



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de las posibles funciones de dos  
proteínas que interactúan *in vitro* con un factor  
de transcripción de la familia MADS:  
Establecimiento de las líneas mutantes homocigas

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A:  
ESTHER ZÚÑIGA SÁNCHEZ

Directora de Tesis: Dra. Alicia Gamboa de Buen

Codirectora de Tesis: Dra. Elena Alvarez-Buylla Rocas



México, D. F.



2004

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

---

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Agregado a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de su trabajo recepcional.

NOMBRE: Zúñiga Sánchez  
Esther

FECHA: 05/06/04

FIRMA: [Signature]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **"Estudio de las posibles funciones de dos proteínas que interactúan *in vitro* con un factor de transcripción de la familia MADS: Establecimiento de las líneas mutantes homocigas"**

realizado por **Esther Zúñiga Sánchez**

Con número de cuenta **9637523-5**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Alicia Gamboa de Buen

Alicia Gamboa de B.

Codirector de Tesis

Propietario Dra. María Elena Alvarez-Buylla Rocas

[Signature]

Propietario Dra. María del Rocio Cruz Ortega

[Signature]

Suplente Dra. Sonia Vázquez Santana

[Signature]

Suplente Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

[Signature]

Consejo Departamental de Biología

[Signature]  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

---

*Porque lo necio de Dios es más sabio que los hombres,  
y lo débil de Dios es más fuerte que los hombres...*

*1 Cor. 1:25*

*Tengo una esperanza!*

*A mi mamá quien me ha demostrado siempre su fortaleza*

*A mi papá por su silencio en el momento justo*

*A mis hermanas a quienes quiero mucho*

*A tí el que siempre me sonríe*

*“Lo más hermoso que podemos experimentar es el misterio.  
Es la fuente de todo arte y toda ciencia. Aquel para quien  
esta emoción es desconocida, aquel que es incapaz de  
detenerse para maravillarse y sentirse transportado por un  
sentimiento reverente vale tanto como un muerto: sus ojos  
están cerrados”*

*A. E.*

---

## *Agradecimientos*

Quiero agradecer principalmente a mi asesora la Dra. Alicia Gamboa de Buen por su gran apoyo tanto académico como personal, por sus enseñanzas fuera y dentro del laboratorio, pero sobretodo por mostrarme siempre su agradable perspectiva de la vida, me divertí mucho!!.

También agradezco a la Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces por su apoyo durante la realización de mi tesis al permitirme trabajar en el laboratorio de Genética Molecular y Evolución sin ninguna restricción y por sus comentarios.

A la Dra. Rocio Cruz Ortega por su ayuda durante la última etapa de mi tesis, por su tiempo invertido en tantas cosas y por su paciencia durante mi estancia en el laboratorio de Alelopatía.

Del laboratorio de Genética Molecular y Evolución agradezco a León Martínez-Castilla por su tiempo invertido durante mis lagunas en filogenias y por su disposición. A Tania Hernández igualmente le agradezco la ayuda que me brindó durante el desarrollo de estos análisis. A todos los que participaron durante mi aprendizaje en el laboratorio: a Barbara Ambrose a Ignacio Tlatelpa a Rosalinda Tapia a Caroline Burgeff a Ursula Flores y a Enrique Ortiz. A los que me brindaron siempre su ayuda Mitzi Villajuana, Kim Sun y Arturo Pérez.

Del laboratorio de Evolución a Daniel Piñeiro a Paty Rios, Miroslava y Argelia.

Del laboratorio de Desarrollo en Plantas a la Dra. Judith Márquez por tener siempre las puertas abiertas y a Moni.

Del laboratorio de Ecología Fisiológica a Noe y a Tere por las miniclasas de estadística que me sirvieron de mucho.

Del Universum a Vero Galeno por sus consejos como diseñadora a Don Celso y Don Bernar por todas las charlas que me mostraron el valor de la honestidad.

A mis amigos y amigas por estar en las buenas y en las malas: a Fabi a Ale a Oyuki a Malena a la teacher Rocio a Normita a Elisa y a Juliancito bonito gracias por su linda y calurosa amistad.

Gracias a Isra que me inspira siempre y me da ánimos, eres el mejor!! .

Gracias a todos mis profesores durante la carrera quienes me guiaron hacia donde voy. A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la beca PROBETEL y permitirme conocer el universo de posibilidades.

---

## Índice General

<b>Índice de Figuras</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaciones</b>	<b>11</b>
<b>Resumen</b>	<b>12</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>13</b>
1. La genética del desarrollo en plantas	13
1.1 Los genes MADS-box y el desarrollo en plantas	14
2. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo experimental	15
3. Etapas del desarrollo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
4. El Meristemo Apical del Brote (SAM)	18
4.1 Organización del Meristemo Apical	18
4.2 Genes reguladores que afectan la formación del SAM	21
5. La transición a la floración	23
5.1 Las cuatro rutas de la promoción a la floración	24
6. Desarrollo floral	26
6.1 Los genes homéoticos del modelo ABC y la determinación de órganos florales	28
<b>II. Antecedentes</b>	<b>32</b>
Proteínas que interactúan con Factores de Transcripción de la Familia MADS	32
1.1 FLOR1 y VSP1 son las proteínas de <i>Arabidopsis</i> que interaccionan <i>in vitro</i> con AGAMOUS	32
1.2 Proteínas de flores femeninas de maíz que interaccionan <i>in vitro</i> con proteínas MADS	34
1.2.1 ¿Qué se sabe sobre las proteínas DUF642?	34

---

---

<b>III. Hipótesis</b>	<b>36</b>
<b>IV. Objetivos</b>	<b>36</b>
1. Objetivo General	36
2. Objetivos Específicos	36
<b>V. Material y Métodos</b>	<b>38</b>
1. Búsqueda de líneas mutantes por inserción de T-DNA en el gen <i>FLOR1</i>	38
1.1 Líneas mutantes para el gen <i>FLOR1</i>	38
1.1.2 Southern Blot	39
1.1.3 Determinación de una línea mutante homóciga, <i>flor1</i> y comprobación del sitio de inserción	40
2. Expresión del gen <i>FLOR1</i> en las plantas mutantes	40
3. Análisis filogenético simple de proteínas con un dominio DUF642 en diferentes especies de plantas	41
3.1 Secuencias y Alineación	41
3.2 Análisis filogenético	42
4. Análisis de expresión del gen <i>At2g41810</i>	42
5. Obtención de líneas homócigas mutantes por inserción de T-DNA en el locus <i>At2g41810</i>	42
5.1 Búsqueda de línea mutante	42
5.2 Localización del inserto de T-DNA en el locus <i>At2g41810</i>	43
5.3 Búsqueda de mutantes homócigas	43
6. Caracterización del fenotipo de las líneas mutantes homócigas <i>flor1</i> y <i>At2g41810</i> bajo condiciones de fotoperíodo largo	43
6.1 Fenotipo de plantas mutantes <i>flor1</i>	43
6.2 Fenotipo de plantas mutantes <i>At2g41810</i>	44

---



---

7. Determinación del fenotipo de dos líneas distintas de sobre-expresión del gen <i>FLOR1</i>	44
<b>VI. Resultados</b>	<b>46</b>
1. Obtención de la mutante homóciga <i>flor1</i>	46
1.1 Dos líneas son positivas para el inserto de T-DNA en el gen <i>FLOR1</i>	46
1.2 La inserción de T-DNA se encuentra localizada en el exón I de <i>FLOR1</i>	47
1.3 Obtención de una línea mutante homóciga <i>flor 1</i>	47
2. La línea EII 3D-1 es una mutante nula para <i>FLOR1</i>	48
3. Las plantas mutantes <i>flor1<sup>-/-</sup></i> no presentan fenotipo	49
4. Fenotipo de las líneas de sobre-expresión	50
4.1 Etapas tempranas	50
4.1.2 Germinación de las semillas de líneas de sobre-expresión 1.39 y 4.10	50
4.1.3 Tamaño de la radícula en líneas de sobre-expresión.	51
4.2 Fenotipo de plantas adultas de líneas de sobre-expresión	52
5. Alineación de las secuencias de proteínas DUF642	55
6. Las proteínas de <i>Arabidopsis</i> codificadas por los genes At3g08030, At2g41810 y At2g41800 se agrupan en el mismo clado que la proteína de arroz OSAAP21410	57
7. Estructura del gen At2g41810	58
8. El gen At2g41810 se expresa exclusivamente en flor	58
9. Obtención de una línea mutante homóciga por inserción de T-DNA en el locus At2g41810	59
9.1 Localización del inserto del T-DNA en el locus At2g1810	59
9.2 Establecimiento de una línea mutante homóciga en el locus At2g41810 por genética clásica	60

---

---

10. Caracterización del fenotipo de las plantas mutantes homocigas para el gen <i>At2g41810</i> en condiciones de fotoperíodo largo	61
<b>VII. Discusión</b>	<b>63</b>
<b>VIII. Conclusiones</b>	<b>69</b>
<b>IX. Perspectivas</b>	<b>70</b>
<b>X. Bibliografía consultada</b>	<b>71</b>
<b>XI. Anexo</b>	<b>81</b>

---

## Índice de Figuras

Figura	Nombre	Pag.
1	Estructura de los factores de transcripción MADS-box en plantas	15
2	Etapas de desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3	Microfotografía del Meristemo Apical del vástago o SAM	19
4	Modelo de la transducción de señales y los genes <i>CLV</i>	22
5	Esquema de los genes que participan en la determinación del SAM: expresión y regulación	23
6	Rutas de señalización de promoción a la floración y la determinación de la estructura floral	25
7	Estructura floral y "el modelo del cuarteto" de especificación de órganos florales en <i>Arabidopsis</i>	30
8	Estructura de la proteína FLOR1	33
9	Estructura del dominio de función desconocida DUF642	35
10	Estructura del gen <i>FLOR1</i> (locus At312145)	39
11	Análisis de hibridación DNA-DNA o técnica de Southern Blot	46
12	Esquema que muestra la localización del inserto de 5461 pb de T-DNA en el gen <i>FLOR1</i>	47
13	Línea homociga <i>flor1</i> por PCR	47
14	Expresión del gen <i>FLOR1</i> en la línea mutante <i>flor1</i> .	49
15	Gráfica de germinación de dos líneas distintas de sobreexpresión y de plantas silvestres ( <i>ler</i> )	50
16	Gráfica de longitud de las radículas de dos líneas de sobre-expresión para el gen <i>FLOR1</i> y una línea silvestre ecotipo <i>ler</i>	51

---

---

17	Gráfica que muestra el promedio de las alturas entre dos líneas distintas de plantas de sobreexpresión (1.39.30 4.11.10) y plantas silvestres	52
18	Gráfica de número de hojas caulinas de dos líneas de sobreexpresión <i>FLOR1</i> y plantas silvestres ecotipo Landsberg (ler) y gráfica del número de vainas de dos líneas de sobre-expresión <i>FLOR1</i> y plantas silvestres ecotipo Landsberg (ler)	54
19	Alineación múltiple de secuencias correspondientes a proteínas con un dominio desconocido DUF642	55-56
20	Filogenia de proteínas con dominio desconocido DUF642 de diferentes especies de plantas	57
21	Estructura del gen <i>At2g41810</i> que codifica para una proteína de dominio desconocido DUF642 homóloga a la proteína de arroz AAP21410	58
22	Expresión del gen <i>At2g41810</i> en diferentes tejidos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
23	Localización del inserto de T-DNA en el gen <i>At2g41810</i>	59
24	Análisis de PCR a partir de muestras de plantas mutantes por inserción de T-DNA en el locus <i>At2g41810</i>	60
25	Gráfica de altura máxima en plantas mutantes <i>At2g41810</i> y plantas silvestres ecotipo Col y gráfica del número de hojas de roseta en plantas mutantes <i>At2g41810</i> y plantas silvestres ecotipo Col	61
26	Gráfica del número de hojas caulinas en plantas mutantes <i>At2g41810</i> y plantas silvestres ecotipo Col y gráfica del número de vainas en plantas mutantes <i>At2g41810</i> y plantas silvestres ecotipo Col	62

