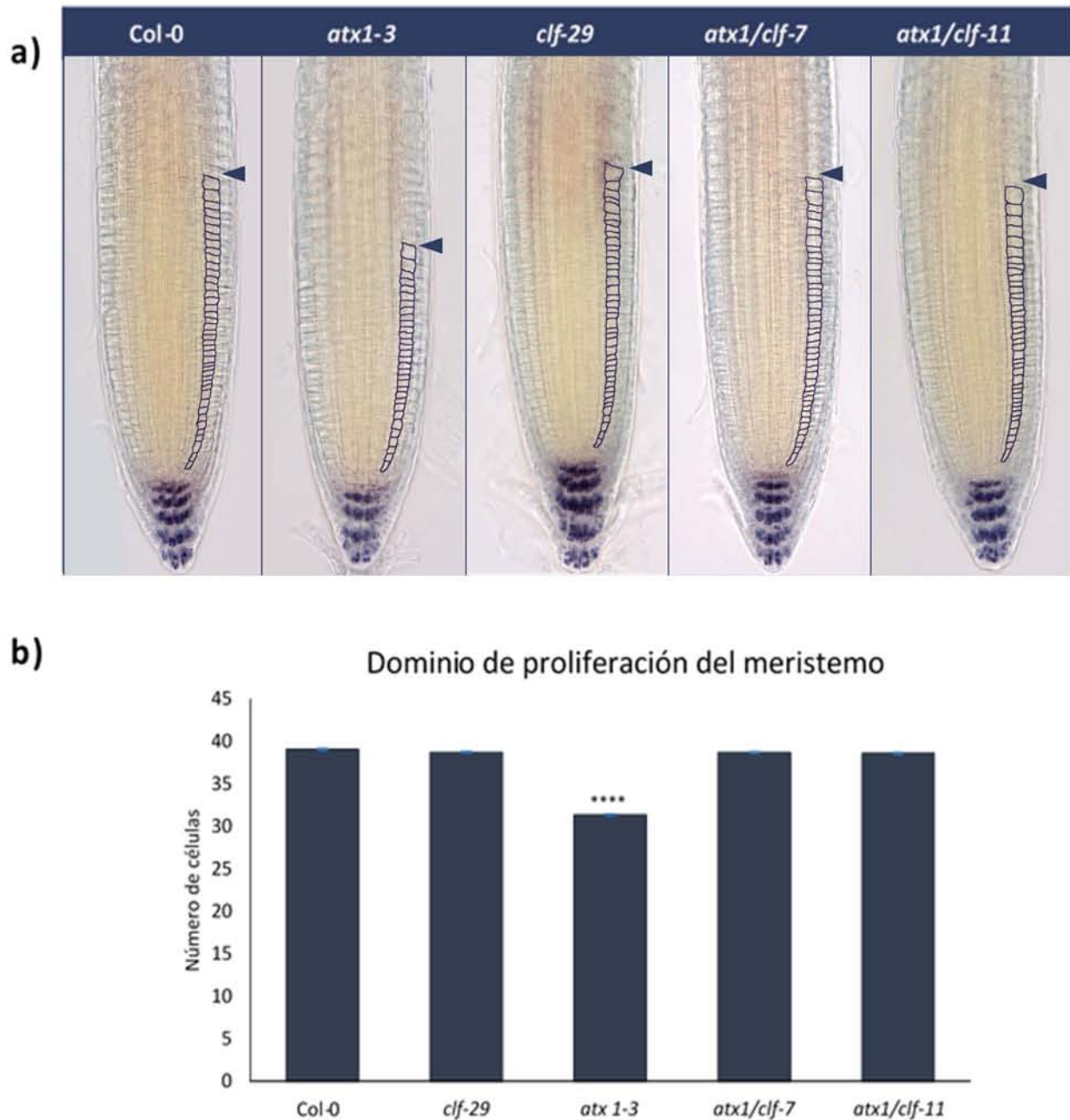


Figura 10. Meristemo de plantas silvestres (Col-0), mutantes simples (*atx1-3* y *clf-29*), y dobles mutantes (*atx1/clf-7* y *atx1/clf-11*). a) Meristemo de la raíz de plántulas de 5 dps. Las células del córtex consideradas para determinar el tamaño del dominio de proliferación se muestran resaltadas con una línea azul. Las flechas indican el fin del dominio de proliferación. Los gránulos de almidón se muestran en azul. b) Número promedio de las células del dominio de proliferación a los 5 dps. Resultados de 3 réplicas biológicas, Col-0 n=37, *atx1-3* n=42, *clf-29* n=41, *atx1/clf-7* n=35 y *atx1/clf-11* n=32. Los asteriscos (****) indican diferencias significativas para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey en relación a Col-0 con una $p < 0.0001$, las barras indican el error estándar.

6.5 ATX1 y CLF regulan antagónicamente la expresión de genes MADS-box implicados en el desarrollo de la raíz

La función activadora de ATX1 y el papel represor de CLF en la regulación transcripcional han sido ampliamente estudiados. Adicionalmente se ha demostrado que a lo largo del genoma de *Arabidopsis* las marcas catalizadas por ATX1 y CLF pueden co-localizar dentro de la misma fibra de cromatina (Sequeira-Mendes et al., 2014). Estos datos sugieren una amplia probabilidad de encontrar genes regulados epigenéticamente por ambas proteínas, entre ellos los factores de transcripción tipo MADS-box. La regulación de estos factores transcripcionales puede contribuir a explicar el fenotipo radicular observado en las mutantes evaluadas en este estudio.

Al realizar análisis de expresión de algunos genes MADS-box importantes para el desarrollo de la raíz por PCR semicuantitativa, se encontró que los genes *XAL2/AGL14* y *AGL17* disminuyen su expresión en la mutante *atx1-3*, mientras que en la mutante *clf-29* la expresión de estos genes se ve ligeramente enriquecida, estos resultados coinciden con reportes previos de nuestro laboratorio (Fig. 12) (Petrone, 2015 y Sánchez, datos no publicados). De manera interesante, las dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11* presentaron una expresión mayor que las mutantes de *atx1-3* y similar a *clf-29* (Fig. 11). En contraste a estos resultados, la expresión de *XAL1/AGL12* no se muestra alterada en ningún fondo genético (Fig. 11). Por otro lado, los patrones de expresión de *AGL19* fueron poco reproducibles en las tres réplicas biológicas, por lo que no se pudo definir un comportamiento preciso (Fig. 11 y A2).

Conforme a lo esperado, las mutantes de *clf-29* y las dobles mutantes *atx1/clf-7* y *atx1/clf-11* no presentaron expresión de *CLF*, lo cual acredita a la inserción de T-DNA de la mutante *clf-29* como un alelo nulo. Por otro lado, la expresión del *ATX1* se puede percibir ligeramente en las mutantes *atx1-3* y las dobles mutantes, evidenciando a esta inserción de T-DNA como un alelo de pérdida de función parcial (Fig. 11).

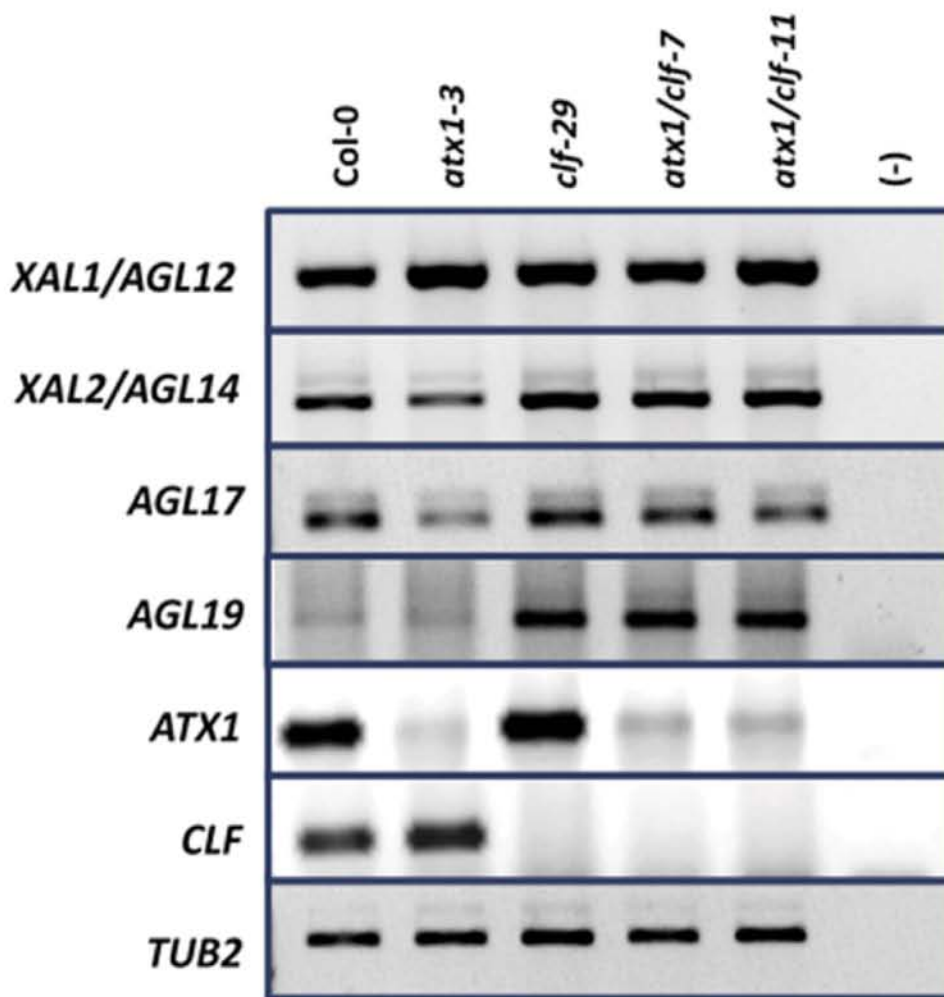


Figura 11. Expresión de los factores de transcripción MADS-box en fondos silvestres (Col-0), mutantes simples (*atx1-3* y *clf-29*), y dobles mutantes (*atx1/clf-7* y *atx1/clf-11*) en raíz de plantas de 5 dps. Como calibrador se muestran la expresión del gen de Tubulina 2 (*TUB2*).

Para corroborar los datos obtenidos y esclarecer aquellos que fueron poco reproducibles, se procedió a realizar ensayos de PCR cuantitativa. Esta técnica permite un análisis con alta sensibilidad así como resultados más robustos.

La técnica de PCR cuantitativa es muy precisa, por lo que antes de analizar la expresión de los genes de interés se deben evaluar diferentes parámetros que permitan obtener resultados veraces. Como primer parámetro se evaluó la eficiencia de cada par de oligonucleótidos utilizados, los valores

obtenidos fueron siempre mayores al 86% (Tabla A5), estos valores permiten ajustar las lecturas finales de expresión y proporcionan una comparación óptima respecto a los genes normalizadores. Un segundo parámetro a evaluar es que la tasa de amplificación sea dependiente de la concentración inicial del templado, para ello se probaron dos concentraciones distintas de templado para cada par de oligonucleótidos (1 ng y 10 ng); las diferencias entre cada concentración fueron de entre 3.8 y 4.1 ciclos (Fig. A3), lo cual es correspondiente con las curvas de calibración estándar (Thermo Scientific, 2012). Finalmente es necesario comprobar que en cada reacción se obtengan productos de amplificación únicos; todos los análisis realizados con los diferentes oligonucleótidos mostraron una curva de *melting* específica, evidenciando que efectivamente cada reacción amplifica sólo un producto por lo que las lecturas de expresión obtenidas son específicas del templado de interés (Fig. A4).

Con la finalidad de dar mayor robustez a los resultados, cada ensayo de PCR cuantitativa se realizó con tres réplicas biológicas y para cada una de ellas se realizaron dos síntesis de cDNA. Los niveles de expresión relativa para cada reacción se muestran en la figura A5. Como genes normalizadores se utilizaron *RNAH*, *PDF2* y *UPL7* (Czechowski, 2005), los tres mostraron niveles de expresión semejantes entre todos los fondos genéticos (Fig. 12a).

Los análisis por PCR cuantitativa corroboraron que el alelo *clf-29* es nulo pues no hay evidencia de su expresión en los fondos mutantes *clf-29* ni en los dobles mutantes *atx1/clf-7*. Por otro lado, el alelo *atx1-3* es de pérdida de función parcial pues se puede distinguir una ligera expresión del 9% y 11% en los fondos mutantes *atx1-3* y *atx1/clf-7* respectivamente (Fig. 12b).

En contraste con lo obtenido en los ensayos de PCR semicuantitativa, el gen *XAL1/AGL12* parece desregularse significativamente, pues su expresión disminuye en la mutante *atx1-3* y aumenta sutilmente en la mutante *clf-29*, aunque este aumento no es significativo, además, es interesante notar que en la doble mutante *atx1/clf-7* su expresión recupera niveles similares al fondo silvestre (Fig. 12b). Por otra parte, los datos obtenidos para los genes *XAL2/AGL14* y *AGL17* resultaron congruentes con los datos presentados en los ensayos de PCR semicuantitativa, pues en ambos su expresión disminuye significativamente en la mutante *atx1-3* y tiene un aumento también significativo en las mutantes *clf-29* (Fig. 12b). Para el caso de *AGL19*, el cual presentaba datos poco reproducibles en los ensayos de PCR semicuantitativa, se logró observar un patrón de expresión equivalente a *XAL2/AGL14* y *AGL17* en las mutantes simples. En contraste con la expresión de *XAL1/AGL12*, la expresión de *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*, en la doble mutante *atx1/clf-7* fue significativamente mayor respecto a

la expresión observada en las plantas silvestres, resultando más similar a la expresión observada en las mutantes *clf-29*, esta observación también es congruente con lo observado en los ensayos de PCR semicuantitativa (Fig. 12b).

En conjunto estos datos indican que la función de ATX1 es necesaria para una adecuada expresión de todos los genes MADS-box estudiados, mientras que CLF participa en la represión de *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* pero aparentemente no participa en la represión de *XAL1/AGL12*, sin embargo sí contribuye a contrarrestar el efecto de la ausencia de ATX1 en las dobles mutantes.