---

---

## Abreviaciones

AG	AGAMOUS
AGL	AGAMOUS Like
AP1	APETALA1
AP2	APETALA2
CAL	CAULIFLOWER
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
Col	Columbia
CLV	CLAVATA
CZ	Zona Central
ddH <sub>2</sub> O	Agua bidestilada
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EtOH	Etanol (Alcohol etílico)
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRI	FRIGIDA
GA	GIBBERELINAS
GFP	Green Fluorescence Protein
LFY	LEAFY
LRR	Dominio Rico en Leucinas
kDA	Kilo DALTONES
KAPP	Fosfatasa Asociada a una proteína Cinasas
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MS	Murashige/Skoog
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGIP	Proteína Inhibitoria de la Poligalacturonasa
PS	Plant-Specific
<i>PhyB</i>	<i>PhytochromeB</i>
PZ	Zona Periférica
SAM	Meristemo Apical del Vástago aereo
SEP	SEPALLATA
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa
RNA	Ácido ribonucleico
STK	SEEDSTICK
SHPI	SHATTERPROOF1
SOCI	SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
TFL1	TERMINAL FLOWER1
VSP	Vegetative Storage Protein
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGAN
UTR	Región no Transcrita
WT	Tipo Silvestre
WUS	WUSCHEL

---

---

## RESUMEN

El estudio de la diversidad biológica a través de diferentes disciplinas ha permitido entender algunos de los mecanismos que están involucrados durante el desarrollo de los distintos organismos. La biología molecular del desarrollo en plantas tiene como principal objetivo conocer las redes genéticas de regulación que intervienen durante estos procesos del desarrollo.

Uno de los modelos experimentales en plantas que ha resultado de gran ayuda durante la realización de estos estudios es la especie perteneciente a la familia Brassicaceae, *Arabidopsis thaliana*. Son muchas las ventajas que ofrece este modelo experimental y actualmente se conocen algunos de los genes que intervienen durante su desarrollo dando lugar al establecimiento de modelos genéticos que muy probablemente estén conservados en otras especies de angiospermas tales como *Oriza sativa* y *Zea mays*. Una de las familias de genes mejor caracterizada, cuyo papel durante el desarrollo tanto vegetativo como reproductivo ha sido comprobado, es la familia de genes MADS-box, que codifican para factores de transcripción. Estos factores están altamente conservados entre los eucariontes y en plantas se ha comprobado la formación de complejos proteicos entre ellos permitiendo así una regulación más fina de la expresión de otros genes que también participan en las vías de regulación durante el desarrollo. A pesar de ello, son muchos otros los genes que aún no se han caracterizado y cuya función principal es el establecimiento de interacciones proteína-proteína con el fin de permitir la adecuada transducción de señales.

Durante trabajos experimentales previos, se aislaron dos proteínas de flor de *Arabidopsis* VSP1 y FLOR1 y dos proteínas de flor femenina de maíz, una proteína de maíz homóloga a una proteína de arroz con un dominio de función desconocida DUF642 (Domain Unknown Function) y una glucoronidasa. Estas 4 proteínas interactúan *in vitro* con el dominio MADS del factor de transcripción AGAMOUS el cual determina la formación de estambres y carpelos en *Arabidopsis*. El propósito principal de este trabajo es el establecimiento de una línea mutante homociga para el gen *FLOR1* y una línea mutante homociga para el gen que codifica la proteína DUF642 en *Arabidopsis*, así como el análisis del fenotipo de dos líneas transgénicas de sobreexpresión para *FLOR1* previamente construidas. Ninguna de las mutantes por inserción de T-DNA desplegó un fenotipo alterado por lo que la existencia de una función redundante en ambos casos es muy probable. Sin embargo, la línea 4.11 de sobreexpresión para el gen incompleto de *FLOR1* sí desplegó un fenotipo alterado por lo que se propone que el grado de alteración fenotípica está muy relacionado con los dominios de interacción disponibles en la proteína *FLOR1*.

Los resultados obtenidos a partir de este trabajo nos permiten inferir que tanto la proteína *FLOR1* como la proteína DUF642 de *Arabidopsis* tienen como función principal el establecimiento de interacciones con otras proteínas como es el caso del factor de transcripción AG. Dichas interacciones pueden ser determinantes durante las rutas genéticas de transducción de señales que establecen la morfogénesis de la planta.

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. La genética del desarrollo en plantas

El origen y diversificación de las plantas terrestres ha sido uno de los eventos evolutivos más estudiados en el campo biológico (Crane *et al.*, 1995). Muchas de las investigaciones actuales se han enfocado al estudio de las angiospermas debido tal vez a su predominio en el paisaje terrestre, su abundancia y su gran diversidad.

Desde hace ya mucho tiempo los científicos y naturalistas se preguntaron como ocurrió dicha diversificación y hoy se busca entender el papel de las fuerzas evolutivas que estuvieron involucradas en el desarrollo de nuevas estructuras más especializadas, permitiendo así una mejor adaptación de este grupo a los diferentes ambientes (Lawton-Rauh *et al.*, 2000)

Son variadas las disciplinas dentro de la biología a partir de las cuales se han podido contestar algunas de estas preguntas tales como: ¿Por qué encontramos formas tan variadas en la naturaleza? ¿Cómo fueron capaces de adaptarse a sus hábitats? ¿Cómo se explica la existencia de estructuras tan “perfectas”? Entre estas disciplinas encontramos a la biología del desarrollo, la biología molecular, la bioquímica, la fisiología, la genética, la ecología y la sistemática filogenética. Gracias a los trabajos realizados en cada una de estas áreas se han logrado hacer algunas aproximaciones de los acontecimientos evolutivos remotos que fueron construyendo la historia del origen de tal diversidad (Baum *et al.*, 2002).

Una de las disciplinas que ha demostrado ser muy útil ha sido la biología del desarrollo y muchas de las investigaciones actuales se han realizado desde un nivel molecular. El progreso que se ha logrado gracias a esta visión ha permitido revelar algunos de los mecanismos moleculares esenciales que controlan la morfología del desarrollo en diferentes organismos (Purugganan, 1998). De igual manera, la disponibilidad actual de bancos genéticos y la posibilidad de explorar el papel de diferentes genes, ha convirtiendo a la genética molecular del desarrollo en un arma muy poderosa que nos permite hacer hipótesis sobre la secuencia de eventos que han dirigido los patrones del desarrollo, asimismo, los análisis evolutivos moleculares han hecho posible sentar las bases históricas del origen, evolución y diversificación de las funciones del desarrollo de familias completas de genes reguladores.

---

Todas estas herramientas genéticas, bioinformáticas y los avances en otras disciplinas conjuntamente con la biología molecular, han hecho posible avances considerables en el entendimiento de las rutas genéticas que regulan los procesos internos de desarrollo temprano y tardío en plantas, no sólo de interés científico sino también de interés agronómico y comercial.

El estudio de estas vías genéticas internas involucradas en cada una de las etapas del desarrollo de las plantas permitirá indagar sobre los procesos internos del desarrollo y también contribuirán enormemente para entender las relaciones entre la evolución genética y la diversificación biológica (Ferrario *et al.*, 2004).

## 1.2 La familia de genes de la caja MADS y el desarrollo en plantas.

El desarrollo se define como el conjunto de eventos progresivos que dan como resultado la formación del cuerpo de un organismo, e involucra 3 procesos sobrelapados: el crecimiento, la morfogénesis y la diferenciación. Dichos procesos están regulados tanto por instrucciones genéticas como por los factores ambientales

Una de las familias de genes mejor caracterizada que participa durante el desarrollo en plantas es la familia de factores de transcripción de la caja MADS mejor conocidos como genes MADS-box. Dichos factores de transcripción juegan un papel determinante en la expresión y regulación genética, así como también en la evolución morfo genética de los organismos (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000).

Los genes de la familia MADS-box están involucrados en diversos aspectos del desarrollo en eucariontes (Immink, 2002; Jack, 2001). Los factores de transcripción que pertenecen a esta familia están constituidos por cuatro dominios: 1) un dominio de unión al DNA o dominio MADS (del acrónimo de cuatro miembros de la familia MADS: la proteína MCM1 de levadura, las proteínas AGAMOUS y DEFICIENS de plantas, y la proteína SERUM RESPONSE FACTOR de mamífero) que es una región muy conservada que presenta posibles motivos de fosforilación y sitio de reconocimiento para fosfatasa (Shore, 1995), 2) un dominio I que no es una región conservada, 3) un dominio K que es similar a las proteína queratina en animales y que está involucrado en las interacciones proteína-proteína y 4) un dominio C terminal (Jack, 2001). La estructura de estos factores de transcripción se puede observar en la figura 1.



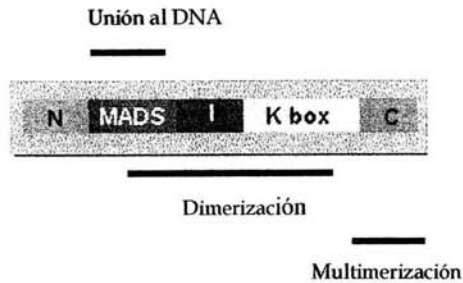


Figura 1. Estructura de los factores de transcripción MADS-box en plantas. Las proteínas MADS-box en plantas presentan una organización estereotípica de dominios conservados. El dominio o caja MADS se localiza en el amino terminal de la proteína y funciona como un dominio de unión a DNA además de participar en dimerización. El dominio K codifica para una serie de  $\alpha$ -hélices anfipáticas que funcionan en conjunto como un dominio de interacción proteína-proteína y posiblemente media la dimerización. Los dominios I y C están menos conservados, sin embargo, el dominio C es necesario para la formación de multímeros de orden mayor entre diferentes tipos de proteínas MADS-box (Jack, 2001; Honna & Goto, 2001).

Entre los miembros de esta familia de proteínas se ha comprobado la formación de complejos ternarios en diferentes sistemas mediante el análisis de doble híbrido en levaduras y a través del método FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Theissen, 2000; Immink, 2002). Algunos homodímeros o heterodímeros de las proteínas MADS reconocen y se unen *in vitro* específicamente a secuencias conservadas en regiones promotoras del DNA en la secuencia consenso  $CC(A/T)_6GG$  llamadas cajas CarG. Cada uno de estos factores juega un papel único durante el desarrollo, al regular finamente la expresión de genes, mediante la formación de éstos complejos que se unen a sitios específicos en sus promotores (Riechman, 1996).

Los análisis filogenéticos de los genes MADS-box en plantas sugieren que durante la evolución ha ocurrido una amplia diversificación de las funciones de dichos genes al participar tanto en el desarrollo vegetativo como reproductivo (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000).

## 2. *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae): un sistema modelo experimental

La necesidad de técnicas rápidas y sencillas que permitan avances concretos en la biología del desarrollo ha llevado hacia la búsqueda de nuevas y mejores herramientas de trabajo. En plantas muchos de los avances se han logrado a través de la utilización de sistemas modelo tales como *Arabidopsis thaliana* (Meinke *et al.*, 1998; Simpson, 1999). El fácil manejo en condiciones controladas de esta especie ha

---

permitido la realización de investigaciones no sólo con el fin de establecer los principios genéticos del desarrollo y la morfogénesis en plantas, sino también, ha contribuido en áreas como la bioquímica y la ecología de la interacción planta-patógeno (Bowman, 1994).

*Arabidopsis thaliana* es una planta perteneciente a la familia Brassicaceae, es una especie anual de talla pequeña, con las fases reproductiva y vegetativa separadas. Las principales características que hacen de *Arabidopsis* una especie tan atractiva para la investigación son:

a. Presenta un ciclo de vida corto cuyo tiempo de generación varía de 5 a 6 semanas bajo condiciones óptimas de crecimiento en ecotipos tales como Landsberg erecta o Columbia.

b. Tiene un genoma relativamente pequeño (se estima que su genoma completo codifica para 30,078 genes (Paterson *et al.*, 2004)) de aproximadamente 15 veces el tamaño del genoma de la bacteria *Escherichia coli* y ocho veces el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

c. Es una planta diploide y con un número cromosómico pequeño ( $2n=10$ ) a diferencia de muchos otros modelos tales como el maíz que son poliploides.

d. Es una planta fácil de transformar por *Agrobacterium tumefaciens*.

e. Su tipo de reproducción es por autogamia o autofecundación y una sola planta puede producir cientos de semillas.

f. Su tipo de reproducción facilita el mantenimiento de líneas homocigas completas.

Todas estas características y la disponibilidad de la secuencia de su genoma nuclear completo han abierto nuevas posibilidades en el entendimiento de las funciones de los genes involucrados en el desarrollo y morfogénesis de esta especie a través de la obtención de plantas mutantes de pérdida y de ganancia de función (Meinke *et al.*, 1998). En *A. thaliana* se utilizan ya sea elementos transponibles o T-DNA para lograr la interrupción del gen de interés (Martensen, 1998).

---

### 3. Etapas del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*

Se han reconocido dos fases principales durante el desarrollo de *A. thaliana*, la fase vegetativa y la fase reproductiva, ambas son determinadas por el meristemo apical o SAM (Bowman, 1994).

La fase vegetativa se caracteriza por la producción de hojas de roseta en una espiral filotáctica. La distancia o elongación entre hojas sucesivas de roseta o internodos, es muy corta. El número de hojas de roseta formadas antes de la transición a la floración varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento; a bajas temperaturas y fotoperíodos cortos la floración se retrasa dando lugar a un incremento en el número de hojas de roseta (Koornneef 1998; Simpson & Dean, 1999).

El crecimiento vegetativo también difiere entre los distintos ecotipos. En los ecotipos de florecimiento temprano el número de hojas de roseta varía de 5 a 8, mientras que en los ecotipos de florecimiento tardío el número de hojas de roseta puede ser de hasta 30 cuando éstas crecen en condiciones de fotoperíodo largo (Bowman, 1994).

La transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva está controlada por la integración de la información generada por señales endógenas y ambientales (Yanovsky & Kay 2002). La fase adulta es seguida por la transición a la floración en la que se produce una inflorescencia primaria a partir del meristemo apical. Los primordios de la inflorescencia primaria dan origen a coflorescencias o inflorescencias secundarias y a hojas caulinas. Las inflorescencias terciarias se originarán de posiciones equivalentes en la inflorescencia secundaria. Las flores individuales se desarrollan del ápice o base de una inflorescencia. Las flores maduras y fertilizadas producen vainas con 30 a 60 semillas por vaina. (Simpson & Dean, 1999). Las etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* pueden observarse en la figura 2.

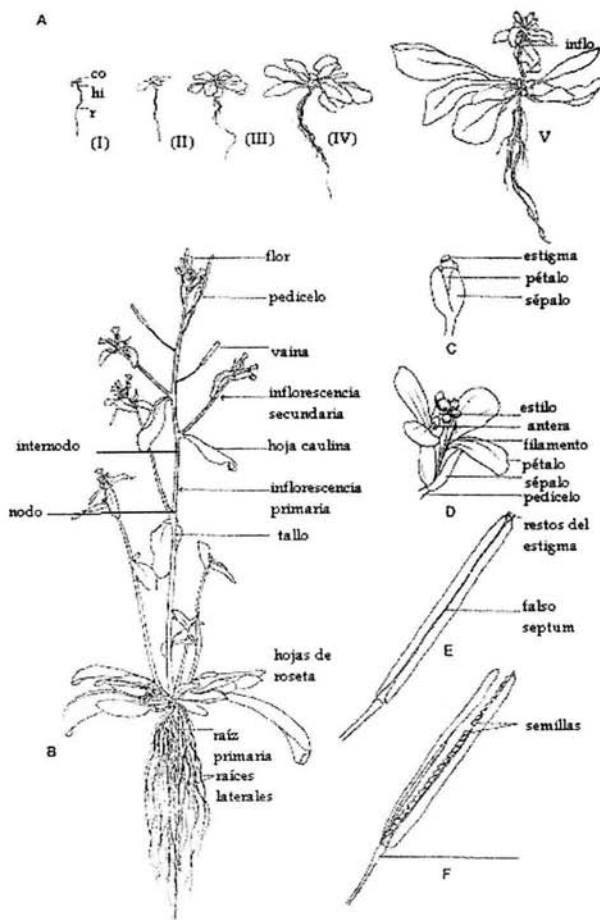


Figura 2. (A) Etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta). (I) a la (V) representa las etapas de los 2 a los 21 días post-germinación. Al día 2 post-germinación (I) los dos cotiledones (co) son soportados por el hipocotilo (hi) y una raíz primaria (r). La transición de un meristemo vegetativo juvenil con pequeñas hojas de roseta a un meristemo vegetativo adulto con producción de hojas de roseta más grandes generalmente ocurre entre la producción de la hoja cuatro o cinco (entre la etapa II y la etapa III). El número de hojas de roseta varía (IV) de 5 a más de 30 dependiendo del genotipo de la planta y las condiciones de crecimiento. La transición a la fase de reproductiva de crecimiento (V) se caracteriza por la elongación de los internodos en la inflorescencia (inflo). (B) Una planta madura de *Arabidopsis* a los 35 días post-germinación. La inflorescencia primaria se desarrolla del meristemo apical, la inflorescencias secundarias se originan de las axilas de las hojas caulinas en la inflorescencia primaria, las inflorescencias terciarias se originan de posiciones equivalentes en las inflorescencias secundarias. (C-F) Estructuras de las flores y de los frutos. (C) Un botón floral mostrando sépalos, pétalos y el gineceo. En esta etapa cuando el estigma puede ser observado en el centro la auto-polinización ya ocurrió. (D) Las flores maduras de *Arabidopsis* son soportadas por cortos pedicelos y poseen cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres (cuatro largos y dos cortos) y dos carpelos fusionados. Cada estambre es caracterizado por un filamento y una antera. El gineceo está dividido en tres regiones; el ovario basal soportado por un corto estilo sobre el cual se localiza el estigma. (E) Una vaina totalmente desarrollada posee dos valvas separadas por un falso septum. (F) Cuando las vainas están maduras y se abren liberando las semillas (típicamente de 30 a 60 por vaina) (Zoe, 2000)

#### 4. El meristemo apical del brote (SAM).

##### 4.1 Organización de Meristemo Apical (SAM).

De acuerdo con Brown *et al.* (1964) en (Clark, 1995) el meristemo apical del brote está dividido en una zona central (CZ) y una zona periférica (PZ). La zona central está constituida por células que permanecen en estado indiferenciado mientras en la zona periférica las células hijas entran en una ruta específica del desarrollo para incorporarse posteriormente en los primordios de los diferentes órganos.

---

La anatomía del meristemo apical está definida en términos de las capas y sus zonas radiales. Tanto en angiospermas como en gimnospermas la estructura está constituida por dos capas distintas, una capa externa o túnica y una capa interna o corpus (Barton & Poething, 1993). El arreglo túnica corpus refleja los patrones de división celular dentro de cada capa. En la túnica las células sufren divisiones anticlinales mientras que en el corpus las divisiones celulares son periclinales. En la mayoría de las angiospermas el meristemo apical está compuesto por tres capas relacionadas clonalmente L1, L2 y L3 (Figura 3). En las dicotiledóneas dos capas L1 y L2 constituyen la túnica y la capa L3 el corpus. La capa L1 o epidermis es la más externa y está constituida por una lámina de células que se dividirán anticlinalmente para dar origen a la capa más externa que cubre a todos los órganos de la planta. En la capa media o L2 las divisiones son menos regulares en el plano anticlinal y darán origen a tejido sub-epidérmico como el procambium, el cortex y algunas partes de la médula central. La capa más interna es el corpus o L3 y las divisiones celulares en esta capa son periclinales y darán origen al resto de la médula central (Steeves, 1989).

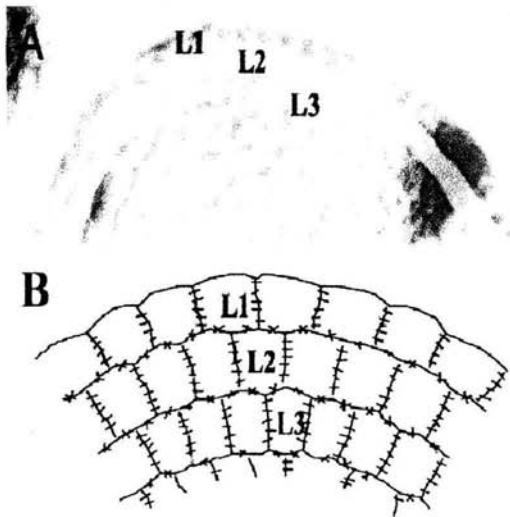


Figura 3. A Microfotografía del Meristemo Apical del brote, SAM (Shoot Apical Meristem). El meristemo apical presenta una estructura en capas las cuales están relacionadas clonalmente L1, L2 y L3. Las capas L1 y L2 constituyen la túnica mientras la capa L3 constituyen el corpus. La capa más externa o L1 dará origen al tejido epidérmico de todos los órganos de la planta, la capa L2 originará el tejido sub-epidérmico y las divisiones periclinales de la capa L3 darán origen a la formación de la médula central.

B. Esquema representando las tres capas que constituyen el SAM (Laux *et al.*, 1996).

En *Arabidopsis* la estructura del meristemo apical es básicamente la misma, pues está compuesto por las tres capas celulares L1-L3.

---

---

A lo largo del desarrollo, la forma y estructura del meristemo apical se va modificando. En la fase juvenil el meristemo apical es un rectángulo aplanado con simetría bilateral, mientras que en la etapa adulta el meristemo es más bien una estructura en forma de domo con simetría radial, esta misma estructura en forma de domo permanece en las etapas de meristemo de inflorescencia y meristemo floral. A pesar de que la forma y la estructura del SAM se modifican a lo largo del desarrollo de la planta el número de células que comprenden el domo del meristemo cambia muy poco a través de éstas (Laux & Jürgens, 1997).

El meristemo apical del brote es el que determina las estructuras aéreas de la planta y da origen a las variadas formas encontradas en la naturaleza. En *A. thaliana* está constituido por aproximadamente un ciento de células (Coladanti 2000). Es una estructura cuyas células meristemáticas indiferenciadas se dividen constantemente para dar inicio a la formación de órganos y estructuras tales como las hojas y las flores así como también para continuar con la perpetuación de una pequeña población de células que permanecerán fuera de un programa específico de desarrollo (Coen, 1994).

Las células centrales del SAM se dividen para continuar con el flujo de células progenitoras hacia los flancos del meristemo apical y por lo tanto sufren posteriormente una transición a un estado de diferenciación para convertirse en las células que formarán parte de primordios de órganos. Es precisamente este balance entre la división celular y la diferenciación una de las características remarcables de meristemo apical (Clark, 1995).