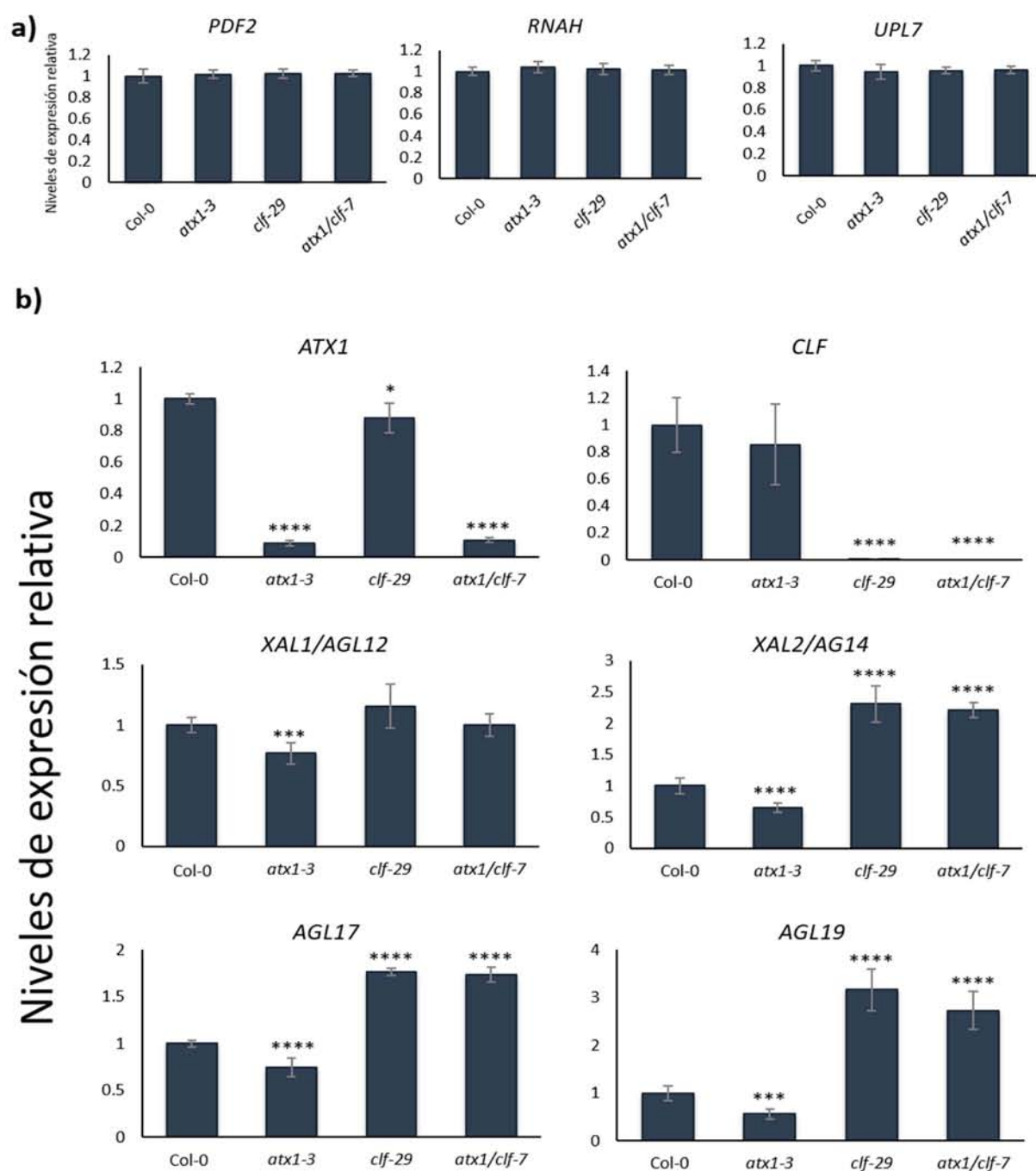


Figura 12. Expresión relativa obtenida a partir de PCR cuantitativa en plantas de 5 dps. a) Patrón de expresión de los genes normalizadores *PDF2*, *RNAH* y *UPL7*. b) Patrón de expresión de los genes *ATX1*, *CLF*, *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*. Los asteriscos indican diferencias significativas para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey en relación a Col-0 con una $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*). Las barras de error indican la desviación estándar.

7. Discusión

La función activadora de TrxG y la función represora de PcG han sido bien estudiadas de manera individual, no obstante, su interacción antagónica sobre genes blanco en común y sus efectos fenotípicos han sido menos explorados en plantas. En este trabajo se evaluó el efecto de ATX1 y CLF, dos metiltransferasas de TrxG y PcG, respectivamente, sobre el fenotipo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, así como su influencia en la regulación de genes homeóticos tipo MADS-box involucrados en su desarrollo.

7.1 Caracterización fenotípica

El estudio de los efectos fenotípicos como resultado de la ausencia de los factores epigenéticos ATX1 y CLF provee un primer acercamiento para comenzar a estudiar su papel en el desarrollo de *Arabidopsis*. Los análisis fenotípicos en las mutantes simples de ATX1 y CLF realizados en este trabajo sugieren un papel importante de su función en el desarrollo de la raíz.

El fenotipo analizado en las mutantes *atx1-3* corrobora estudios previos que han descrito a las mutantes de ATX1 como plantas de raíz corta y meristemo reducido (Napsucialy-Mendivil et al., 2014; Petrone, 2015), se ha reportado que este fenotipo puede ser explicado por eventos dentro del RAM que involucran deficiencias en el ciclo celular, producción celular y transición de células en proliferación a células diferenciadas (Napsucialy-Mendivil et al., 2014). Cabe mencionar que en el presente trabajo también se observó que las mutantes *atx1-3* mostraron una evidente disminución en el crecimiento de la raíz principal después del tercer día post-siembra, esto sugiere una mayor influencia de ATX1 sobre el desarrollo de la raíz en días posteriores al tercero, pero no sobre el tiempo de germinación. En conjunto, estos datos evidencian a ATX1 como un factor epigenético involucrado en la regulación en la longitud de la raíz principal y el tamaño del meristemo.

El fenotipo de las mutantes *clf-29* no mostró una diferencia significativa en la longitud de la raíz ni en el tamaño del meristemo respecto a las plantas silvestres, datos que se corroboran con estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Sánchez, datos no publicados). Sin embargo estos resultados contrastan con reportes que indican que esta mutante exhibe una raíz ligeramente más larga y un meristemo con mayor número de células del córtex, pero sin modificaciones en la tasa de división relativa de las células del RAM, dichos fenotipos parecen acentuarse conforme avanza el desarrollo de

la raíz (Aichinger et al., 2011). Las ligeras diferencias entre ambos resultados puede ser explicada por variaciones en las condiciones de crecimiento y los estadios de desarrollo evaluados, ya que en el estudio donde se reportó a las mutantes de *clf-29* como plantas de raíz larga, las diferencias observadas en la longitud de la raíz a los 9 dps y el tamaño del meristemo a los 5 dps (edades en las que se realizaron los análisis en el presente trabajo) son muy ligeras, por lo tanto, realizar de nuevo estos estudios en días más tardíos y bajo las mismas condiciones de crecimiento ayudaría a esclarecer estas discrepancias. Por otra parte, es importante tener presente que las restricciones en el desarrollo de los organismos, sobre todo aquellas que tienden a un aumento en la biomasa, parece que son difíciles de sobrepasar, esto contribuye a explicar que las mutantes de *CLF* no muestren un aumento en su tamaño, o bien, que éste sea muy ligero.

Dados los contrastantes efectos observados entre las mutantes sencillas *atx1-3* y *clf-29*, evaluar las características de plantas mutadas para ambos factores puede ayudar a profundizar en el estudio de su función. Los resultados de la comparación de los fenotipos aéreos entre las mutantes simples con respecto a las dobles mutantes *atx1/clf* fueron inesperados; se ha publicado anteriormente que dobles mutantes *atx1/clf* en el ecotipo *Ws* recuperan el fenotipo silvestre en la parte aérea (Saleh et al., 2007) contrastando con los resultados obtenidos en este estudio, en donde el mutante *atx1/clf* está en el ecotipo *Col-0*. Estas discrepancias pueden ser explicadas debido a los diferentes ecotipos utilizados, o a eventos de reversión, como se ha reportado para 5% de la progenie homocigota *atx1/clf* que exhibe un fenotipo revertido muy similar a las mutantes de *CLF* (Saleh et al., 2007). La restauración del fenotipo aéreo en las dobles mutantes *atx1/clf* dentro del ecotipo *Ws* puede estar asociada a la expresión de *AGAMUS (AG)*, cuya activación en mutantes de *CLF* está ligada al fenotipo de hojas curvadas y floración temprana (Goodrich et al., 1997). La expresión de *AG* en las dobles mutantes *atx1/clf* es idéntica a la expresión de las plantas silvestres (Saleh et al., 2007) lo cual podría explicar la restauración del fenotipo aéreo. En este sentido, sería interesante medir la expresión de *AG* en las dobles mutantes generadas en este trabajo, estos resultados nos ayudarían a explicar de manera más detallada el fenotipo aéreo observado.

Por otra parte, en este estudio se encontró que el fenotipo de la raíz de las dobles mutantes *atx1/clf* exhibió una restauración del -87% en la longitud total de la raíz y una restauración total del tamaño del meristemo respecto a las plantas silvestres. Esto indica que el fenotipo de raíz corta y meristemo reducido de *atx1-3* es restaurado en la doble mutante. Por otra parte, dado que el tamaño del meristemo de las mutantes *clf-29* no fue significativamente distinto a las plantas silvestres, es probable

que las dobles mutantes en realidad desplieguen un fenotipo en el RAM más bien similar a *clf-29*, esta posibilidad evidenciaría que la pérdida de CLF genera un fenotipo epistático sobre el exhibido por la ausencia de ATX1, lo cual también es sustentada por su fenotipo aéreo. Aunque el tamaño total de la raíz en las dobles mutantes *atx1/clf* es significativamente distinto a las plantas silvestres y a *clf-29*, por lo que para este rasgo la epistasis de CLF sobre ATX1 podría no cumplirse o podría ser parcial.

Se ha demostrado que en el ecotipo Columbia existe una relación proporcional entre la longitud de la raíz y el tamaño del meristemo (Cederholm et al., 2012), sin embargo este patrón no concuerda con el hecho de que las dobles mutantes *atx1/clf* tienen el mismo tamaño de meristemo que las plantas silvestres pero difieren en la longitud de la raíz. Estos resultados pueden ser explicados por eventos ocurridos en las zonas de elongación o diferenciación (Aceves-García, 2015) donde las células de las dobles mutantes pueden ser más cortas que las células de plantas silvestres dando como resultado una reducción en la longitud total de la raíz pero un meristemo sin alteraciones en el número de las células del córtex.

7.2 Análisis de expresión genética

Estudiar la expresión de los genes blancos de CLF y ATX1 en el desarrollo de la raíz puede contribuir a explicar el fenotipo observado en las dobles mutantes *atx1/clf* y las mutantes sencillas *atx1-3* y *clf-29*. En este trabajo se analizaron los niveles de expresión de los factores de transcripción tipo MADS-box *XAL1/ALG12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*. Todos ellos se expresan en raíz y de algunos ya se han demostrado funciones importantes en este órgano (Alvarez-Buylla et al., 2000; Burgeff et al., 2002; Fonseca Salazar, 2011; Garay-Arroyo et al., 2013; Tapia-Lopez et al., 2008).

En general, los ensayos de PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa revelaron que los factores de transcripción tipo MADS-box analizados muestran un aumento de su expresión en las mutantes *clf-29* y una disminución en las mutantes *atx1-3*, estos resultados concuerdan con la actividad antagónica reportada entre ambos factores, pues en la ausencia de la función represora de CLF es de esperarse que sus genes blanco se sobre expresen, mientras que en la ausencia de la función activadora de ATX1 se esperaría que sus genes blanco disminuyeran su expresión. Por otra parte, es interesante notar que la expresión de *ATX1* disminuye significativamente en los mutantes de *clf-29*, indicando que CLF tiene una influencia en la regulación de la expresión de *ATX1* de una manera contrastante con la forma en la que CLF regula la expresión de sus genes blanco reportados y de los genes MADS-box evaluados en

este estudio, sugiriendo así una posible regulación indirecta de CLF sobre ATX1.

La expresión de *AGL12* resulta un caso particular pues los análisis de PCR cuantitativa muestran una sutil pero significativa disminución en los fondos *atx1-3*, mientras que en los fondos *clf-29* el aumento no es significativo, en principio, estos resultados sugieren que *AGL12* sólo se regula por ATX1 y no por CLF, no obstante, es interesante notar que en los fondos dobles mutantes *atx1/clf-7* la expresión de *AGL12* se recupera, indicando que CLF de alguna manera también está involucrado en la regulación transcripcional de *AGL12* contrarrestando el efecto que tiene la ausencia de ATX1. Las mutantes de *XAL1/AGL12* son de raíz corta y meristemo pequeño, las células de su CQ y su columela se encuentran desorganizadas y su tasa de producción celular es más baja (Tapia-Lopez et al., 2008) todas estas características se comparten con las mutantes de *XAL2/AGL14* (Garay-Arroyo et al., 2013). En este sentido, las alteraciones en la expresión de estos genes en las mutantes *atx1-3* y *clf-29* respaldan la idea de que ATX1 y CLF participan en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* mediante la regulación de genes homeóticos tipo MADS-box, aunque no es la única vía por la cual podrían estar participando en este proceso.