El meristemo apical y el meristemo floral son homólogos puesto que ambos son capaces de mantener un conjunto de células que se auto perpetúan. El meristemo apical es indeterminado en muchas especies, no así el meristemo floral que es determinado y una vez que todos los órganos florales se han formado las células madre dejan de dividirse (Lenhard, 2001). El desarrollo del meristemo floral sigue una secuencia a partir de la cual se forman una serie de órganos, sépalos, pétalos, estambres y carpelos (excepto en *Lacandonia schismatica*) (Márquez-Guzmán et al., 1989).

Los órganos estarán organizados en un patrón espacial regular referido como filotaxia. El patrón espacial varía de acuerdo a las especies; en *Arabidopsis* dicho patrón es en espiral (Clark, 2001).

La organización del meristemo apical se ha descrito en términos de morfología, patrones de división y linajes celulares. También existen algunos trabajos en los cuales el punto central es el entendimiento de las funciones de los genes involucrados en los aspectos clave del meristemo apical.

---

---

---

#### 4.2 Genes reguladores que afectan la formación del SAM.

Durante el desarrollo celular del meristemo apical se han delineado rutas de señalización. A través de estas rutas de señalización interna se logra una continua especificación celular hacia células madre, órganos o tejidos.

Actualmente se conocen las funciones de algunos genes que juegan un papel importante en el desarrollo del meristemo y en las comunicaciones celulares, es decir, en las rutas de señalización que se llevan a cabo en esta estructura. A partir de estos conocimientos se ha propuesto una relación estrecha entre los controles de desarrollo vegetativo y las funciones de los genes del desarrollo floral (Klaus, 1998). Algunos de estos genes son:

*SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, el cual codifica para una proteína con un homeodominio es necesario tanto para la formación como para el mantenimiento del meristemo apical embrionario y post-embriionario, su función es permitir que las células madre continúen con los patrones de división para formar el meristemo apical y los meristemas adventicios axilares. Las plantas mutantes *shoot meristemless-1* carecen de un meristemo apical pero son capaces de desarrollar estructuras tales como cotiledones y hojas. Esto sugiere que el control del desarrollo que especifica el destino de cada una de las partes aéreas de las plantas ocurre antes de la acción de este gen (Brad *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2002). Otros genes son necesarios para definir el destino de la parte aérea de la planta de una manera general (Barton & Poething, 1993).

Un gen que juega un papel central en la determinación del meristemo apical vegetativo y del meristemo floral es *WUSCHEL*. *WUS* codifica para un factor de transcripción, homólogo a los factores de transcripción encontrados en plantas y animales cuya estructura posee un homeodominio similar al de *STM* (Clark, 2001). El análisis del fenotipo de las mutantes *wus* demuestra que presentan una incapacidad para sustentar la organogénesis debido a que las células madre o meristemáticas localizadas en el domo central del meristemo apical son sustituidas por un conjunto de células parcialmente diferenciadas y vacuoladas (Laux, 1996).

*WUS* se expresa solo en un pequeño número de células que están localizadas en la parte central e inferior de la capa L3 del meristemo, es decir, las células meristemáticas no lo expresan. En consecuencia existe una sustitución continua de las células que expresan este gen.

La determinación del meristemo apical es consecuencia de la interacción de *WUS* con otros genes como son los genes *CLAVATA*. Contrariamente a lo observado en las plantas mutantes de *wus*, las mutantes de los genes *CLV*

---

presentan un meristemo apical de mayor tamaño con una masa de células indiferenciadas anómalas. Asimismo, estas plantas presentan una expansión en la expresión de *WUS*, es decir, una expresión ectópica por lo que el fenotipo podría ser consecuencia de este cambio.

Se han descrito tres loci para *CLAVATA*; *CLV1* codifica para un receptor transmembranal con actividad de proteína-cinasa en el dominio citoplásmico, *CLV2* corresponde a una proteína similar a la región extracelular de *CLV1* y *CLV3* codifica para una pequeña proteína secretada. In vivo, *CLV1* forma un complejo inactivo de 185 kDa que corresponderían a *CLV1* unida a *CLV2*, y un complejo activo de 450 kDa consistente del complejo de 185 kDa unido a una proteína fosfatasa asociada a una proteína cinasa (*KAPP*) y una proteína Rho asociada a una GTPasa (*ROP*). *CLV3* es requerida para la formación del complejo activo de *CLV1*, por lo que *CLV3* es un ligando para *CLV1*, como se puede observar en el modelo de la figura 4.

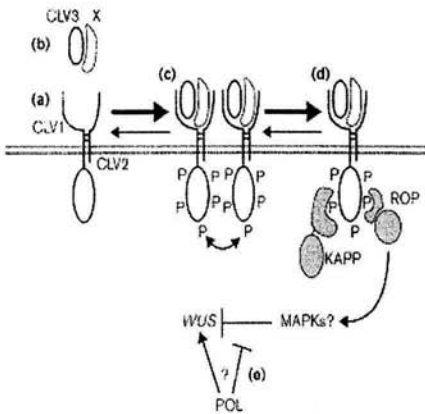


Figura 4. Modelo de la transducción de señales y los genes *CLV*. El modelo predice que un heterodímero *CLV1*-*CLV2* (a) se une a un multímero (b) *CLV3*, esta interacción ligando-receptor dirige (c) la transfosforilación del dominio cinasa en *CLV1* (d). Los residuos fosforilados en el dominio cinasa actúan como sitios de unión directos o indirectos para moléculas efectoras downstream o río abajo tales como la proteína fosfatasa cinasa-asociada (*KAPP*) y la proteína GTPasa Rho asociada (*ROP*). Es aún poco claro como se transmiten las señales a través de la membrana plasmática e) esto podría involucrar una cascada en la que participe una proteína-cinasa mitogeno-activada. Esta vía de señalización inactiva la expresión de *WUS*. Otro gen *POLTERGEIST* (*POL*) podría ser blanco potencial de *CLV1* y regular negativamente a *WUS* tomada de Clark (2001).

*CLV1* se expresa en la mayor parte de las células de la capa L3 tanto en sentido lateral como apical. *CLV3* se expresa en células de las capas L1 y L2 y se difunde hacia los niveles de expresión de *CLV1* para permitir la formación del complejo activo *CLV1*-*CLV2* junto con las proteínas *ROP* y *KAAP* y de esta manera regular la expresión de *WUS* limitándola a las células inferiores de la capa L3 (Clark, 2001) (Figura 5).



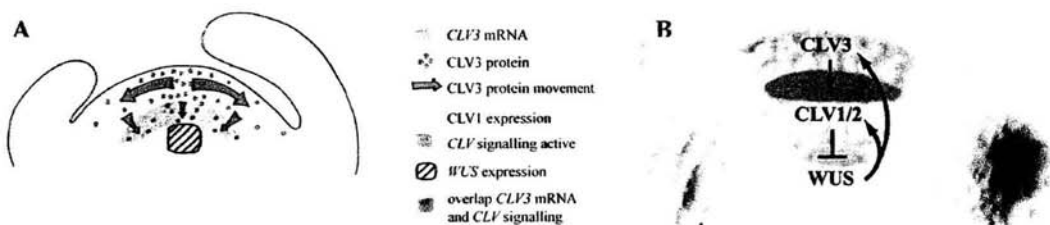


Figura 5. Esquema que muestra la expresión y las interacciones entre WUS y CLV (Clark *et al.*, 2001)

## 5. La transición a la floración

Del éxito reproductivo de una especie depende su perpetuidad. En el caso de las plantas la transición a la floración debe ocurrir cuando las condiciones ambientales sean favorables y permitan un mejor desarrollo de las estructuras que van a dar origen a la formación de semillas. Mucho del interés por entender los mecanismos que regulan este proceso de transición, está muy relacionado con la aplicación de estos conocimientos en áreas tales como la agricultura y la biotecnología, ya que la manipulación en el tiempo de floración en el cultivo de granos comestibles, permitiría un mejor aprovechamiento de las condiciones anuales de crecimiento (Nilsson, 1997).

La transición a la floración está controlada por señales de regulación que pueden ser factores endógenos tales como los ritmos circadianos y factores ambientales como son la temperatura, la calidad y la cantidad de luz. La promoción a la floración involucra una nueva maquinaria genética de hasta 80 genes organizados en 4 rutas que perciben las diferentes señales tanto endógenas como exógenas y que convergen en unos pocos genes integradores. Estos genes integradores son principalmente *FLOWERING LOCUS T (FT)*, que codifica para una proteína que se une a los lípidos y los genes de la familia MADS-box *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* (Koornneef, 1998). Estos análisis genéticos han sido llevados a cabo por medio de plantas mutantes de floración temprana y tardía en *Arabidopsis* (Nilsson, 1997).

Durante la transición al desarrollo reproductivo son evidentes cuatro cambios morfológicos en el ápice del brote de *A. thaliana*. 1) La elongación del internodo que ocurre como resultado de la formación del escape de una inflorescencia (bolting), 2) la supresión del desarrollo de hojas de roseta y en su lugar la formación de hojas caulinas que son más pequeñas y se desarrollan

---

después de la transición a la floración, 3) la formación de primordios de paraclados o coflorescencias en las axilas de las hojas caulinas y finalmente 4) la formación de flores en los flancos del meristemo apical del vástago aéreo (Suh & Choi, 2003).

Por otro lado, existe un amplio grupo de genes considerados como represores florales. Los alelos dominantes de *FRIGIDA* (*FRI*) y *FLC* interactúan y dan como resultado plantas que florecen muy tardíamente. Se ha descrito la presencia de alelos fuertes o débiles en los diferentes ecotipos basándose en los tiempos de floración (Simpson, 1999).

### 5.1 Las cuatro rutas de promoción a la floración.

La red genética involucrada en la transición a la floración ha sido dividida en cuatro rutas principales (figura 6); las dos rutas que median las señales ambientales que corresponden a 1) la ruta del fotoperíodo y 2) la ruta de la vernalización, 3) la ruta autónoma y 4) la ruta de las giberelinas (Wilson & Somerville 1995; Blázquez *et al.*, 2001; Simpson & Dean, 2002). La ruta de promoción por fotoperíodo integra las señales de la longitud del día a través de una serie de genes que responden a señales tales como la transición luz-oscuridad y los ritmos circadianos. La ruta de la vernalización promueve la floración en ecotipos de floración tardía. Esta es una respuesta y a la vez una adaptación a condiciones invernales en climas fríos para asegurar que la floración ocurra después del invierno (Michaels & Amasino, 2000).

Las plantas mutantes en los genes que participan en la inducción de la floración por luz florecen tardíamente bajo condiciones de fotoperíodo largo, sin embargo, no demuestran ningún retraso en la floración bajo condiciones de fotoperíodo corto y tampoco son sensibles a la vernalización. Este grupo incluye mutantes en los genes *CONSTANS*, que codifica para un factor de transcripción (Zinc-finger transcription factor) y *GIGANTEA*, que corresponde a una proteína transmembranal (Hayama, 2003).

Existe un conjunto de genes considerados como un subgrupo o una rama de la ruta del fotoperíodo. Las mutantes de este grupo (*ft*, *fd*, *fe* y *fwa*) florecen tardíamente bajo condiciones de día largo y también en condiciones de día corto pero tampoco muestran respuesta a vernalización (Koornneef, 1991). *FT*, codifica para una pequeña proteína que se une a lípidos con estructura similar al gen *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*), pero a pesar de que poseen una estructura similar cumplen funciones antagonistas, *TFL1* es un gen de identidad meristemática que reprime la floración, mientras *FT* al igual que los genes *FD* y *FE* de su mismo grupo promueven la floración (Soppe & Koornneef, 1999).

---

La vernalización puede también suprimir los efectos represivos de *FLC* y *FRI*, genes pertenecientes a la ruta autónoma. Los niveles de *FLC* son regulados negativamente por la vernalización aun en mutantes nulas para el alelo *FRI* indicando que la ruta de la vernalización puede reprimir a *FLC* por una ruta independiente de *FRI* (Michaels & Amasino, 1999).

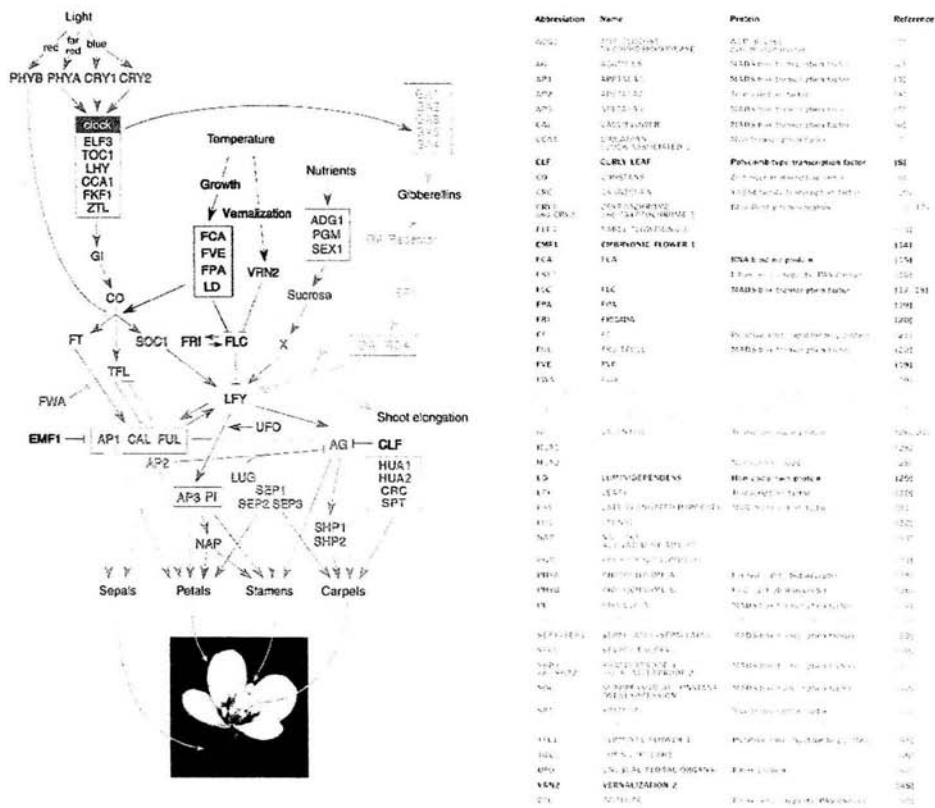


Figura 6 Rutas de señalización de promoción a la floración y la determinación de la estructura floral. Este modelo está basado principalmente en las interacciones genéticas entre las mutantes de identidad de meristemo floral, identidad de órganos florales y mutantes de alteración en el tiempo de la floración. Las rutas de promoción a la floración están marcadas en diferentes colores. La ruta del fotoperíodo en rojo, la ruta dependiente de las giberelinas en amarillo y la ruta autónoma en azul. El estado metabólico de la planta reflejado en la cantidad de sacarosa se muestra en rosa, los blancos finales de los genes que integran las cuatro rutas, es decir los genes de identidad de órganos se muestran en verde (Blázquez, 2000).

---

Existen otras dos rutas que promueven la transición a la floración independientemente de las señales ambientales, la ruta autónoma integrada por genes tales como *FCA*, *FPA*, *FVE*, *FLD* y *FY* que responden a señales endógenas tales como los relojes internos o ciclos circadianos y promueven la floración suprimiendo a genes como *FLC* y *FPA*. Mutaciones en los genes pertenecientes a esta ruta presentan un fenotipo de floración tardía, que puede ser suprimido bajo tratamiento de vernalización y condiciones de luz en el rango del espectro de rojo lejano, bajo condiciones de fotoperíodos inductivos o días largos y también bajo condiciones de fotoperíodos no inductivos o días cortos a diferencia de otro conjunto de mutantes que presentan un fenotipo de floración tardía en respuesta a fotoperíodos inductivos únicamente.

Tanto *FPA* como *FCA* codifican para proteínas de unión a RNA que reconocen motivos específicos. La expresión de *FCA* está regulada por el procesamiento alternativo del pre-mRNA, por la poliadenilación en cuyo proceso es requerida la proteína codificada por *FY* y por un factor de procesamiento de RNA (Simpson *et al.*, 2003). Por lo tanto la regulación genética post-transcripcional es un componente de regulación esencial en la transición a la floración (Lim, 2004).

La otra ruta que participa en la transición a la floración y es independiente de las señales ambientales es la ruta que responde al ácido giberélico. El análisis de las mutante para GA y de otros mutantes en el tiempo de floración como *gibberellic acid insensitive (gai)*, *represor of ga1-3 (rga)* y *rga-like 1 (rgl1)*, los cuales tienen funciones sobrelapadas y codifican para proteínas pertenecientes a la familia GRAS (Mouradov *et al.*, 2002) permitió determinar que ellas forman otra ruta distinta a las demás (Simpson, 1999). Las giberelinas están claramente involucradas en procesos relacionados con la floración pues se ha visto una relación entre las respuestas dadas por la ruta de señalización de los fitocromos y las giberelinas ya que las mutantes *phyB* responden a giberelinas exógenas sugiriendo una interacción entre ambas rutas. También se ha comprobado que las giberelinas promueven la floración en parte gracias a la activación de genes de identidad tales como *LEAFY* (Blázquez, 1998).

## 6. Desarrollo floral.

El desarrollo floral en *A. thaliana* ha sido descrito a través de diversas mutantes (Bowman *et al.*, 1989). Esto ha permitido ampliar los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que determinan la formación del meristemo floral y los órganos florales.

---

---

En las primeras etapas el meristemo floral se puede observar como un grupo de células indiferenciadas localizadas en los flancos del meristemo de inflorescencia. Posteriormente los primordios de los órganos florales se forman en un patrón definido dentro de cuatro verticilos concéntricos comúnmente referidos desde el más externo hasta el más interno. En el primero y segundo verticilo se desarrollan cuatro sépalos y cuatro pétalos. El tercer verticilo está constituido por seis estambres y el cuarto verticilo, el más concéntrico, comprende dos carpelos fusionados (Gustafson- Brown, 1994).

Se han identificado algunos genes que actúan muy tempranamente durante la generación del meristemo floral a partir de los flancos de los meristemas de inflorescencia y son conocidos como genes de identidad del meristemo floral. Existe otro grupo de genes que actúan en etapas más tardías del desarrollo floral los cuales están encargados de determinar la formación de los órganos florales (Mandel *et al.*, 1992).

La iniciación de los meristemas laterales florales en la región periférica del meristemo apical de inflorescencia está regulada por estos genes de identidad del meristemo. Los genes de identidad del meristemo pueden promover el desarrollo ya sea de hojas o de flores. La mutación en el gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* provoca la formación de flores en lugar de órganos vegetativos por lo que se asume que el papel de este gen es retardar la floración o suprimir la formación de flores (Laux & Jürgens, 1997). La función indirecta de *TFL1* es regular la función de genes de identidad del meristemo floral tales como *LEAFY (LFY)* y *APETALA1 (API)*, que determinan la formación del meristemo floral (Ratcliffe *et al.*, 1998). Por otro lado las plantas mutantes de pérdida de función de *LEAFY* muestran la transformación de las flores en estructuras estériles con órganos parecidos a hojas. El mRNA de *LFY* se acumula en la periferia del meristemo apical de inflorescencia, y se expresa en varias etapas del desarrollo floral (Shannon & Meek-Wagner, 1993; Parcy *et al.*, 1998).

Las mutantes *ap1* exhiben una parcial conversión del meristemo floral en meristemo de inflorescencia en el que un meristemo floral secundario se origina dentro de la flor en las axilas de cada uno de los órganos verticilados. La expresión de *API* se localiza en los primordios florales jóvenes y desaparece en la región central del meristemo floral una vez que comienza la formación de los sépalos en la periferia del primordio floral (Weigel *et al.*, 1992).

La sobreexpresión de ambos genes, es decir, de *LFY* y *API* da como resultado la formación de flores ectópicas, lo que permite concluir que tanto *LFY* como *API* son genes que regulan la determinación del meristemo floral y actúan como genes activadores del desarrollo al establecer el destino floral en los

---

---

meristemas laterales ( Weigel & Meyerowitz, 1993). Las plantas dobles mutantes *lfy, ap1* confirman las actividades redundantes de ambos genes al desplegar un fenotipo más severo que las mutantes simples (Weigel *et al.*, 1992).

Otros genes que también están involucrados en la determinación del meristemo floral son *APETALA2 (AP2)*, *CAULIFLOWER (CAL)* y *UNUSUAL FLORAL ORGAN (UFO)* (Koornneef, 1998). Las mutantes *ufo* presentan fenotipos que son similares a los causados por las mutantes de pérdida de función de *LFY*. *UFO* tiene en su estructura una caja F (F-box) por lo que se le asocia como factor de transcripción. La sobre-expresión de *UFO* no rescata el fenotipo en las mutantes de *lfy*, por lo que se considera que *UFO* no es un simple mediador entre los genes de identidad del meristemo floral y los genes de identidad de órganos. (Simpson, 1999). También existe redundancia funcional entre *API* y *CAL* pues se ha visto que en las mutantes *cal* aumenta considerablemente el fenotipo de *ap1* al desplegar inflorescencias cuya estructura se asemejaría a pequeñas coliflores como resultado de una proliferación masiva de tejido meristemático (Simpson, 1999).

#### 6.1 Los genes homéoticos del modelo ABC y la determinación de órganos florales en *A. thaliana*.

La homeosis es un fenómeno que podemos observar en organismos mutantes cuya identidad de órganos es cambiada al sustituir un órgano por otro. Estas alteraciones en el desarrollo pueden ser observadas al mutar uno o más de los genes, que solos o en combinación, intervienen en la especificación de órganos, dichos genes son conocidos como genes homéoticos.

En el desarrollo floral se han descrito tres clases de genes homeóticos ABC. La función de los genes A está especificada por los genes (*APETALA1 (AP1)* y *APETALA2 (AP2)*), la función B la realizan los genes *APETALA3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)*, y la función C por el gen *AGAMOUS (AG)*. Los genes de la función A presentan actividad en los verticilos uno y dos, es decir, sépalos y pétalos, los genes de la función B tienen actividad en los verticilos dos y tres correspondientes a pétalos y estambres. La función C correspondiente a *AG* presenta su actividad en el tercero y cuarto verticilo que corresponden a estambres y carpelos respectivamente (Weigel & Meyerowitz, 1994). *AG* también juega un papel muy importante en la determinación del meristemo floral debido a que el meristemo floral de las mutantes *ag* muestran una reversión al desarrollar meristemas de inflorescencia bajo condiciones de fotoperíodo corto (Mizukami & Ma, 1997).

La actividad de los genes de la clase A dirige la formación de los sépalos. Las funciones A + B participan en la formación de pétalos, las funciones B + C determinan la formación de los estambres mientras que solo la función C

---

---

determina el desarrollo carpelar. La clase D de genes fue agregada al modelo ABC posteriormente para especificar la identidad de los óvulos los cuales, subsecuentemente han sido considerados como órganos separados. Todos los genes del modelo ABC, excepto *AP2*, pertenecen a la familia de genes que codifican para factores de transcripción MADS- box .