Como ya se ha mencionado previamente, los patrones de expresión observados en la ausencia de ATX1 y CLF de manera individual son congruentes entre los genes MADS-box analizados, sin embargo, la ausencia de ambos factores de manera simultánea tiene al menos dos efectos diferentes. Por una parte, la expresión de *XAL1/AGL12* en las dobles mutantes se recupera de manera similar a las plantas silvestres, esto puede deberse a que, aunque CLF de manera individual no parece influir en la regulación de su expresión, la ausencia de CLF contrarresta el efecto de la ausencia de ATX1 en las dobles mutantes. En contraste con este comportamiento, los niveles de expresión de *XAL2/AGL14*, *AGL17* y, en menor medida, de *AGL19* en las dobles mutantes fueron más similares a los niveles de expresión de las mutantes *clf-29* lo cual, de manera similar al fenotipo aéreo y probablemente al tamaño del meristemo, evidencia un efecto epistático de la ausencia de CLF sobre la ausencia de ATX1. Este patrón donde predomina el efecto sobreexpresor de las mutantes de *CLF* se ha visto también en numerosos genes de las dobles mutantes *clfsdg26* (Zhao et al., 2015). SDG26 es una proteína con dominio SET que forma parte de TrxG y cuyas mutantes muestran una disminución en las marcas H3K4me3 y H3K36me3, por lo que ha sido asociada a procesos de activación transcripcional (Berr et al., 2015).

Para ayudar a esclarecer el mecanismo por el cual CLF y ATX1 regulan el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, resulta necesario realizar ensayos más finos que evidencien una regulación directa o indirecta sobre sus genes blanco, en este sentido, medir la abundancia de sus respectivas marcas (H3K4me3 y H3K27me3) y su interacción física en los *loci* de *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17*, *AGL19* y *ATX1* proveería un elemento importante.

Dado que ATX1 y CLF son factores epigenéticos con numerosos blancos y por lo tanto evidentes efectos pleiotrópicos, resulta complicado aventurar una explicación lineal que englobe en su totalidad los resultados fenotípicos y de expresión genética plasmados en este trabajo, no obstante estos resultados invitan a pensar en el papel de ATX1 y CLF de una manera más compleja. Bajo esta lógica, un enfoque de redes ayudaría a esclarecer el efecto de estos factores epigenéticos en el desarrollo de *Arabidopsis* (Alvarez-Buylla et al., 2007). El papel espistático de la ausencia de CLF sobre la ausencia de ATX1 indican que el papel represor de CLF es un nodo importante para mantener una configuración tal que los genes involucrados en una red genética dada, mantengan una actividad constante, es decir, la ausencia de CLF es suficiente para generar un estado estable a pesar de la ausencia de ATX1. Para corroborar esta posibilidad es necesario realizar análisis *in silico* que incluyan suficientes datos experimentales sobre la regulación de genes blanco de ATX1 y CLF, así como sus posibles interacciones.

8. Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó el papel antagónico de los factores epigenéticos ATX1 y CLF en la raíz de *Arabidopsis thaliana*, a partir de los resultados obtenidos se pueden derivar las siguientes conclusiones:

- El fenotipo aéreo de las plantas *atx1/clf* evidencia un efecto epistático de CLF sobre ATX1.
- En la raíz, la ausencia de CLF contrarresta el efecto de la falta de ATX1 en el meristemo y parcialmente en su longitud.
- ATX1 regula positivamente a *XAL1/AGL12*.
- ATX1 y CLF regulan antagónicamente a los genes homeóticos de la familia MADS-box, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*.
- CLF es epistático sobre ATX1 en la regulación de la expresión génica de *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*.

9. Referencias

- Aceves-García, P., 2015. Variabilidad feotípica en la raíz de *Arabidopsis thaliana* y su correlación con la expresión génica. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Aichinger, E., Villar, C.B.R., Di Mambro, R., Sabatini, S., Kohler, C., 2011. The CHD3 Chromatin Remodeler PICKLE and Polycomb Group Proteins Antagonistically Regulate Meristem Activity in the *Arabidopsis* Root. *Plant Cell* 23, 1047–1060. doi:10.1105/tpc.111.083352
- Alvarezbuylla, E., Benitez, M., Davila, E., Chaos, A., Espinosasoto, C., Padillalongoria, P., 2007. Gene regulatory network models for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 83–91. doi:10.1016/j.pbi.2006.11.008
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F., Yanofsky, M.F., 2000. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24, 457–466.
- Alvarez-Venegas, R., 2010. Regulation by Polycomb and Trithorax Group Proteins in *Arabidopsis*. *Arab. Book* 8, e0128. doi:10.1199/tab.0128
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., Avramova, Z., 2003. ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr. Biol.* 13, 627–637.
- Alvarez-Venegas, R., Sadler, M., Hlavacka, A., Baluška, F., Xia, Y., Lu, G., Firsov, A., Sarath, G., Moriyama, H., Dubrovsky, J.G., others, 2006. The *Arabidopsis* homolog of trithorax, ATX1, binds phosphatidylinositol 5-phosphate, and the two regulate a common set of target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6049–6054.
- Avramova, Z., 2009. Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in *Arabidopsis*. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 371–381. doi:10.1387/ijdb.082664za
- Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G., Aalen, R.B., 2001. The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* 29, 4319–4333.
- Baum, S.F., Rost, T.L., 1996. Root apical organization in *Arabidopsis thaliana* 1. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192, 178–188. doi:10.1007/BF01273890
- Bemer, M., Grossniklaus, U., 2012. Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 523–529. doi:10.1016/j.pbi.2012.09.006
- Berr, A., Shafiq, S., Pinon, V., Dong, A., Shen, W.-H., 2015. The *trxG* family histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP 26 promotes flowering via a distinctive genetic pathway. *Plant J.* 81, 316–328. doi:10.1111/tpj.12729
- Berr, A., Shafiq, S., Shen, W.-H., 2011. Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1809, 567–576. doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.001
- Berr, McCallum, E.J., Menard, R., Meyer, D., Fuchs, J., Dong, A., Shen, W.-H., 2010. *Arabidopsis* SET DOMAIN GROUP2 Is Required for H3K4 Trimethylation and Is Crucial for Both Sporophyte and Gametophyte Development. *Plant Cell* 22, 3232–3248. doi:10.1105/tpc.110.079962
- Bouyer, D., Roudier, F., Heese, M., Andersen, E.D., Gey, D., Nowack, M.K., Goodrich, J., Renou, J.-P., Grini, P.E., Colot, V., Schnittger, A., 2011. Polycomb Repressive Complex 2 Controls the Embryo-to-Seedling Phase Transition. *PLoS Genet.* 7, e1002014. doi:10.1371/journal.pgen.1002014

- Burgeff, C., Liljegen, S.J., Tapia-López, R., Yanofsky, M.F., Alvarez-Buylla, E.R., 2002. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214, 365–372. doi:10.1007/s004250100637
- Burkhardt, R.W., 2013. Lamarck, Evolution, and the Inheritance of Acquired Characters. *Genetics* 194, 793–805. doi:10.1534/genetics.113.151852
- Calonje, M., 2014. PRC1 Marks the Difference in Plant PcG Repression. *Mol. Plant* 7, 459–471. doi:10.1093/mp/sst150
- Carles, C.C., Fletcher, J.C., 2009. The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev.* 23, 2723–2728. doi:10.1101/gad.1812609
- Cederholm, H.M., Iyer-Pascuzzi, A.S., Benfey, P.N., 2012. Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 675–691. doi:10.1002/wdev.49
- Czechowski, T., 2005. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *PLANT Physiol.* 139, 5–17. doi:10.1104/pp.105.063743
- Darwin, C., 1868. *The variation of animals and plants under domestication*. John Murray, Londres.
- Deal, R.B., Henikoff, S., 2011. Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 116–122.
- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A.M., Greb, T., Dean, C., 2008. A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16831–16836.
- Ding, Y., Avramova, Z., Fromm, M., 2011. Two Distinct Roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at Promoters and within Transcribed Regions of ATX1-Regulated Genes. *Plant Cell* 23, 350–363. doi:10.1105/tpc.110.080150
- Ding, Y., Ndamukong, I., Xu, Z., Lapko, H., Fromm, M., Avramova, Z., 2012. ATX1-Generated H3K4me3 Is Required for Efficient Elongation of Transcription, Not Initiation, at ATX1-Regulated Genes. *PLoS Genet.* 8, e1003111. doi:10.1371/journal.pgen.1003111
- Doyle, M.R., Amasino, R.M., 2009. A Single Amino Acid Change in the Enhancer of Zeste Ortholog CURLY LEAF Results in Vernalization-Independent, Rapid Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 1688–1697. doi:10.1104/pp.109.145581
- Du, Z., Li, H., Wei, Q., Zhao, X., Wang, C., Zhu, Q., Yi, X., Xu, W., Liu, X.S., Jin, W., Su, Z., 2013. Genome-Wide Analysis of Histone Modifications: H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, and H3K27ac in *Oryza sativa* L. Japonica. *Mol. Plant* 6, 1463–1472. doi:10.1093/mp/sst018
- Fonseca Salazar, G.S., 2011. Caracterización funcional de AGL17 en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Fransz, P.F., de Jong, J.H., 2002. Chromatin dynamics in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 560–567.
- Fromm, M., Avramova, Z., 2014. ATX1/AtCOMPASS and the H3K4me3 marks: how do they activate *Arabidopsis* genes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 75–82. doi:10.1016/j.pbi.2014.07.004
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., Forde, B.G., 2005. Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222, 730–742. doi:10.1007/s00425-005-0020-3
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A.S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Corvera-Poiré, A., Jaimes-Miranda, F., Pacheco-Escobedo, M.A., others, 2013. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J.* 32, 2884–2895.

- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., Coupland, G., 1997. A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386, 44–51. doi:10.1038/386044a0
- Grimaud, C., Nègre, N., Cavalli, G., 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* 14, 363–375. doi:10.1007/s10577-006-1069-y
- Gu, X., Xu, T., He, Y., 2014. A Histone H3 Lysine-27 Methyltransferase Complex Represses Lateral Root Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 7, 977–988. doi:10.1093/mp/ssu035
- Haig, D., 2004. The (dual) origin of epigenetics, in: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 67–70.
- Hall, B.K., 1992. *Evolutionary Developmental Biology*. Chapman & Hall, Londres.
- Hehenberger, E., Kradolfer, D., Kohler, C., 2012. Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development* 139, 2031–2039. doi:10.1242/dev.077057
- Heo, J.B., Lee, Y.-S., Sung, S., 2013. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs in plants. *Chromosome Res.* 21, 685–693. doi:10.1007/s10577-013-9392-6
- Ho, D.H., 2014. Historical Perspective of Transgenerational Epigenetics, in: *Transgenerational Epigenetics*. Elsevier, pp. 17–23.
- Holliday, R., 1994. Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15, 453–457.
- Holoch, D., Moazed, D., 2015. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 16, 71–84. doi:10.1038/nrg3863
- Huisinga, K.L., Brower-Toland, B., Elgin, S.C.R., 2006. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115, 110–122. doi:10.1007/s00412-006-0052-x
- Ivanov, V.B., Dubrovsky, J.G., 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18, 237–243. doi:10.1016/j.tplants.2012.10.002
- Jablonka, E., Lamb, M.J., 2002. The changing concept of epigenetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 981, 82–96.
- Jablonka, E., Raz, G., 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 84, 131–176.
- Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Michaels, S.D., 2009. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 763–768. doi:10.1038/nsmb.1611
- Jiang, D., Kong, N.C., Gu, X., Li, Z., He, Y., 2011. *Arabidopsis* COMPASS-Like Complexes Mediate Histone H3 Lysine-4 Trimethylation to Control Floral Transition and Plant Development. *PLoS Genet.* 7, e1001330. doi:10.1371/journal.pgen.1001330
- Johnston, A.J., Meier, P., Gheyselinck, J., Wuest, S.E., Federer, M., Schlagenhauf, E., Becker, J.D., Grossniklaus, U., 2007. Genetic subtraction profiling identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte. *Genome Biol* 8, R204.
- Jones, A.L., Sung, S., 2014. Mechanisms Underlying Epigenetic Regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Integr. Comp. Biol.* 54, 61–67. doi:10.1093/icb/icu030
- Kim, D.-H., Sung, S., 2014. Polycomb-Mediated Gene Silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cells* 37, 841–850. doi:10.14348/molcells.2014.0249