Este modelo también establece que *AP2* y *AG* son genes antagonistas y pueden expresarse en los cuatro verticilos cuando alguno de ellos es suprimido (Bowman et al., 1991). Otros estudios han enfatizado el control negativo de *AG* por genes tales como *AP1*, *LEUNIG* y *CURLY LEAF*. Se ha demostrado también que *LFY* participa directamente en la regulación positiva de genes homeóticos florales tales como *AG* (Bush,1999).

La combinación de la pérdida de función de las tres clases de genes, resulta en la transformación de todos los órganos florales en hojas, pero la expresión de los genes ABC en la planta no transforma las hojas en órganos florales, por lo que se dedujo que a pesar de ser necesarios estos genes en el desarrollo floral no son suficientes para determinar la identidad de los órganos florales.

Existen tres genes *SEPALLATA* (*SEP*): *SEP1*, *SEP2*, *SEP3*, que funcionan redundantemente para especificar la identidad de pétalos, estambres y carpelos. En las triples mutantes *sep1*, *sep2* y *sep3* todos los órganos florales se convierten en sépalos y las flores son indeterminadas, lo que sugiere que los genes *SEP* participan en la determinación de meristemo floral.

Análisis previos demostraron la interacción entre las proteínas *SEPALLATA* y la proteína *AG* (Davis et al., 1996; Fan et al.,1997). Posteriormente se demostró que son genes homeóticos florales y han sido denominados como clase E. Junto a otros genes de la clase B y C son requeridos para la especificación de identidad de órganos en pétalos (A+B+E), estambres (B+C+E) y carpelos (C+E) (Honna & Goto, 2001). El modelo ABCDE predice la formación de cualquier órgano floral a partir de la interacción de estas cinco clases de genes homeóticos en plantas (Theissen & Saedler, 2001).

A partir de estos hallazgos se pudo establecer el modelo del cuarteto que ha permitido sentar las bases sobre las interacciones entre las proteínas homeóticas florales. Este modelo une la especificación de la identidad de los órganos florales con la formación de complejos tetraméricos compuestos por factores de transcripción MADS-box (Theissen & Saedler, 2001) (Figura 7).

---

Se ha reportado en plantas, la formación de complejos multiméricos de proteínas de clase B AP3 y PI, clase E SEP3 y AP1 de la clase A o/y AG de la clase C en *A. thaliana*. Estos complejos se unen a DNA y las combinaciones especifican exactamente para pétalos (A+B+E) o estambres (B+C+E) (Theissen, Saedler, 2001).

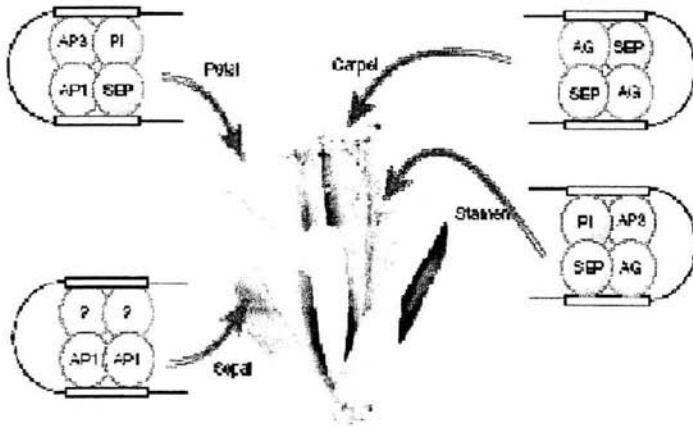


Figura 7. Estructura floral y el "modelo del cuarteto" de especificación de órganos florales en *Arabidopsis*. De acuerdo a este modelo la identidad de los distintos órganos florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos), está determinada por cuatro combinaciones de proteínas homeóticas florales MADS-box. Los complejos tetraméricos de estos factores de transcripción pueden operar uniéndose a la región promotora de genes blanco. Según este modelo dos dímeros de cada tetrámero reconocen dos diferentes tipos de DNA (llamadas cajas CarG, en gris) en una misma hebra de DNA. La estructura exacta de los complejos multiméricos es aún hipotética. Proteínas: AG, AGAMOUS; AP1, APETALA1; AP3, APETALA3; PI, PISTILATA; SEP, SEPALLATA. Tomado de Theissen & Saedler (2001).

Existen otros genes dentro del mismo árbol filogenético de AG que codifican también para factores de transcripción MADS-box, tales como SHATTERPROOF1 (SHP1), SHP2 y SEEDSTICK (STK) que participan más tardíamente durante el desarrollo floral para especificar tipos celulares durante el desarrollo del carpelo (Jack, 2001). La expresión ectópica de algunos de estos genes en mutantes de *AGAMOUS* es suficiente para inducir la transformación de sépalos en órganos parecidos a carpelos conteniendo óvulos. Se ha comprobado mediante ensayos de doble híbrido en levadura la formación de complejos multiméricos entre STK, AG, SHP1 y SHP2, en cuya interacción son requeridas las proteínas SEP (Favaro *et al.*, 2003).



---

Se confirma con esto el papel central que tienen los factores de transcripción MADS-box, en el desarrollo floral debido a que la mayor parte de los genes ABCDE, codifican para proteínas MADS. (Coen & Meyerowitz, 1991; Purugganan *et al.*, 1995).

Algunos otros genes que no pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box, pero que también participan en la formación de órganos florales son *CRABS CLAW* que suprime el crecimiento radial del gineceo pero promueve su crecimiento longitudinal y *SPATULA* que participa en el crecimiento de los márgenes del carpelo y permite el desarrollo de tejidos derivados de ellos (Alvarez *et al.*, 1999). Es necesario hacer más estudios sobre la filogenia de las proteínas MADS-box, sus funciones y las interacciones con el DNA para aclarar si dichos complejos tetraméricos establecieron la formación de órganos florales tanto en angiospermas como en otros grupos ancestrales (Theissen *et al.*, 2000).

---

## II. ANTECEDENTES

### 1. Proteínas que interactúan con factores de transcripción de la familia MADS-box.

Los genes de la familia MADS-box juegan papeles de gran importancia durante el desarrollo tanto vegetativo como reproductivo. El estudio de nuevas proteínas que pudieran interactuar con dominios MADS de los factores de transcripción tales como AG es determinante para el establecimiento de las vías de señalización y regulación de la expresión genética en procesos del desarrollo vegetal.

En el Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM se inició un proyecto para identificar proteínas que interactuarán *in vitro* y posiblemente *in vivo* con proteínas MADS. La construcción de columnas de afinidad a las que se adhirió un decapeptido derivado de la secuencia de AG, la cual está presente en la mayoría de las proteínas con dominio MADS cuya función ha sido descrita, permitió la purificación de dos proteínas de flor de *Arabidopsis thaliana* (Gamboa *et al.*, 2001) y dos proteínas de flor femenina de maíz. Las proteínas FLOR1, de la familia LRR (Leucine-Rich protein) y VSP1 (Vegetative Storage Protein) fueron identificadas en *Arabidopsis* mientras que en maíz se identificaron tanto una proteína de la familia DUF642 (Domain Unknown Function) como una glucoronidasa.

#### 1.1 FLOR1 y VSP1 son las proteínas de *Arabidopsis* que interactúan *in vitro* con AG.

La familia de proteínas LRR's, descrita en plantas y animales, está dividida al menos en 6 subfamilias con funciones muy diversas, cuyo papel primario involucra la formación de estructuras versátiles para la promoción de interacciones proteína-proteína (Kobe, 2001).

FLOR1 es una proteína de 38 kDa que tiene un péptido señal de 18 aminoácidos, una región intermedia de 51 aminoácidos que incluye secuencias de reconocimiento a nucleótidos, y la región LRR (Figura 8). Esta proteína presenta una gran similitud con las proteínas de la familia LRR descritas como inhibidoras de la poligalacturonasa (PGIP) pertenecientes a la subfamilia PS (Plant-Specific LRR proteins) (Desiderio *et al.*, 1997). Las proteínas de esta subfamilia comparten la función de participar en la transducción de señales y muchas de ellas median la resistencia a patógenos (Kajava, 1998).

---

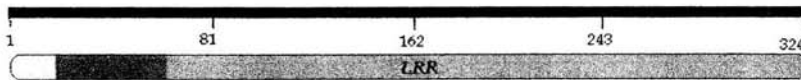


Figura 8. Estructura de la proteína FLOR1. FLOR1 es una proteína con un péptido señal de 18 aminoácidos, una región intermedia de 51 aminoácidos que incluye secuencias de reconocimiento a nucleótidos y una región LRR (Leucine-Rich Repeat) de 255 aminoácidos.

VSP1 ha sido descrita como una proteína de almacenamiento, con actividad de fosfatasa (DeWald, 1992). Su función se ha relacionado con la síntesis de sustancias de defensa contra parásitos, daño tisular mecánico o por herbivoría y su expresión en *Arabidopsis* está regulada por el ácido jasmónico (Berger *et al.*, 1996). Dado que la expresión de VSP1 es específica en el carpelo, preferentemente en el estilo y en los ovarios es posible que esta proteína pudiera estar involucrada en el desarrollo de los órganos florales (Utsugi, 1998; Benedetti, 1995).

La existencia de interacciones proteína-proteína *in vitro* entre el factor de transcripción AG y el complejo FLOR1- VSP1 se confirmó mediante análisis de doble híbrido e inmunoprecipitaciones. La interacción directa entre FLOR1 y AGAMOUS se estableció mediante columnas de afinidad (Gamboa *et al.*, 2001).

Análisis posteriores permitieron determinar que el gen *FLOR1* se expresa tanto en las etapas tempranas del desarrollo floral como en los primordios de los órganos florales correspondientes al tercer y cuarto verticilo además de expresarse en algunos tipos celulares específicos de las anteras y el carpelo (Acevedo *et al.*, 2004). *FLOR1* es una proteína intracelular cuya localización en el citoplasma y en el núcleo fue establecida mediante inmunolocalización y también mediante el análisis de plantas transgénicas con dos construcciones para expresar *in vivo* las proteínas quiméricas GFP-*FLOR1* completa (construcción 1) y GFP-región amino terminal de 69 aminoácidos de *FLOR1* (construcción 4) (Acevedo *et al.*, 2004). La localización intracelular fue diferente según el tipo celular pues solo se localizó en el citoplasma de las células de raíz y de los estambres mientras que en carpelos y hojas se encontró tanto en núcleo como en citoplasma.

La interacción *in vivo* de *FLOR1* y AG es apoyada tanto por las importantes coincidencias entre los patrones de expresión de AG (Bowman, 1991) y *FLOR1* durante el desarrollo floral, como por el hecho de que *FLOR1* es una proteína intracelular localizada en núcleo y citoplasma (Acevedo *et al.*, 2004).

Investigaciones previas han demostrado que proteínas similares a VSP y LRR's pueden estar relacionadas con la regulación postranscripcional de factores

---

de transcripción (Berger *et al.*, 1995). Las proteínas VSP pueden por lo tanto, fungir como proteínas de almacenamiento y al mismo tiempo estar relacionadas en importantes funciones bioquímicas como fosfatasa ácida (Gamboa *et al.*, 2001). La mayoría de las fosfatasa no son específicas para un sustrato en particular y la especificidad podría depender de proteínas accesorias. Las proteínas LRR poseen un dominio conservado que permite mediar las interacciones proteína-proteína y un motivo hipervariable que es importante para hacer específicas dichas interacciones.

FLOR1 presenta esta secuencia conservada al igual que otras LRR's y una región hipervariable que permitiría la especificidad entre el complejo AGAMOUS-FLOR1-VSP1. FLOR1 además podría estar interactuando con algunas otras proteínas con dominios MADS de factores de transcripción específicos de carpelos y estambres tales como SHP1, SHP2 y AGL11 (Gamboa *et al.*, 2001). El establecimiento de la interacción *in vivo* entre FLOR1 y determinados factores de transcripción con dominio MADS ayudará a integrar los diferentes mecanismos involucrados en el proceso de desarrollo.

## 1.2 Proteínas de flores femeninas de maíz que interactúan *in vitro* con proteínas MADS.

La proteína de maíz identificada como miembro de la familia DUF642 es una proteína de 39 kDa. A partir de un péptido de 19 aminoácidos derivado de esta proteína aislada de extractos crudos de flores femeninas de maíz, se determinó la secuencia de aminoácidos HSQDAEGLMLINGNFETAPR que se identificó como una proteína de la familia DUF642 que presenta una alta homología con una proteína de arroz que se expresa en el meristemo apical y en las flores (AAP21410).

### 1.2.1 ¿Qué se sabe sobre las proteínas DUF642?

Gracias a la secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis* (Lin *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1999; Salanoubat *et al.*, 2000; Tabata *et al.*, 2000; Theologis *et al.*, 2000) se han generado enormes bancos de genes, muchos de los cuales codifican para proteínas cuya función es desconocida. Estas proteínas han sido agrupadas de acuerdo con la homología de ciertos dominios específicos. En *A. thaliana* se tienen registradas por lo menos 1800 familias de proteínas con un dominio de función desconocida (Domain Unknown Function, DUF) (Lin *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1999; Salanoubat *et al.*, 2000; Tabata *et al.*, 2000; Theologis *et al.*, 2000).

---

Las proteínas de la familia DUF642 comparten una región conservada encontrada en proteínas de otras especies de plantas como son *Oriza sativa*, *Medicago sativa*, *Ricinus communis* y *Cicer arietinum* y en *Arabidopsis* se tienen registrados 10 genes (Figura 9).



Figura 9. Estructura del dominio de función desconocida (DUF642). Este dominio está altamente conservado en plantas y pertenece a una nueva clase de proteínas que al parecer se expresan únicamente en plantas. Estas proteínas no presentan ningún otro dominio de función conocida en su estructura. Ninguna de las proteínas registradas en esta familia ha sido caracterizada y por lo tanto no se conocen sus funciones <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi>.

De acuerdo con el European Bioinformatics Institute, el dominio de estas proteínas DUF642 es similar a un dominio de unión a galactosa (galactose-binding domain-like) que se encuentra en diferentes familias de proteínas tanto en eucariontes como en procariontes. La función común de este dominio es unirse a ligandos específicos tales como carbohidratos de superficie celular, fosfolípidos encontrados en las superficies membranales internas de células de mamíferos para la coagulación, unión a efrinas de la familia Eph de receptor tyrosin-cinasa, entre otros.

Las proteínas de las familias LRR y DUF642 presentan un dominio con una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos que posiblemente esté involucrado en interacciones proteína-proteína. Estas interacciones juegan un papel fundamental en los procesos de integración de las señales involucradas en determinar el proceso de desarrollo. En este trabajo se establecieron líneas mutantes nulas para FLOR1 y para una proteína DUF642 de *Arabidopsis* con el fin de llevar a cabo estudios *in vivo* de su función. Para profundizar en el estudio de la función de FLOR1, también se caracterizaron 2 líneas de plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína FLOR1 completa (Línea 1) y una región de FLOR1 con los 51 aminoácidos del extremo aminoterminal que incluye el péptido señal pero no la región LRR (línea 4).

---

---

### III. HIPÓTESIS

Debido a que tanto la proteína FLOR1 como la proteína DUF642 de maíz, interactúan con un dominio MADS del factor de transcripción AGAMOUS, su papel durante el desarrollo en plantas específicamente en el desarrollo de las flores es determinante, por lo tanto las plantas mutantes de pérdida de función y las líneas transgénicas de sobreexpresión para FLOR1 así como las plantas de mutantes para la proteína DUF642 en *Arabidopsis* podrían desplegar un fenotipo alterado durante alguna de las etapas del desarrollo de la planta o específicamente durante el desarrollo floral.

### IV. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo General

Hacer un análisis general sobre las posibles funciones de dos proteínas de *Arabidopsis thaliana* que interactúan *in vitro* con factores de transcripción de la familia MADS-box: La proteína FLOR1 y la proteína con un dominio DUF642 homóloga a la descrita en maíz y arroz.

#### 2. Objetivos Específicos

2.1 Obtener una línea mutante homociga por inserción de T-DNA para el gen FLOR1.

2.2 Determinar si la mutación en el gen que codifica para la proteína FLOR1 afecta de alguna manera la expresión del transcrito.

2.3 Analizar el fenotipo de las mutantes homocigas de *flor1* y de las líneas de sobreexpresión 1 y 4 (construidas por Francisca Acevedo) para este mismo gen bajo diferentes condiciones de crecimiento.

2.4 Hacer una base de datos que incluya las secuencias de proteínas de *Arabidopsis* y de otras especies, similares a la proteína DUF642 obtenida a partir del extracto crudo de flores femeninas de maíz.

---

---

---

2.5 Hacer un análisis filogenético simple, a partir de la base de datos de las proteínas de función desconocida DUF642 y su alineamiento, con el propósito de conocer las posibles relaciones entre la proteína de nuestro interés y sus homólogos en otras especies.

2.6 Obtener una línea mutante homociga de inserción de T-DNA de *Arabidopsis* en el locus del gen homólogo al codificado por AAP21410 correspondiente a una proteína de arroz DUF642. Una vez confirmada la inserción de T-DNA, se hará una búsqueda para obtener la línea homociga de plantas mutantes.

2.7 Determinar si la línea mutante por inserción de T-DNA en el gen que codifica para una proteína DUF642 en *Arabidopsis* homólogo a la proteína de arroz presenta alguna alteración en la transcripción del gen.

2.8 Realizar análisis del fenotipo de las plantas mutantes en el gen que codifica para una proteína *DUF642* homóloga a la proteína de arroz bajo diferentes condiciones de crecimiento e iluminación (condiciones de luz continua fotoperíodo corto y largo).

## 1. Búsqueda de líneas mutantes por inserción de T-DNA en el gen *FLOR1*.

### 1.1 Líneas mutantes para el gen *FLOR1*

Para llevar a cabo nuevas investigaciones sobre las posibles funciones del gen *FLOR1* se realizó una búsqueda en los bancos de genes de líneas mutantes por inserción de T-DNA existentes hasta la fecha de *A. thaliana*.

En el laboratorio de Genética Molecular y Evolución se identificaron 2 líneas mutantes independientes en *A. thaliana* ecotipo Wassilewsija (WS) para *FLOR1*, a partir de semillas obtenidas en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin (UWBC), que presentaron la inserción de T-DNA en uno de los exones. Las líneas fueron nombradas EI y EII. Las plantas identificadas como positivas para la inserción se denominaron EI 4 A, EI 1 B, EII 1 A, EII 3 C y EII 3 D.

Se sembraron las semillas de cada una de los positivos y de plantas silvestres ecotipo WS en suelo MetroMix 2000 (Scotts Company, vermiculita, perlita, agrolita, arena lavada y peat moss *Sphagnum canadense*) previamente esterilizado. Las plantas se crecieron bajo condiciones de fotoperíodo largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a 20 °C en cámaras de crecimiento CONVIRON. De estas plantas, se colectaron y congelaron hojas de rosetas. A partir del tejido colectado se hicieron extracciones de DNA genómico mediante el protocolo modificado para la extracción de DNA de maíz (ver Apéndice).

Para la detección de la inserción de T-DNA se utilizaron los siguientes oligos: AG20F forward o sentido con la secuencia 5' CTCGAGGTGTAGTTTAGTCAGTGCTGGTG 3' localizado en el primer exón del gen *FLOR1*, AG21R revers o antisentido con la secuencia 5' CCTCAAAGCATCCACACATAATCACGATG 3' localizado en el exón dos del gen *FLOR1* y el oligo JL-202 con la secuencia 5' TTCTCCATATTGACCATCATACTCATTG 3' que amplifica el extremo izquierdo (*left border*) del T-DNA.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando el DNA de tejido de plantas hijas de las 5 plantas positivas (EI 4 A, EI 1 B, EII 1 A, EII 3 C y EII 3 D).

---

---



Cada reacción de PCR contenía: 5 µl de Buffer 10 X, 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de 10 µM desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), 1 µl de oligo sentido 20 µM, 1 µl de oligo antisentido 20 µM, 1 µl de DNA, 1 µl de enzima DNA polimerasa taq (Invitrogen Life Technologies) y 37 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones contenían un volumen total de 50 µl.

Con las líneas EII 1 A, EII 3 C EII3D se utilizaron los oligos AG21R y JL-202 para la identificación del inserto de T-DNA y un fragmento del gen *FLOR 1* y los oligos FLOR 3 con la secuencia 5' GAATTCACACCCATCTATTTAGGCG 3' y FLOR 5 5' CTGCAGCGATAGATTAGACTGGAAGGAGTC 3' para la amplificación del gen completo. La localización de los oligos utilizados para dichas amplificaciones se muestra en la figura 10.

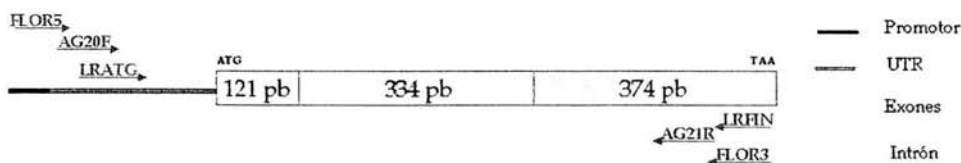


Figura 10. Estructura del gen *FLOR1* (locus At3g12145) El gen *FLOR1* consta de un promotor de 169 pb, de un UTR de 642 pb, dos exones de 121 y 374 pb respectivamente y un único intrón de 334 pb. Los oligos con los que se amplificó el gen completo se muestran en la azul.

Para la amplificación se utilizó el siguiente programa de PCR: 94 ° C durante 2' (temperatura inicial), 35 ciclos de: 94°C 30'', 60°C 30'', 72° C 1', correspondientes a temperatura de desnaturalización, hibridación de los oligos o annealing y extensión respectivamente. Una extensión final de 72° C por 5' y 4° C para enfriar la reacción.

Con las líneas EI 1 B y EI 4 A, se utilizaron los oligos AG20F y JL-202 para amplificar la inserción de T-DNA y un fragmento del gen *FLOR1* y los oligos FLOR 3 y FLOR 5 para amplificar el gen completo. Se utilizó el mismo programa de PCR.

### 1.1.2 Southern Blot

Se realizaron PCR's con las muestras de DNA de las líneas EI 1B, EI 4 A y EII 3 D. Las reacciones de PCR se hicieron con los mismos primers y bajo las mismas condiciones de amplificación. Se siguió el procedimiento de Southern Blot (ver protocolo en el Apéndice), utilizando como sonda marcada con ATP-γ<sup>32</sup>P un

---

---

fragmento de *FLOR1* amplificada con los siguientes primers LRATG 5'  
CCATGGAGCTCTTTGTTCATC 3' y LRAFIN 5'  
GGATCCACAAGCCTCAAGGGG 3'.