- Köhler, C., Aichinger, E., 2010. Antagonizing Polycomb group-mediated gene repression by chromatin remodelers. *Epigenetics* 5, 20–23.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
- Kuhn, T.S., 1971. La estructura de las revoluciones científicas. Fondo de Cultura Económica.
- Lauria, M., Rossi, V., 2011. Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1809, 369–378. doi:10.1016/j.bbagr.2011.03.002
- Liu, X., Kim, Y.J., Muller, R., Yumul, R.E., Liu, C., Pan, Y., Cao, X., Goodrich, J., Chen, X., 2011. AG-AMOUS Terminates Floral Stem Cell Maintenance in Arabidopsis by Directly Repressing WUS-CHEL through Recruitment of Polycomb Group Proteins. *Plant Cell* 23, 3654–3670. doi:10.1105/tpc.111.091538
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260. doi:10.1038/38444
- Makarevich, G., Leroy, O., Akinci, U., Schubert, D., Clarenz, O., Goodrich, J., Grossniklaus, U., Köhler, C., 2006. Different Polycomb group complexes regulate common target genes in Arabidopsis. *EMBO Rep.* 7, 947–952. doi:10.1038/sj.embor.7400760
- Mayr, E., 1980. *The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the Unification of Biology*. Harvard University Press, Cambridge.
- Monfared, M.M., Carles, C.C., Rossignol, P., Pires, H.R., Fletcher, J.C., 2013. The ULT1 and ULT2 trxG Genes Play Overlapping Roles in Arabidopsis Development and Gene Regulation. *Mol. Plant* 6, 1564–1579. doi:10.1093/mp/sst041
- Napsucialy-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S., Dubrovsky, J.G., 2014. ARABIDOPSIS HOMOLOG of TRITHORAX1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J. Exp. Bot.* 65, 6373–6384. doi:10.1093/jxb/eru355
- Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Fischer, R.L., 1999. Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 11, 407–415.
- Petrone, E., 2015. Función del gen ATX1 en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis thaliana. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Pfluger, J., Wagner, D., 2007. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 645–652. doi:10.1016/j.pbi.2007.07.013
- Pien, S., Fleury, D., Mylne, J.S., Crevillen, P., Inze, D., Avramova, Z., Dean, C., Grossniklaus, U., 2008. ARABIDOPSIS TRITHORAX1 Dynamically Regulates FLOWERING LOCUS C Activation via Histone 3 Lysine 4 Trimethylation. *PLANT CELL ONLINE* 20, 580–588. doi:10.1105/tpc.108.058172
- Pien, S., Grossniklaus, U., 2007. Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1769, 375–382. doi:10.1016/j.bbaexp.2007.01.010
- Pigliucci, M., 2009. An Extended Synthesis for Evolutionary Biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1168, 218–228. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04578.x
- Pu, L., Sung, Z.R., 2015. PcG and trxG in plants – friends or foes. *Trends Genet.* 31, 252–262. doi:10.1016/j.tig.2015.03.004
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Reyes, J.C., 2014. The Many Faces of Plant SWI/SNF Complex. *Mol. Plant* 7, 454–458. doi:10.1093/mp/ss1147
- Rozsak, P., Kohler, C., 2011. Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20826–20831. doi:10.1073/pnas.1117111108
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., Riggs, A.D., 1996. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Nueva York.
- Saleh, A., Al-Abdallat, A., Ndamukong, I., Alvarez-Venegas, R., Avramova, Z., 2007. The Arabidopsis homologs of trithorax (ATX1) and enhancer of zeste (CLF) establish “bivalent chromatin marks” at the silent AGAMOUS locus. *Nucleic Acids Res.* 35, 6290–6296. doi:10.1093/nar/gkm464
- Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., Yilmaz, M., Le, O., Hou, G., Sadler, M., Al-Abdallat, A., Xia, Y., Lu, G., Ladunga, I., Avramova, Z., 2008. The Highly Similar Arabidopsis Homologs of Trithorax ATX1 and ATX2 Encode Proteins with Divergent Biochemical Functions. *PLANT CELL ONLINE* 20, 568–579. doi:10.1105/tpc.107.056614
- Sanchez, M. de la P., Aceves-García, P., Petrone, E., Steckenborn, S., Vega-León, R., Álvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., 2015. The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytol.* n/a–n/a. doi:10.1111/nph.13486
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., Cavalli, G., 2007. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* 128, 735–745. doi:10.1016/j.cell.2007.02.009
- Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N., Cavalli, G., 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 799–814. doi:10.1038/nrm3230
- Sequeira-Mendes, J., Araguez, I., Peiro, R., Mendez-Giraldez, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U., Gutierrez, C., 2014. The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *Plant Cell* 26, 2351–2366. doi:10.1105/tpc.114.124578
- Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Angenent, G.C., Kaufmann, K., 2012. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139, 3081–3098. doi:10.1242/dev.074674
- Song, J., Angel, A., Howard, M., Dean, C., 2012. Vernalization - a cold-induced epigenetic switch. *J. Cell Sci.* 125, 3723–3731. doi:10.1242/jcs.084764
- Tang, X., Lim, M.-H., Pelletier, J., Tang, M., Nguyen, V., Keller, W.A., Tsang, E.W.T., Wang, A., Rothstein, S.J., Harada, J.J., Cui, Y., 2012. Synergistic repression of the embryonic programme by SET DOMAIN GROUP 8 and EMBRYONIC FLOWER 2 in Arabidopsis seedlings. *J. Exp. Bot.* 63, 1391–1404. doi:10.1093/jxb/err383
- Tapia-Lopez, R., Garcia-Ponce, B., Dubrovsky, J.G., Garay-Arroyo, A., Perez-Ruiz, R.V., Kim, S.-H., Acevedo, F., Pelaz, S., Alvarez-Buylla, E.R., 2008. An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* 146, 1182–1192. doi:10.1104/pp.107.108647
- Thermo Scientific, 2012. PCR and qPCR product guide.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.

- Vanyushin, B.F., Ashapkin, V.V., 2011. DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1809, 360–368. doi:10.1016/j.bbagr.2011.04.006
- Willemsen, V., Wolkenfelt, H., Vrieze, G. de, Weisbeek, P., Scheres, B., 1998. The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo. *Development* 125, 521–531.
- Wu, M.-F., Sang, Y., Bezhani, S., Yamaguchi, N., Han, S.-K., Li, Z., Su, Y., Slewinski, T.L., Wagner, D., 2012. SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3576–3581. doi:10.1073/pnas.1113409109
- Xiao, J., Wagner, D., 2015. Polycomb repression in the regulation of growth and development in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 23, 15–24. doi:10.1016/j.pbi.2014.10.003
- Xu, L., Zhao, Z., Dong, A., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., Steinmetz, A., Shen, W.-H., 2008. Di- and Tri- but Not Monomethylation on Histone H3 Lysine 36 Marks Active Transcription of Genes Involved in Flowering Time Regulation and Other Processes in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1348–1360. doi:10.1128/MCB.01607-07
- Yang, C., Bratzel, F., Hohmann, N., Koch, M., Turck, F., Calonje, M., 2013. VAL- and AtBMI1-Mediated H2Aub Initiate the Switch from Embryonic to Postgerminative Growth in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23, 1324–1329. doi:10.1016/j.cub.2013.05.050
- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., Li, B., 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 21, 564–578.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall.
- Zhang, M., Kimatu, J.N., Xu, K., Liu, B., 2010. DNA cytosine methylation in plant development. *J. Genet. Genomics* 37, 1–12. doi:10.1016/S1673-8527(09)60020-5
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.-L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Ecker, J.R., 2006. Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell* 126, 1189–1201. doi:10.1016/j.cell.2006.08.003
- Zhao, S., Fernald, R.D., 2005. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Comput. Biol.* 12, 1047–1064. doi:10.1089/cmb.2005.12.1047
- Zhao, W., Shafiq, S., Berr, A., Shen, W.-H., 2015. Genome-wide gene expression profiling to investigate molecular phenotypes of Arabidopsis mutants deprived in distinct histone methyltransferases and demethylases. *Genomics Data* 4, 143–145. doi:10.1016/j.gdata.2015.04.006

10. Anexos

Tabla A1. Función de los miembros de los grupos PcG y TrxG (Modificado de Sanchez et al., 2015)

PcG		TrxG	
Proteína	Función	Proteína	Función
MEA	H3K4 metiltransferasa miembro del complejo FIS-PRC2	ATX1	H3K4 metiltransferasa
CLF	H3K4 metiltransferasa miembro de los complejo VRN-PRC2 y EMF-PRC2	ATX2	H3K4 metiltransferasa
SWN	H3K4 metiltransferasa miembro de los complejo FIS-PRC2, VRN-PRC2 y EMF-PRC2	ATXR3/SDG2	H3K4 metiltransferasa
EMF2	Componente del complejo EMF-PRC2	ATXR7/SDG25	H3K4 metiltransferasa
FIE	Componente de los complejo FIS-PRC2, VRN-PRC2 y EMF-PRC2	ASHH2/SDG8	H3K36 metiltransferasa
FIS2	Componente del complejo FIS-PRC2	ASHH1/SDG26	H3K36 y H3K4 metiltransferasa
MSI-1	Componente de los complejo FIS-PRC2, VRN-PRC2 y EMF-PRC2	ULT1	Co-activador de TrxG por la regulación de la deposición de marcas de histonas
VIN3	Componente del complejo VRN-PRC2	ULT2	Co-activador de TrxG por la regulación de la deposición de marcas de histonas
VRN1	Componente del complejo VRN-PRC2	ASH2R	Componente del complejo COMPASS-like
VRN2	Componente del complejo VRN-PRC2	WDR5a	Componente del complejo COMPASS-like
VRN5	Componente del complejo VRN-PRC2	WDR5b	Homólogo a WDR5a
LHP1	Miembro putativo del complejo PRC1	RBL	Componente del complejo COMPASS-like
EMF1	Miembro putativo del complejo PRC1	SYD	Remodelador de la cromatina con función de ATPasa
AtRING1A	Miembro putativo del complejo PRC1 con actividad H2A ubiquitin-ligasa	BRM	Remodelador de la cromatina con función de ATPasa
AtRING1B	Miembro putativo del complejo PRC1 con actividad H2A ubiquitin-ligasa	PKL	Remodelador de la cromatina con función de ATPasa
AtBMI1A	Miembro putativo del complejo PRC1 con actividad H2A ubiquitin-ligasa		
AtBMI1B	Miembro putativo del complejo PRC1 con actividad H2A ubiquitin-ligasa		

Tabla A2. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la genotipificación de la doble mutante *atx1-clf* por PCR de punto final.

Línea mutante	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones por ciclo*
<i>atx1-3</i>	ATX1-F1	CGGACAGGTATGCAGCTACTG	Endógeno 94°C 30" 55°C 30" 72°C 45" 35 ciclos
	ATX1-R1	CAGCTATTGACGGTCTAACAAG	
	T-DNA/SALK LBC1	GGAACAACACTCAACCCTATCTCGG	T-DNA 94°C 30" 55°C 30" 72°C 30" 35 ciclos
	ATX1-R1	CAGCTATTGACGGTCTAACAAG	
<i>clf-29</i>	CLF-TDNAF	ATGGCGTCAGAAGCTTCGC	Endógeno 94°C 30" 55°C 30" 72°C 1' 35 ciclos
	CLF-TDANR	GTCCTGGCGGAACTAGCAAGT	
	T-DNA/SALK LBC1	GGAACAACACTCAACCCTATCTCGG	T-DNA 94°C 30" 55°C 30" 72°C 1' 35 ciclos
	CLF-TDNAR	GTCCTGGCGGAACTAGCAAGT	

*Todas las condiciones incluyeron una fase de desnaturalización inicial (4' a 94°C) y una fase de extensión final (7' a 72°C)

Tabla A3. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para el análisis de expresión por PCR semicuantitativa.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones por ciclo*
ATX1	MP-ATX1pcr-F	GGCGGGAGATATGATGATTGAA	94°C 30" 58°C 30"
	MP-ATX1pcr-R	TCTTCCCATTTAGGGATATGCC	72°C 30" 35 ciclos
CLF	CLF-PCq F	AACCAAGTGAGGAGAAGGTCAA	94°C 30" 58°C 30"
	CLF-PCq R	TACTGCGTTGCCCAAAGAG	72°C 30" 35 ciclos
XAL1/AGL12	Agl12rt-F	TGGTCGTGGTTCTTCTTCTGCTAC	94°C 30" 58°C 30"
	Agl12rt-R	TGTCTCCATGACTGOGAAGTTAGC	72°C 45" 30-35 ciclos
XAL2/AGL14	Agl14-F458	GTAGAAAGATATCAAAAGCGAA	94°C 30" 58°C 30"
	Agl14-R458	GGAGGAAACTTTTTGAAGTGT	72°C 45" 30-35 ciclos
AGL17	OEAB154	CTACTATTGAACGATTCAATACGGCT	94°C 30" 66°C 30"
	OEAB157	CTTTGGTTTGCTCTCCGACATG	72°C 1'30" 35-37 ciclos
ALG19	Agl19 F 430	GAGACGAAACATCTGGATTG	94°C 30" 52°C 30"
	Agl19 R North	TTGAGAAGTTGAAGGCAGA	72°C 40" 35-37 ciclos
TUB2	TUB FOR	AGGACTCTCAAACACTCACTACC	94°C 30" 58°C 30"
	TUB REV	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	72°C 45" 30-35ciclos

*Todas las condiciones incluyeron una fase de desnaturalización inicial (4' a 94°C) y una fase de extensión final (7' a 72°C)

Tabla A4. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para el análisis de expresión por PCR cuantitativa.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
ATX1	ATX1-3' _RV_qF	ATTCATGTGTGCCCAATTGCT
	ATX1-3' _RV_qR	AGTCATAGGTCAGCTCTTCC
CLF	CLF-JCFS-qF2	ATTATTCGCATGACCCTTGAG
	CLF-JCFS-qR2	CATGTCTTGCCCTTGATTTAC
XAL1/AGL12	AGL12-JCFS-qF2	TCAAGAACAACCTTCAACCACCA
	AGL12-JCFS-qR2	CCTCCAAACATATAGCTTATCCCT
XAL2/AGL14	AGL14TR-F2	GATAATTCACAGCAATCGAAGG
	AGL14TR-R2	GGTTCTCCAATTGTTGTAAGTC
AGL17	AGL17-JCFS-qF2	AAATTATOGGCAACTAACGGGA
	AGL17-JCFS-qR2	GTAACCTCTTAACGCTCAAACCA
ALG19	AGL19_AGR_qF	CCAAGAAGTACCAATTACTCCGTG
	AGL19_AGR_qR	CCCATTCCAAGCCACTTCTC
PDF2	PDF2-F1_TR_RC	TAACGTGGCCAAAATGATGC
	PDF2-R1_TR_RC	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
RNAH	RNAH_Y_qF	CCATTCTACTTTTTGGGGCT
	RNAH_Y_qR	TCAATGGTAACTGATCCACTCTGATG
UPL7	UPL7-F1_TR_RC	TTCAAATACTTGCAGCCAACCTT
	UPL7-R1_TR_RC	CCCAAAGAGAGGTATCACAAGAGACT

Tabla A5. Eficiencias obtenidas con el software Real-time PCR Miner para cada par de oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR cuantitativa.

Nombre del gen	Par de oligonucleótidos	Eficiencia
ATX1	ATX1-3'_RV_qF ATX1-3'_RV_qR	0.883
CLF	CLF-JCFS-qF2 CLF-JCFS-qR2	0.885
XAL1/AGL12	AGL12-JCFS-qF2 AGL12-JCFS-qR2	0.899
XAL2/AGL14	AGL14TR-F2 AGL14TR-R2	0.866
AGL17	AGL17-JCFS-qF2 AGL17-JCFS-qR2	0.876
ALG19	AGL19_AGR_qF AGL19_AGR_qR	0.874
PDF2	PDF2-F1_TR_RC PDF2-R1_TR_RC	0.876
RNAH	RNAH_Y_qF RNAH_Y_qR	0.880
UPL7	UPL7-F1_TR_RC UPL7-R1_TR_RC	0.873

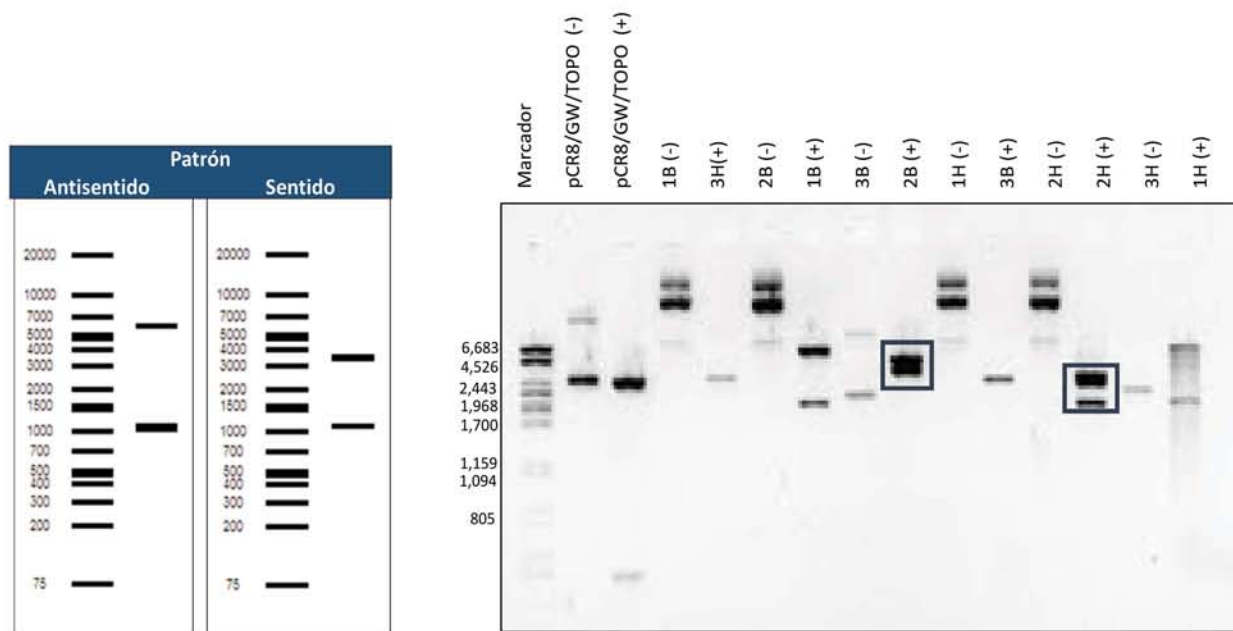


Figura A1. Digestión enzimática con XbaI. El panel izquierdo indica el patrón esperado en caso de una inserción en sentido o en antisentido. En el panel derecho se indica con recuadros azules las clonas con los patrones de digestión similares a los esperados en sentido.

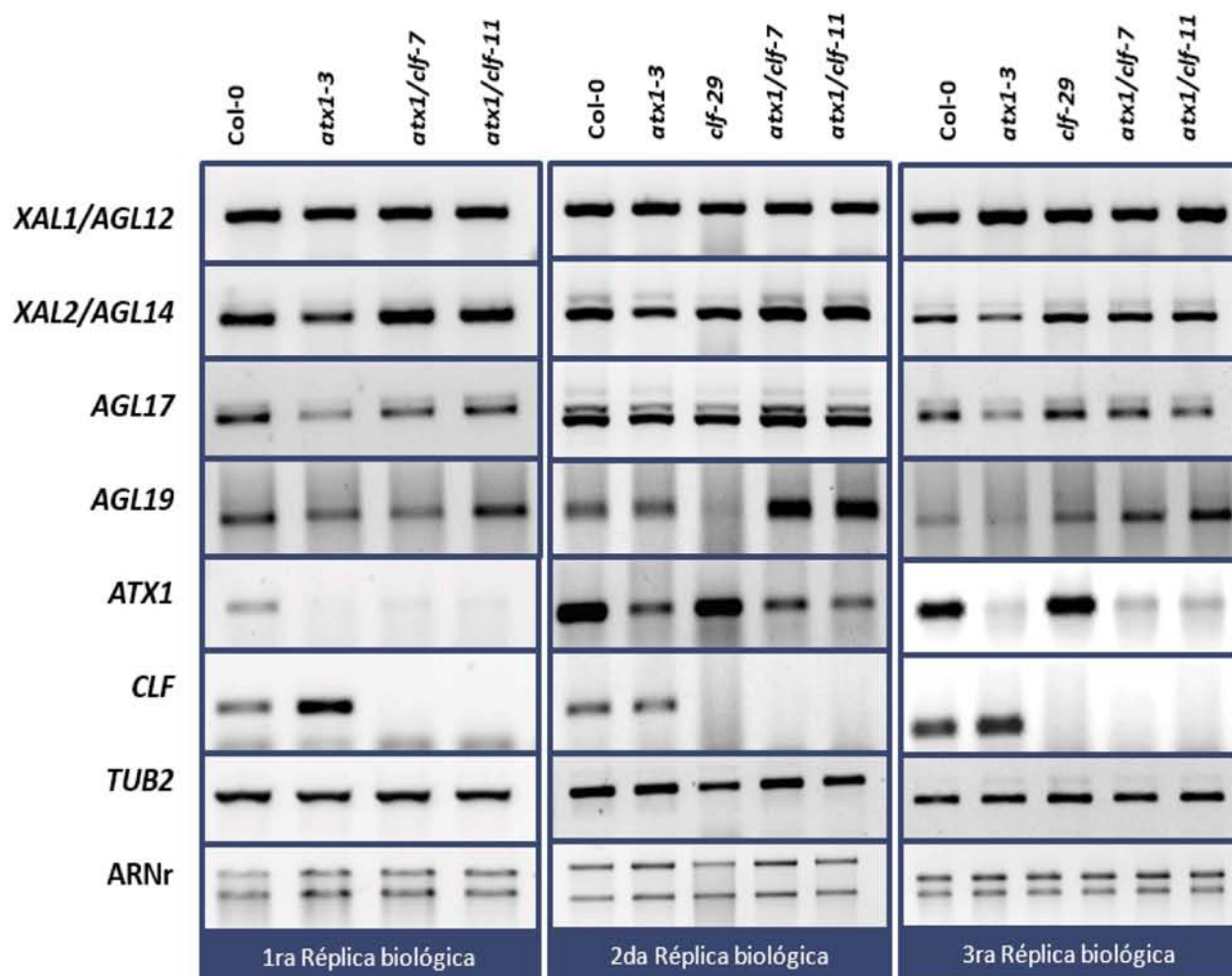


Figura A2. PCR semicuantitativa de tres réplicas biológicas. Como calibradores se muestran Tubulina (*TUB2*) y ARN ribosomales (ARNr).

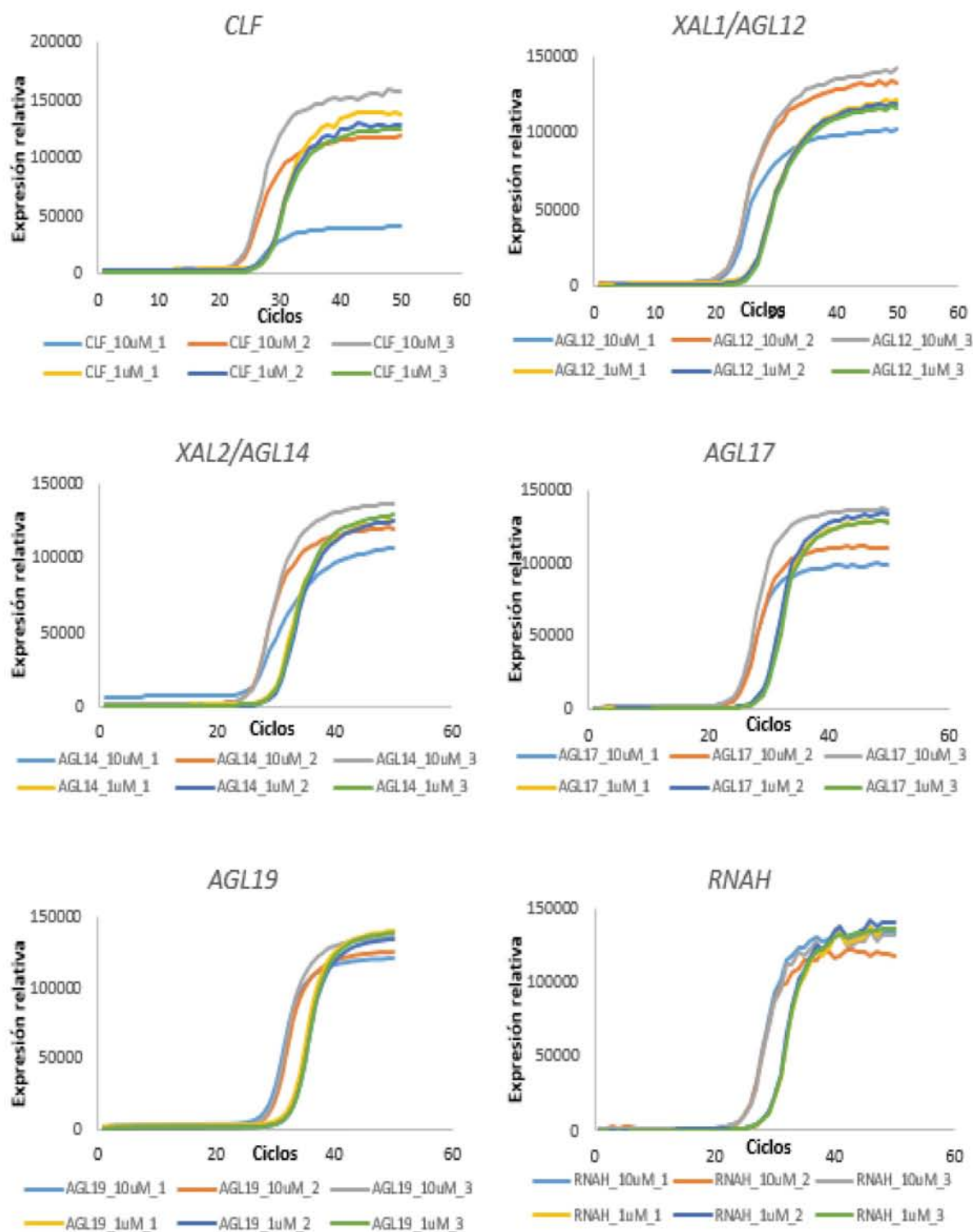
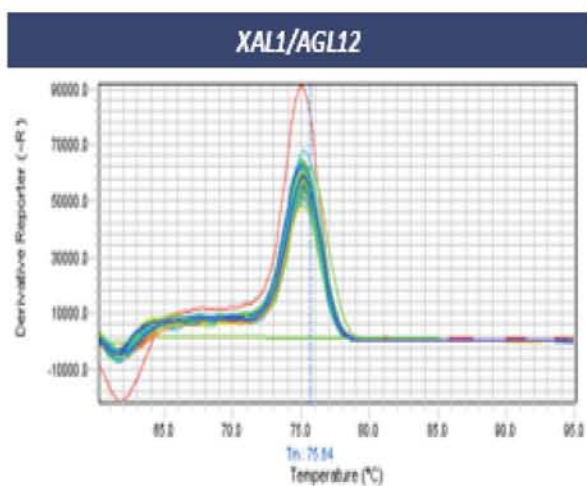
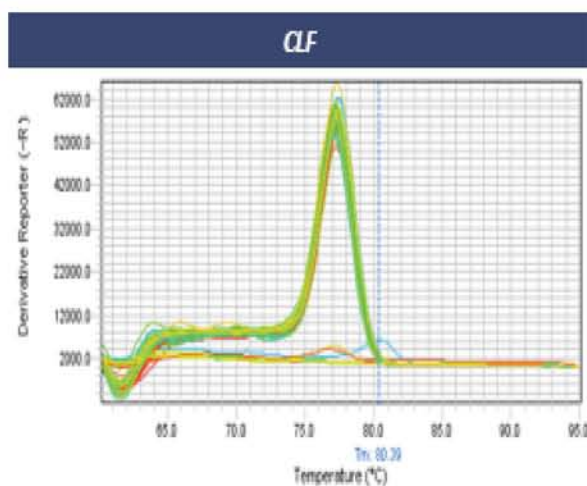
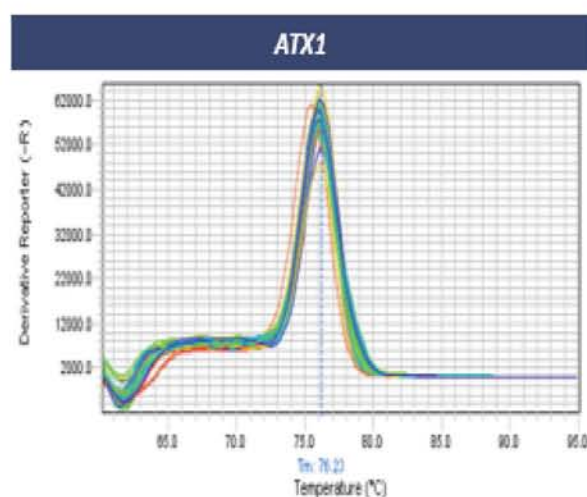
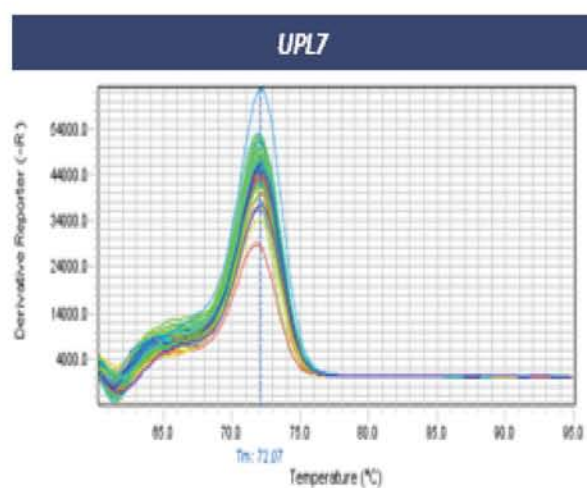
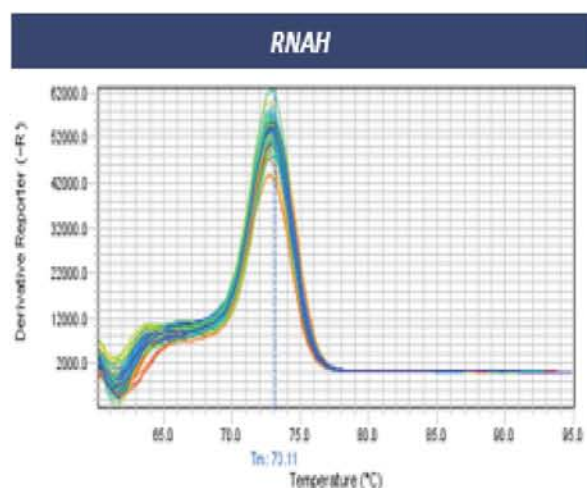
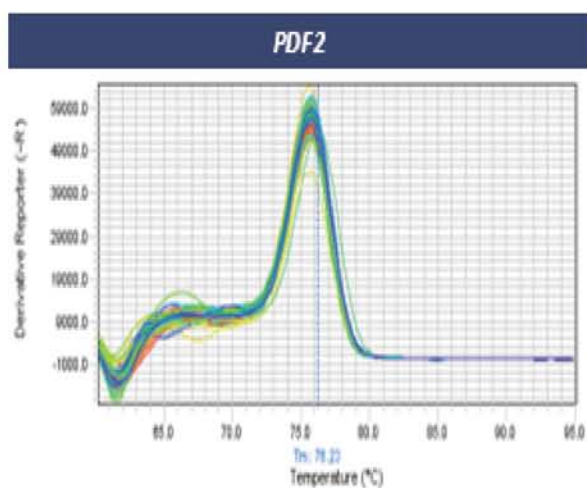


Figura A3. Curvas de amplificación entre dos concentraciones de templado (1 ng y 10 ng). Las pruebas de los oligonucleótidos faltantes no se presentan dado que ya han sido probados con anterioridad



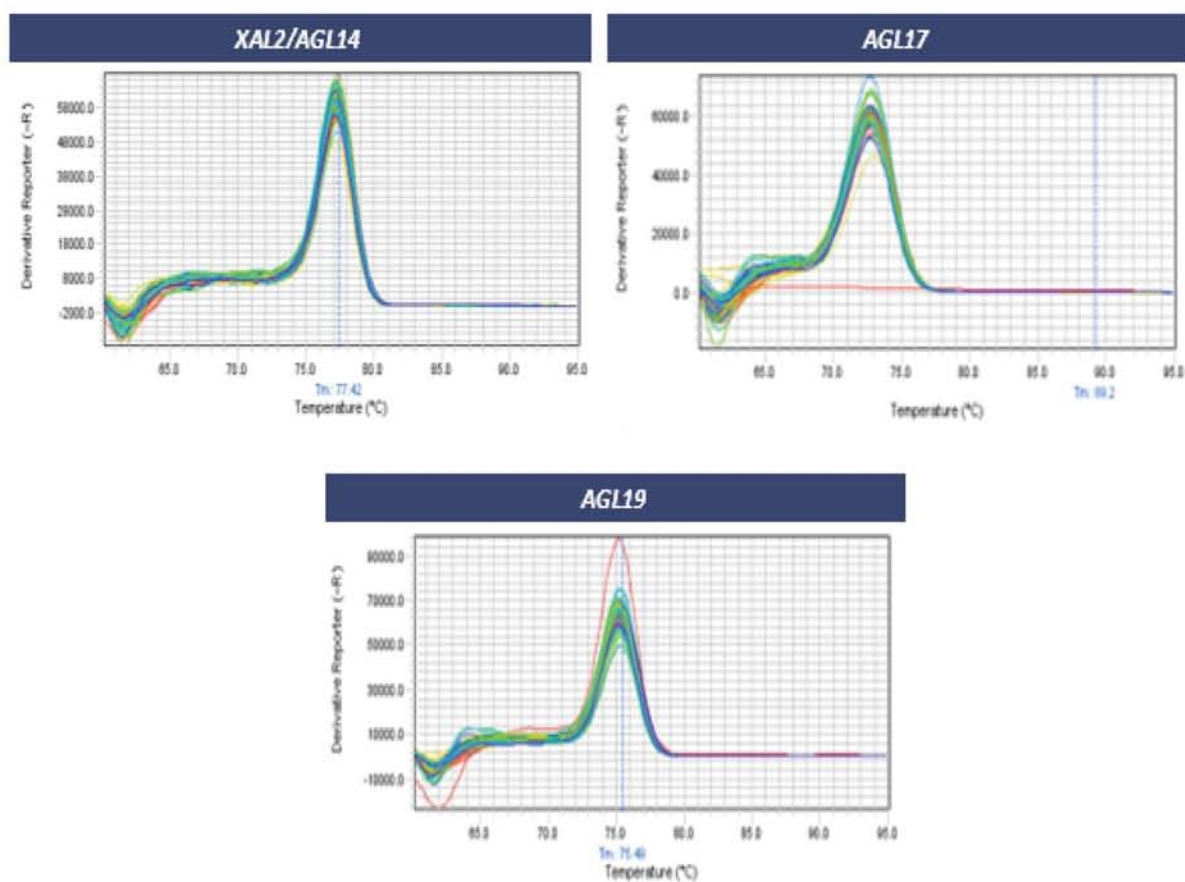
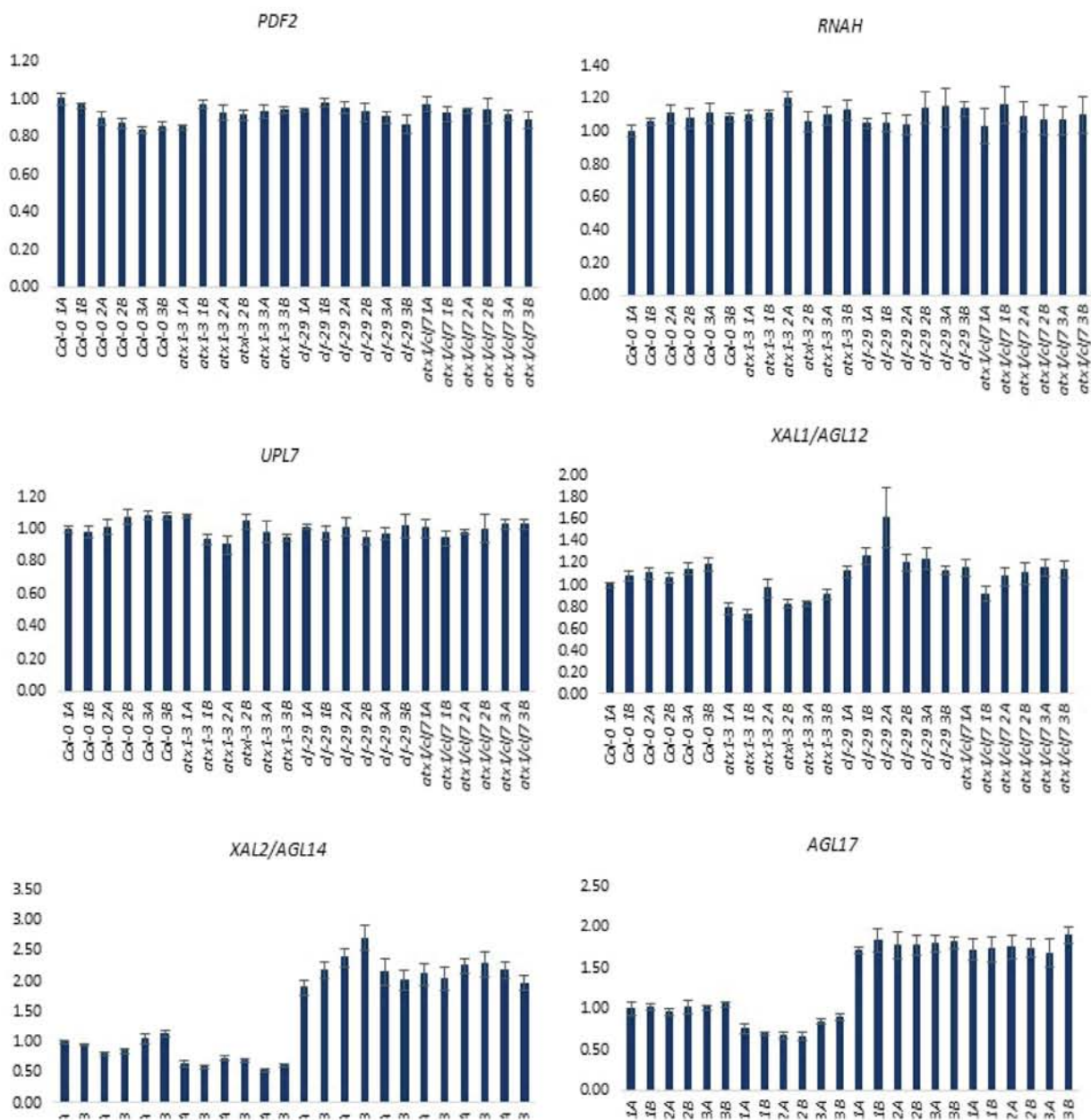


Figura A4. Curvas de *melting* obtenidas para cada gen analizado por PCR cuantitativa. En algunos casos se incluye la curva de *melting* del control negativo (*CLF*, *XAL1/AGL12* y *AGL17*).



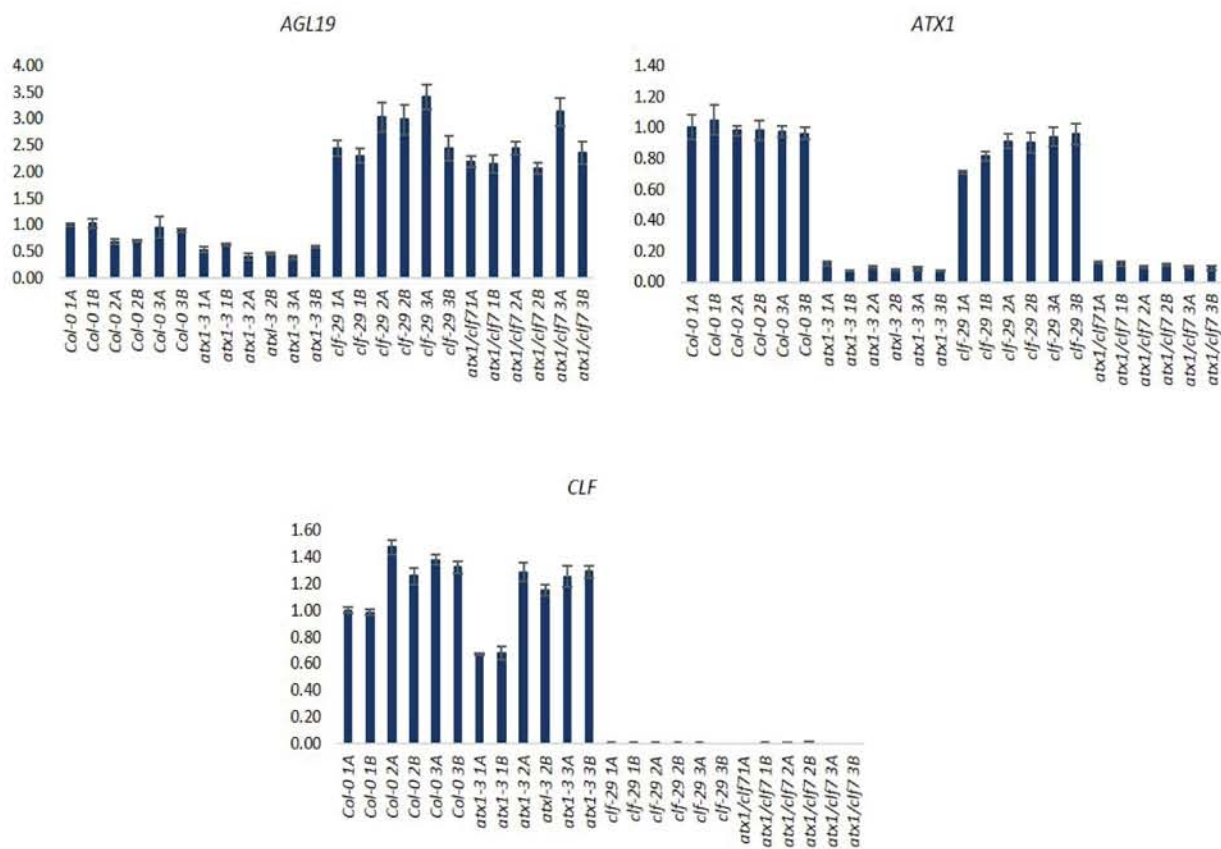


Figura A5. Expresión relativa de cada réplica medida en los ensayos de PCR cuantitativa.

Alignment of Sequence_1: [CLFg- SECUENCIACION 3.xdna] with Sequence_2: [CLFg+Primers.xdna]

Similarity : 5090/5341 (95.30 %)

```

Seq_1  1      CTCAGAGTTTTCCGATGCGCGTACTGTTTCTCGTCCGATGAGATTACAGAGAGACTTCGA 60
      |||
Seq_2  1      ctccagagttttccgatcgccgtactgtttctcgtccgatgagattacagagagacttcga 60

Seq_1  61      AAAGCTGTTGCTGAAAAAAAAAACAATAAAGCCCAACAATAGGGTTAAGAGC 120
      |||
Seq_2  61      aaagctgttgctgaaaaaaaaa-caaaaaataagcccaacaatagggtttaagagc 119

Seq_1  121     CCATTAATCAGAGCCAGCAACGTTCTGTTGTTTGTTCAGTTGATATAGAACCAGT 180
      |||
Seq_2  120     ccattaatcagagccagcaacgttctgttgtttgtttcagttgatatagaaccagt 179

Seq_1  181     CTGAACTCTAGTAGATTCTGTTGCTCGAGCTACGTTGATATCCGGTAAACCGTCCGCGG 240
      |||
Seq_2  180     ctgaaactctagtagattctgttctcgtcagctacgtgatattccggtaaacctgcccgg 239

Seq_1  241     AGATGTACAGTAGATAATTCAAATCGAGCTGCCAGGTCGCTATTTCCCAACCACTTTT 300
      |||
Seq_2  240     agatgtacagtagataattcaaatcgagctgccagtcgctatttcccaccaacttttt 299

Seq_1  301     TTTTTI-AAATAATTGGAAAAAGTTTCTAATTACACGCTTCCCAATTCGTAAACAAATGT 359
      |||
Seq_2  300     ttttttaataaattggaaaaagtttctaatttacacgcttcccaattcgtaaacaatgt 359

Seq_1  360     TCTTTAAAAGTAAAAAGAAATTTTTTTGGATTGAGGATAAAGATCCAAAATAAAAAC 419
      |||
Seq_2  360     tctttaaaagtaaaacgaaatTTTTTTGGATTGAGGATAAAGATCCAAAATAAAAAC 419

Seq_1  420     AAAATTGAAGATAAATTTTTAGGGTTTATAACGACCCGCAAAATTCCTTCTCTCTCCAA 479
      |||
Seq_2  420     aaaattgaagataaatttttagggtttataacgacccgcaaaattccttctctctccaa 479

Seq_1  480     CATTTCAGATTTCCGACCCGGATCTTAACCCGGACCCGCAATTTGTTTCGGTTCCGATCT 539
      |||
Seq_2  480     catttcagatTTCCGACCCGGATCTTAACCCGGACCCGCAATTTGTTTCGGTTCCGATCT 539

Seq_1  540     GGTTTCTTGACAATGGGTCAGAGCTTCGCCTTCTTCTTCGGCCACCAGATCGGAGCCA 599
      |||
Seq_2  540     ggtttcttgacaATGGGTCAGAGCTTCGCCTTCTTCTTCGGCCACCAGATCGGAGCCA 599

Seq_1  600     CCCAAGACTCTCCGGTGCCTCAATCGTTTTTTTTTTT---CTTACTTTCTAAAAATGGA 657
      |||
Seq_2  600     CCCAAGACTCTCCGGTgcgctcaatcgTTTTTTTTTTTcttactttctaaaaatgga 659

Seq_1  658     ACTTTTTTCTTTGTCIATTGAGGCATTGACTTTGATTTGCTTTAGTTTGAGTGAAGAGA 717
      |||
Seq_2  660     actTTTTTctttgtctattgaggcattgactttgatttgcttttagtttgagtgaagaga 719
    
```

```

Seq_1 718 ACGAAACTCGATGGCTTGTTTGAGCTTCTCTATATGCTCGTTTTAGATCTAGAGATTGC 777
          |||
Seq_2 720 acgaaactcgatggcttgtttgagcttctctatatgctcgTTTTtagatctagagattgc 779

Seq_1 778 TGGATTGTGAGATATGAAGTTGTTTTGGGTTGTTTTAGGAACCATTTTTGCTGCAATTG 837
          |||
Seq_2 780 tggattgtgagatataaagttgTTTTGGGttgTTTTaggaaccatttttgcTgcaattg 839

Seq_1 838 ATAGTTTCTCTCATTGAACACTGTGTAAGGAACCTCATTGATGTTTCAGGCGGAGGA 897
          |||
Seq_2 840 atagtttctctcattgaacactgtgtaaggaacctcattttgatgTttcagGCGGAGGA 899

Seq_1 898 GAGAGGTCAGCTTCTAAGGAAGTATCAGAAGTAATAGGATCGCTAAGAGGAAGCTTGC 957
          |||
Seq_2 900 GAGAGGTCAGCTTCTAAGGAAGTATCAGAAGTAATAGAATCGCTAAGAGGAAGCTTGC 959

Seq_1 958 AGCTGATAGGTGATATCAATAAAGTTGCTATTTTTGTTAGTTTTTTTT-GTATGTT 1016
          |||
Seq_2 960 AGCTGATAGGTGATATCAATAAAGgttgotatttttgTtagttttttttgtatgTt 1019

Seq_1 1017 TTATGTGTTTCTGAATCTGATTGTTAGAAATGATGTGTTTGAACCAGAAAAGGATTGA 1076
          |||
Seq_2 1020 ttatgtgtttctgaatctgattgTtagaaattgatgtgtttgaaccagAAAAGGATTGA 1079

Seq_1 1077 TGAAAACAGAAGAATTTGTTTGCTATTACTCAAAGTTTTATGAGGTCTTCTATGGAACG 1136
          |||
Seq_2 1080 TGAAAACAGAAGAATTTGTTTGCTATTACTCAAAGTTTTATGAGGTCTTCTATGGAACG 1139

Seq_1 1137 AGGAGGTAGCTGTAAAGATGGCAGTGATCTTTTAGTTAAGAGGCCAAGAGATTCGCCAGG 1196
          |||
Seq_2 1140 AGGAGGTAGCTGTAAAGATGGCAGTGATCTTTTAGTTAAGAGGCCAAGAGATTCGCCAGG 1199

Seq_1 1197 TATGAAAAGCGGAATCGATGAAAGTAATAACAACAGATATGTAGAAGATGGACCTGCCAG 1256
          |||
Seq_2 1200 TATGAAAAGCGGAATCGATGAAAGTAATAACAACAGATATGTAGAAGATGGACCTGCCAG 1259

Seq_1 1257 TTCAGGAATGGTTC AAGGATCTAGTGTCCCTGTCAA AATTCCTTACGTCTATCAA AAT 1316
          |||
Seq_2 1260 TTCAGGAATGGTTC AAGGATCTAGTGTCCCTGTCAA AATTCCTTACGTCTATCAA AAT 1319

Seq_1 1317 GCCTGATATCAAAGTTTTGTACCTTATACCACATGGGTTTTCTGGACAGGTATGTTGA 1376
          |||
Seq_2 1320 GCCTGATATCAAAGTTTTGTACCTTATACCACATGGGTTTTCTGGACAGgtatgTtga 1379

Seq_1 1377 CATTAAATGTCGAAGACTTGA AAAATTC AAGTTGAAATGTAAGCCCTCGCATAGT 1436
          |||
Seq_2 1380 cattaatgtcgcaagacttga AAAatattcaagttgaaatgtaagccctcgcatagt 1439

Seq_1 1437 ATCTTAACGTTATAATCACTCTTGAAATGATGCAGAAATCAAAGAATGACTGAAGACCAG 1496

```

```

Seq_2 1440  |||
atcttaacggtataatcactcttgaaatgatgcagAAATCAAAGAATGACTGAAGACCAG 1499

Seq_1 1497  TCTGTAGTGGGTCGAAGGAGAATTTATATGATCAAAGTGGGGGGAAGCGCTTATCTGC 1556
Seq_2 1500  TCTGTAGTGGGTCGAAGGAGAATTTATATGATCAAAGTGGGGGGAAGCGCTTATCTGC 1559

Seq_1 1557  AGTGATAGTGAAGAGGAGGCCATTGACGACGAAGAAGAAAAAGAGATTTTTGGAGCCT 1616
Seq_2 1560  AGTGATAGTGAAGAGGAGGCCATTGACGACGAAGAAGAAAAAGAGATTTTTGGAGCCT 1619

Seq_1 1617  GAAGATTATATTATTCGGTTAGTATTAATGGCAGGAGTTAATCATTCTTGCATTTGG 1676
Seq_2 1620  GAAGATTATATTATTCGGttagtattaaatggcaggagttaatcattcttgcatcttgg 1679

Seq_1 1677  TCTCTTAGTGTGAATCTCTTGTCTGCTATGTCAACTGTTATGCTGGTTTGTCTCACTTA 1736
Seq_2 1680  tctcttagtgtgaatctcttgtctgctatgtcaactgttatgctggtttgtctcactta 1739

Seq_1 1737  TATTGTTGGATTAAATTCCTTCGTTTCTTGAGCATGACCCCTGAGCAACTAGGTCTTT 1796
Seq_2 1740  tattgttgattaaattcccttcgtttcttcagCATGACCCCTTGAGCAACTAGGTCTTT 1799

Seq_1 1797  CAGACTCAGTCCCTGGCGGAAGTACGAAGTTTCTTGTCTAGAAGTACTAGTGAATCAAG 1856
Seq_2 1800  CAGACTCAGTCCCTGGCGGAAGTACGAAGTTTCTTGTCTAGAAGTACTAGTGAATCAAGg 1859

Seq_1 1857  TATCAACAACCTTTTTCTGCGCTATTGCTTGTGTGAAGTATCATGTGCIATTTTCTTTA 1916
Seq_2 1860  tatoacaacctttttctctgcctattgcttgtgtgaactatcatgtgctatctttctta 1919

Seq_1 1917  GAATCAAGCACTTCAGTTGTAGGATTTCAAAACAGAGTGAGGGATGCATTGTTAAGGAA 1976
Seq_2 1920  gaatcaagcacttcagttgtaggatttcaaacagagtgaggatgcattgtttaaggaa 1979

Seq_1 1977  ATCCAATTAGTATTGTTCCAGCCCTTTCCCAATTGGCTTTTTGCAGAGATATGAACACCG 2036
Seq_2 1980  atccaattagtattgttccagccctttccaattggctttttgcagagatatgaacaccg 2039

Seq_1 2037  ACCATCTTATACAGGCAAGACATGGAGTGCTTATGAAGGAAAAAGAAGTATCCGAGAGTG 2096
Seq_2 2040  accatcttatacagGCAAGACATGGAGTGCTTATGAAGGAAAAAGAAGTATCCGAGAGTG 2099

Seq_1 2097  GCGATAATCAAGCAGAGAGCTCCCTTCTCAACAAGATATGGAAGGAGCATTAGATTCTT 2156
Seq_2 2100  GCGATAATCAAGCAGAGAGCTCCCTTCTCAACAAGATATGGAAGGAGCATTAGATTCTT 2159

Seq_1 2157  TCGATAACCTGTTCTGCGTAGATGCCTTgttagtccatttgattttctcaggctaatgt 2216
Seq_2 2160  TCGATAACCTGTTCTGCGTAGATGCCTTgttagtccatttgattttctcaggctaatgt 2219

```

```

Seq_1 2217 TTCATGGGTTATTGCTTAATGATCGAGCAAACATTGGTCTCTTTTAACTTTTGTATGCA 2276
      |||
Seq_2 2220 ttcatgggttattgcttaatgatcgagcaaacattggtctcttttaacttttgtatgca 2279

Seq_1 2277 TCTATGCAGGTATTGATTGCCGGCCTCATGGGTGTTACAGGATCTCATTTTCCGGTG 2336
      |||
Seq_2 2280 tctatgcagGTATTGATTGCCGGCTTCATGGGTGTTACAGGATCTCATTTTCCGGtg 2339

Seq_1 2337 AGTTTAGTGCCAAACGAAAAATCTTACTATAACTTTAGTGTACTTATCTAATTTTATG 2396
      |||
Seq_2 2340 agtttagtgccaaaccgaaaaatcttactataactttagtgtacttatctaattttatg 2399

Seq_1 2397 GATTTTAGGCTGAGAAAACAGCTCCATGGTGTCTCCTCTGTAGATGAAAATTTAACCTGT 2456
      |||
Seq_2 2400 gatttttagGCTGAGAAAACAGCTCCATGGTGTCTCCTCTGTAGATGAAAATTTAACCTGT 2459

Seq_1 2457 GGTGCAAACCTGCTATAAAACGGTAAATTTGTTATTTCTCGTGTCTAAGCTCATCTCCTA 2516
      |||
Seq_2 2460 GGTGCAAACCTGCTATAAAACGgtaatttgttattttctcgttgctaagctcatctccta 2519

Seq_1 2517 GAAAGACTGGTTTAAACAAAAGCGTGTGTTTCAATTTATCAGCTTCTCAAGTCTGGAAGA 2576
      |||
Seq_2 2520 gaaagactggtttaacaaaagcgttgttttcaattatcagCTTCTCAAGTCTGGAAGA 2579

Seq_1 2577 TTTCCGGGATATGGCACCATGAAGGTAACCTGGCACITTCATCAGATGGTGCAGGTACT 2636
      |||
Seq_2 2580 TTTCCGGGATATGGCACCATGAAGGTAACCTGGCACITTCATCAGATGGTGCAGGTACT 2639

Seq_1 2637 AAAACCACACCCAOGAAGTCTCCAGCAAACCTTAATGGGAGAAAACCAAAGACCTTCCCA 2696
      |||
Seq_2 2640 AAAACCACACCCACGAAGTCTCCAGCAAACCTTAATGGGAGAAAACCAAAGACCTTCCCA 2699

Seq_1 2697 AGTGAAAGTGCATCGTCTAATGAAAAGTGCGCACTAGAAAACAAGTACTCAGAGAATGGA 2756
      |||
Seq_2 2700 AGTGAAAGTGCATCGTCTAATGAAAAGTGCGCACTAGAAAACAAGTACTCAGAGAATGGA 2759

Seq_1 2757 CTACAGCAGGATACCAATTCOGATAAAGTTTCATCATOGCCAAAGGTGAAAAGGTAGTGGG 2816
      |||
Seq_2 2760 CTACAGCAGGATACCAATTCOGATAAAGTTTCATCATOGCCAAAGGTGAAAAGGTAGTGGG 2819

Seq_1 2817 AGACGAGTAGGTCGTAAAGAGGAACAAAAACCGAGTTGCTGAGCGAGTTCCTCGTAAGACT 2876
      |||
Seq_2 2820 AGACGAGTAGGTCGTAAAGAGGAACAAAAACCGAGTTGCTGAGCGAGTTCCTCGTAAGACT 2879

Seq_1 2877 CAGAAGAGGCAGAAGAAGACAGAAGCCTCCGATAGTGATTCCATCGCCAGTGGAAAGTTGT 2936
      |||
Seq_2 2880 CAGAAGAGGCAGAAGAAGACAGAAGCCTCCGATAGTGATTCCATCGCCAGTGGAAAGTTGT 2939

Seq_1 2937 TCACCCAGCGATGCAAAACATAAAGATAATGAAGATGCTACTTCTCTCAGAAAGCAT 2996
      |||

```

```

Seq_2 2940 TCACCCAGCGATGCAAAACATAAAGATAATGAAGATGCTACTTCTTCTCAGAAGCAT 2999

Seq_1 2997 GTAAAATCTGGGAAGTCCGGGAAGTCAAGGAAGAATGGCACTCCTGCCGAAGTCTCCAAT 3056
|
|
|
Seq_2 3000 GTAAAATCTGGGAAGTCCGGGAAGTCAAGGAAGAATGGCACTCCTGCCGAAGTCTCCAAT 3059

Seq_1 3057 AATTCTGTGAAGGATGACGTTCTCTGTTTGGCCAGTCAAATGAGGTTGCGTCAGAGCTTGAT 3116
|
|
|
Seq_2 3060 AATTCTGTGAAGGATGACGTTCTCTGTTTGGCCAGTCAAATGAGGTTGCGTCAGAGCTTGAT 3119

Seq_1 3117 GCGCCGGGTAGTGATGAAAGTCTAAGGAAAGAAGAGTTTATGGGTGAAACTGTATCTCGA 3176
|
|
|
Seq_2 3120 GCGCCGGGTAGTGATGAAAGTCTAAGGAAAGAAGAGTTTATGGGTGAAACTGTATCTCGA 3179

Seq_1 3177 GGAAGATTGGCTACAAATAAGTTGTGGAGACCCTTGAGAAAAGCCTTTTGTATAAAGGT 3236
|
|
|
Seq_2 3180 GGAAGATTGGCTACAAATAAGTTGTGGAGACCCTTGAGAAAAGCCTTTTGTATAAAGGT 3239

Seq_1 3237 GTTGAGATTTTGGAAATGAATAGGTGGTAAATTTTGATGATTTAGTACTGCTAAATTA 3296
|
|
|
Seq_2 3240 GTTGAGATTTTGGAAATGAATAGGtggtaattttgatgtatttagctactgctaatta 3299

Seq_1 3297 TCATTCTGCTTCAGGTTTTTCAATTTGTGGAAATAGTCAATGGAATCTTTGTTTTCTTT 3356
|
|
|
Seq_2 3300 tcattctgcttcaggTTTTTcaatttgggaatatagtcataatggattccttggtttcttt 3359

Seq_1 3357 GCAGCTGCTTGATTGCTAGAAATCTTTTGGAGTGGTTTCAAATCATGTTGGGAGGCTTCC 3416
|
|
|
Seq_2 3360 gcagCTGCTTGATTGCTAGAAATCTTTTGGAGTGGTTTCAAATCATGTTGGGAGGCTTCC 3419

Seq_1 3417 AATACATGACGTGCTCGGAAAATAAAGCTTCCTTCTTTGGAGGTGATGATGAATCCTG 3476
|
|
|
Seq_2 3420 AATACATGACGTGCTCGGAAAATAAAGCTTCCTTCTTTGGAGGTGATGATGAATCCTG 3479

Seq_1 3477 ATGGCTCTTCCAAGTTGATATCAATGGAAATATGGTATAATTAACAATAAACCTTTTTGA 3536
|
|
|
Seq_2 3480 ATGGCTCTTCCAAGTTGATATCAATGGAAATATGgtatattaacactaacctttttga 3539

Seq_1 3537 CTTTGTTTACAAATCTCTGATAAAATCGATTATTTCTCTTGGATTAAATGCTTTAGTT 3596
|
|
|
Seq_2 3540 ctttgtttacaattcctgataaaatcgatttatttctcttggatttaaatgcttttagtt 3599

Seq_1 3597 TCTGACTAACCGGTTAATAACTAAGTGGGAGAGGTCAGATTTCACGTAGGAGAG 3656
|
|
|
Seq_2 3600 tctggactaacagGTTAATAACCAAGTGGGAGAGGTCAGATTTCACGTAGGAGAG 3659

Seq_1 3657 GCAAAGTGGGGCGCTTGAAGTATACCTGGAAGTCTGCTGCATATCATTCAATTAGGAAA 3716
|
|
|
Seq_2 3660 GCAAAGTGGGGCGCTTGAAGTATACCTGGAAGTCTGCTGCATATCATTCAATTAGGAAA 3719

```



```

Seq_1 3717 GAATTACTGAGAAGAAAGACCAGCCCTGCCGTCAGTTTAAATCCATGTAAGTGC AAAAATG 3776
Seq_2 3720 GAATTACTGAGAAGAAAGACCAGCCCTGCCGTCAGTTTAAATCCATGTAAGTGC AAAAATG 3779

Seq_1 3777 CTTGTGGGAAGGAATGTCCTTGTGTTGCTAAACGGGACTTGCTGCGAGAAGTACTGCGGGT 3836
Seq_2 3780 CTTGTGGGAAGGAATGTCCTTGTGTTGCTAAACGGGACTTGCTGCGAGAAGTACTGCGGGgt 3839

Seq_1 3837 AATGTAATCTATGATTATCCACATCTGTATTTCTTAGCTTTGAATCTCATTACCAACAAA 3896
Seq_2 3840 aatgtaatctatgattatccacatctgtatctttagctttgaatctcattaccaacaaa 3899

Seq_1 3897 CTATATTTTCTGTGTAGTTGCCCAAGAGCTGCAAGAATAGGTTTAGAGGTTGTCATTGT 3956
Seq_2 3900 ctatattttctgtgtagTTGCCCAAGAGCTGCAAGAATAGGTTTAGAGGTTGTCATTGT 3959

Seq_1 3957 GCCAAAAGTCAGTGTGCAAGCCGCCAGTGTCCATGCTTTGCTGCAGATCGGGAATGTGAC 4016
Seq_2 3960 GCCAAAAGTCAGTGTGCAAGCCGCCAGTGTCCATGCTTTGCTGCAGATCGGGAATGTGAC 4019

Seq_1 4017 CCAGATGTTTGTAGAAACTGCTGGGTCATGTAAGTCTTATGGGGATGCAAAATCCATCCT 4076
Seq_2 4020 CCAGATGTTTGTAGAAACTGCTGGGTCATgtaagtcttattggggatgcaaatccatcct 4079

Seq_1 4077 AATTGGTTTCTTAGAAAATGCTCAAGAAATGCAACTTTTTTTTTTAGTAGTCCAGATGCA 4136
Seq_2 4080 aattggtttcttagaaaatgctcaagaaatgcaacttttttttagtagtccagatgca 4139

Seq_1 4137 CTTATACTGTGTCTGAATGAATTTGAATGTGTAGTGGTGGGGATGGTTCGCTTGGGGTCC 4196
Seq_2 4140 cttatactgtgtctgaatgaatttgaatgtgtagTGGTGGGGATGGTTCGCTTGGGGTCC 4199

Seq_1 4197 CAAGCCAAAGAGGCGATAATTATGAGTGCAGGAATATGAAATGCTCCTGAAACAACAAC 4256
Seq_2 4200 CAAGCCAAAGAGGCGATAATTATGAGTGCAGGAATATGAAATGCTCCTGAAACAACAAC 4259

Seq_1 4257 AAAGGGTAAATACTTAGCCTTGTAACTAAATATCTATGATCGCAATCAAATGATTAAA 4316
Seq_2 4260 AAAGGgtaaatacttagccttgttaactaaatctatgatctgcaatcaaatgattaaa 4319

Seq_1 4317 CATGAAATGGCTAAATTTCTCCTCTTTTTATGTTAATTCAGGTTTACTTGGAAATAT 4376
Seq_2 4320 catgaaatggctaaatctcctctttttatgttaatcagGTTTACTTGGAAATAT 4379

Seq_1 4377 CTGATGTTTCTGGTTGGGGAGCTTTCTTAAGGTATATTAGGTTCAAAATTTGTTAAACT 4436
Seq_2 4380 CTGATGTTTCTGGTTGGGGAGCTTTCTTAAGGtatattaggttcaaaatttgttaaact 4439

Seq_1 4437 GATAAGTCCTTCAAAGATTAATCTATGTTTASAGTATBRACCTTGCCTTAAGAACAATTAT 4496
Seq_2 4440 gataagtccttcaaagattaatctatgtttagagtatgaacttgccttaagaacaattat 4499

```

```

Seq_1 4497 TTTTCTTCTACAGAACAGTGTAAAGTAAGCATGAATACCTTGGGGAAATACACAGGAGAG 4556
      |||
Seq_2 4500 ttttcttctctacagAACAGTGTAAAGTAAGCATGAATACCTTGGGGAAATACACAGGAGAG 4559

Seq_1 4557 CTGATCTCACATAAAGAGGCAGATAAACGGGGGAAGATATACGATCGCGAGAAGTGTCTCT 4616
      |||
Seq_2 4560 CTGATCTCACATAAAGAGGCAGATAAACGGGGGAAGATATACGATCGCGAGAAGTGTCTCT 4619

Seq_1 4617 TTTCTCTTCAATCTAAACGATCAGGCAGCTCTCAGCAGCTTGAAGTGTCCAACTCTCT 4676
      |||
Seq_2 4620 TTTCTCTTCAATCTAAACGATCAGGcagctctcagcagctttgaaatgtcccaactctct 4679

Seq_1 4677 TTTCTCTTAGTCTCTAGGTTGTCCTCAAATTTTAAAGTGTGTTGGATTGTGCTGCACT 4736
      |||
Seq_2 4680 ttctctctagctctctaggttgtcttcaaattttaaaatgTTTTGGATTGTGCTGCACT 4739

Seq_1 4737 TGTGCTAGATGCTTACAGGAAGGAGATAAACTGAAATTCGCCAACATTCTCCTGAACC 4796
      |||
Seq_2 4740 TGTGCTAGATGCTTACAGGAAGGAGATAAACTGAAATTCGCCAACATTCTCCTGAACC 4799

Seq_1 4797 TAACTGTTACGCAAGGTAAAAATGTGAAAAGTGAAGTTAAAGATACGGTTTTGCGATG 4856
      |||
Seq_2 4800 TAACTGTTACGCAAGgtaaaaatgtgaaaagtgaagttaagatacggTTTTGCGatg 4859

Seq_1 4857 ATGGGTATGTTCTGTTTTTCTCAAATCTTGGTATCTGTTCAAGTTCATCATGTTGCT 4916
      |||
Seq_2 4860 atgggtatgttctgttttctcaaatcttTGTatctgttcaagTTCATCATGGTTGCT 4919

Seq_1 4917 GGAGATCACAGGGTGGGATCTTCGCAAAAGAGAGGATACTGGCTGGAGAAGAAGTATTT 4976
      |||
Seq_2 4920 GGAGATCACAGGGTGGGATCTTCGCAAAAGAGAGGATACTGGCTGGAGAAGAAGTATTT 4979

Seq_1 4977 TACGATTACCGGTATGAGCCAGATCGAGCTCCAGCTTGGGCCAAAAACCTGAAGCTCCT 5036
      |||
Seq_2 4980 TACGATTACCGGTATGAGCCAGATCGAGCTCCAGCTTGGGCCAAAAACCTGAAGCTCCT 5039

Seq_1 5037 GGTTCCTAAGAAAGACGAAAATGTTACACCTTCTGTTGGTAGACCCAGGAGCTTGCT --- 5093
      |||
Seq_2 5040 GGTTCCTAAGAAAGACGAAAATGTTACACCTTCTGTTGGTAGACCCAGGAGCTTGCTTAG 5099

Seq_1 5094 ----- 5093
Seq_2 5100 caacaaaagaacaaccattttttgtcaattctttggttacaggtggaagaacgcttta 5159

Seq_1 5094 ----- 5093
Seq_2 5160 atcctcattactctccacacggaagaacacattgaaacaaattcatacattttgtctgagt 5219

Seq_1 5094 ----- 5093

```

```

Seq_2 5220 ctaaagaaaaattgtattcgttgattaaaatttcotTTTTcgttttacatttctggat 5279
Seq_1 5094 ----- 5093
Seq_2 5280 tatcattttattgtactgagactcgggttaaagttttaaattacagatgagaaacttgg 5339

Seq_1 5094 -- 5093
Seq_2 5340 tg 5341

```

```

Features [Seq_1]:
CLFq-F : [1 : 23]
CLF-TDNA-F : [551 : 570]
New Feature : [24 : 550]
New Feature : [571 : 613]
New Feature : [614 : 1616]
CLF-RV-R1 : [1617 : 1816]
New Feature : [1817 : 2604]
New Feature : [2605 : 3485]
New Feature : [3486 : 3691]
New Feature : [4367 : 5093]
New Feature : [3692 : 4366]

```

```

Features [Seq_2]:
Inicio TDNA139371 : [1144 : 1147]
PrimerCLFT-R : [1808 : 1828]
Inicio TDNA 021003 : [1109 : 1124]
JFS-CLF-SecF4 : [3722 : 3743]
JFS-CLF-SECF3 : [2554 : 2575]
JFS-CLF-SECF2 : [1695 : 1716]
CLFtDNAR : [1808 : 1828]
CLFtDNAP : [552 : 570]
CLF-PCRqFyCLFSec : [3620 : 3641]
CLF-PCRqR : [3916 : 3928]
CLF-PCRqR : [3830 : 3836]
CLF-JCFS-qF2 : [1629 : 1636]
CLF-JCFS-qF2 : [1774 : 1786]
CLF-JCFSqR2 : [2052 : 2063]
CLF-JCFSqR2 : [1848 : 1858]
gCLF-F : [3 : 23]
gCLF-R : [5075 : 5096]

```

Figura A6. Secuenciación de la clona pCLF:CLF 2B. La secuencia superior representa la secuencia de la clona pCLF:CLF 2B mientras que la secuencia inferior representa la secuencia original del gen CLF. Los nucleótidos en mayúscula indican regiones exónicas, los nucleótidos en minúscula indican regiones intrónicas.