### 1.1.3 Determinación de una línea mutante homociga, *flor1* y comprobación del sitio de la inserción del T-DNA.

Se eligió la planta EII3 D para continuar con la búsqueda de una línea mutante homociga para la inserción de T-DNA en el gen *FLOR1*. Las semillas correspondientes a la generación T<sub>3</sub> de esta línea y de plantas silvestres ecotipo WS se crecieron en las condiciones antes descritas. Se realizaron las extracciones de DNA a partir de hojas de roseta.

Los oligos utilizados para las amplificaciones fueron AG21R y JL-202 que se unen al exón 2 del gen *FLOR1* y al borde izquierdo del T-DNA respectivamente. Para confirmar la mutación homociga se utilizaron los primers FLOR 3 (sentido) y FLOR 5 (antisentido) que amplifican el gen completo. El programa de PCR fue el mismo que se utilizó para las amplificaciones anteriores. Las bandas amplificadas se purificaron con fibra de vidrio siliconizado (Siliconized Glass Wool). Una vez purificada la banda se ligó en el plásmido pGEM-T easy (Invitrogen Life Technologies) y se transformó en células competentes top 10 (ver protocolos de purificación, ligación y transformación en el apéndice).

Las células transformadas se crecieron en medio LB con ampicilina (1µl por cada ml de medio) a una temperatura de 37° C durante toda la noche. Este cultivo fue utilizado para el aislamiento del plásmido con el método de purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina (ver apéndice).

Para la digestión del plásmido pGEM-T easy se utilizó la enzima de digestión EcoRI. Las clonas positivas se mandaron a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

## 2. Análisis de expresión del gen *FLOR1* en las plantas mutantes por RT-PCR

Se crecieron las plantas mutantes homocigas derivadas de la planta EII3D 1 y plantas silvestres ecotipo WS. Se colectaron flores e inflorescencias de ambas. Se realizaron extracciones de RNA del tejido colectado, mediante el protocolo de extracción de RNA con trizol (Invitrogen Life Technologies) (ver apéndice).

---

Se utilizó 1 µl de RNA total para la síntesis de cDNA utilizando el kit SuperScript First-Strand System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) (ver apéndice).

Se llevaron a cabo reacciones de PCR con un volumen total de 50 µl, utilizando como templado el cDNA de flores e inflorescencias de plantas mutantes y silvestres. Las reacciones se llevaron a cabo con los oligos, FLOR 3 y FLOR 5. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las mismas del programa anteriormente descrito. Para confirmar la calidad del cDNA y como control positivo se amplificó tubulina con los primer TUBF sentido con la secuencia 5' CTC AAGAGGTTCTCAGCAGTA 3' y TUBR antisentido con la secuencia 5' TCACCTTCTTCATCCGCAGTT 3', bajo las siguientes condiciones de PCR: 94° C 3', 27 ciclos de desnaturalización, hibridación o annealing y extensión correspondientes a: 94° C 30'', 64° C 30'', 72° C 1' respectivamente. Temperatura de extensión final 72° C durante 5 minutos y 4° C como temperatura de enfriamiento.

### 3. Análisis filogenético simple de proteínas con un dominio DUF642 en diferentes especies de angiospermas.

#### 3.1 Base de datos de las secuencias y Alineación

Un total de 21 secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas registradas en el GenBank como DUF642 en plantas fueron documentadas y utilizadas para el análisis. De *Arabidopsis thaliana* se obtuvieron registros de 10 secuencias codificadas por los siguientes locus: At1g80240, At1g29980, At2g34510, At2g41800, At2g41810, At3g08030, At4g32460, At5g11420, At5g25460, At5g14150, ocho secuencias de aminoácidos de las proteínas de *Oriza sativa*: OsAAP21410, OsBAB21293, OsBAB90140, OsBAB91861, OsCADA41551, OsCAD41545, OsCAD4548, OsCAD41549, y una de *Medicago sativa*: T09642, *Cicer arietinum*: A06490 y *Ricinus communis*: T10174.

Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas con el programa BioEdit. En cada una de las proteínas se omitieron los aminoácidos del inicio (péptido señal) y el final de la proteína con fin de comparar únicamente los aminoácidos que conforman el dominio que se ha establecido como DUF 642.

---

### 3.2 Análisis filogenético

Para la construcción del árbol se aplicó el método de Máxima Parsimonia (MP) utilizando el programa MEGA2. En el análisis se realizó un método de búsqueda de árboles por intercambio entre vecinos cercanos (Close-neighbor-interchange) con 100 réplicas de árboles de adición aleatoria (Random Addition Trees). Los bootstraps value (100 réplicas) se pidieron para asegurar el soporte entre las ramas.

### 4. Análisis de expresión del gen *At2g41810*, homólogo al gen que codifica para la proteína AAP21410 de arroz

Se esterilizaron semillas (ver apéndice) de plantas silvestres ecotipo Col. Las semillas se sometieron a un tratamiento de vernalización durante 4 días. Se sembraron en placas de petri con MS (ver preparación en el apéndice), bajo condiciones de fotoperíodo largo (16 horas luz 8 oscuridad) a una temperatura de 20° C. A los 15 días se colectaron y congelaron en nitrógeno líquido las raíces de algunas plantas; el resto de ellas se transplantaron en macetas con suelo MetroMix para ser crecidas igualmente bajo condiciones de fotoperíodo largo.

De estas plantas, se colectaron y congelaron inmediatamente: hojas de roseta, hojas caulinas, flores, inflorescencias y tallos para la obtención de cDNA.

El cDNA se amplificó usando el oligo sentido LDCATG con la secuencia 5' ATGTCCTCTCGTCTCTCTC 3' y el oligo antisentido LDCATF1 con la secuencia 5' CACAAAAAACC GGGAAT 3'. Como control se hicieron reacciones de PCR con el cDNA de los diferentes tejidos utilizando los oligos FLOR 3 Y FLOR 5.

Se utilizó el siguiente programa de PCR: 94° C 5' de desnaturalización inicial, 35 ciclos de desnaturalización 94° C 30'', hibridación del oligo 60°C con 1'30'' y elongación 72° C 1'30''. Finalmente 72° C 5' y 4° C para enfriar la reacción. Se utilizó como control positivo la amplificación de tubulina.

### 5. Obtención de líneas homocigas mutantes por inserción de T-DNA en el locus *At2g41810*.

#### 5.1 Búsqueda de línea mutante.

En el banco de genes del SALK INSTITUTE se localizaron las posibles mutantes de genes de la familia DUF642. Se encontró una línea mutante en el gen

---

---

At2g41810 que presentaba la inserción localizada en un exón que correspondió a la línea SALK\_033858. No se encontraron mutantes de los otros genes del mismo clado.

Las semillas obtenidas del ABRC fueron crecidas bajo condiciones de luz continua. Se utilizaron hojas de roseta para la extracción de DNA. Para identificar las plantas que presentan la inserción, se utilizaron los siguientes oligos: LBB1 con la secuencia 5' ACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTT 3' localizada en el borde izquierdo del inserto de T-DNA, LDCATG y LDCATF1.

El programa utilizado para la amplificación del DNA fue el siguiente: temperatura inicial 94°C 5', 35 ciclos de 94°C 30'', 60°C 45'' y 72°C 1' 30'' correspondientes a temperatura de desnaturalización, hibridación de oligos y extensión respectivamente. Finalmente las reacciones se sometieron a una temperatura de 72°C durante 5'.

## 5.2 Localización del inserto del T-DNA en el locus At2g41810

Se amplificó una sola banda de aproximadamente 700 pb correspondiente a un fragmento del gen y el borde izquierdo de la inserción de T-DNA, ésta fue clonada y secuenciada en pGEM-T easy tal como fue descrito anteriormente (punto 1.1.3). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa MacVector para localizar el sitio exacto de Inserción del T-DNA.

## 5.3 Búsqueda de mutante homóciga

Confirmada la inserción de T-DNA en esta línea se consideró como generación T<sub>1</sub> a las plantas que al ser analizadas habían presentado el inserto.

Se crecieron semillas colectadas de las plantas T<sub>1</sub> bajo las mismas condiciones de crecimiento y se utilizó el mismo procedimiento para buscar las plantas mutantes homocigas en la generación T<sub>2</sub>.

## 6. Caracterización del fenotipo de las líneas mutantes homocigas *flor1* y *At2g41810* bajo condiciones de fotoperíodo largo.

### 6.1 Fenotipo de plantas mutantes *flor1*

Aproximadamente 100 semillas de plantas silvestres ecotipos ws así como 200 semillas de plantas mutantes *flor1* (plantas EII3D1 b y EII3D1 d) fueron lavadas y esterilizadas. Se sembraron 20 placas con 10 semillas cada una de la mutante *flor1* (EII3D1 b y EII3D1 d) en MS. De igual manera se sembraron 10

---

---

placas con 10 semillas cada una de plantas silvestres ecotipo WS, dichas placas fueron puestas bajo condiciones de fotoperíodo largo (16 h luz: 8 h oscuridad) en cámaras de crecimiento LAB-LINE a una temperatura de 20°C.

Durante un período de 15 días las plantas fueron observadas en estas condiciones de crecimiento y los parámetros medidos fueron: tiempo de germinación de las semillas, emergencia de la radícula y emergencia de los cotiledones. El día 16 las plantas fueron trasplantadas a macetas con suelo y puestas bajo las mismas condiciones de crecimiento. Los parámetros evaluados una vez trasplantadas fueron únicamente el número de hojas de roseta y el tiempo de floración. Todos estos parámetros observados fueron comparados con los parámetros registrados en la publicación Douglas *et al.* (2001)

## 6.2 Fenotipo de plantas mutantes *At2g41810*

Aproximadamente 30 semillas de plantas mutantes homocigas para el gen *At2g41810* y 25 semillas de plantas silvestres ecotipo Col fueron lavadas, esterilizadas y vernalizadas durante 4 días. Las semillas fueron sembradas directamente en suelo MetroMix y cultivadas en cámaras de crecimiento LAB-LINE en condiciones controladas de humedad, temperatura e iluminación (fotoperíodo largo). De igual manera se crecieron aproximadamente la misma cantidad de plantas mutantes y silvestres bajo condiciones de humedad y temperatura controladas en luz continua. Los parámetros evaluados fueron: número de hojas de roseta, altura, número de vainas, número de hojas caulinas y aparición del escape de la inflorescencia. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de T para muestras independientes.

## 7. Determinación del fenotipo de dos líneas distintas de sobreexpresión del gen *FLOR1*

Semillas de las líneas transgénicas de sobreexpresión para el gen *FLOR1* 1.39.30 y 4.11.10 (construidas previamente, ver Acevedo *et al.*, 2004) y plantas silvestres ecotipo Landsberg (*ler*) fueron lavadas y esterilizadas. Estas semillas se sembraron en placas de petri con medio MS y se crecieron en cámaras LAB-LINE bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Los parámetros medidos en las placas fueron la germinación de las semillas, la emergencia y el tamaño de la radícula y la aparición de las dos primeras hojas verdaderas. A los 15 días las plantas fueron trasplantadas a macetas con suelo y crecidas bajo las mismas condiciones. En las macetas los parámetros cuantificados fueron: altura, número de vainas y número de hojas caulinas. Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA).

**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *FLOR1***

<b>Oligo forward o sentido</b>	<b>Oligo revers o antisentido</b>	<b>Banda esperada (pb)</b>
AG20F 5'CTCGAGGTGTAGTTTAGTCAG TGCTGGTG3'	AG21R 5'CCTCAAAGCATCCACACATAATC ACGATG3'	1213
JL202 5'TTCTCCATATTGACCATCATA CTCATTG3'	AG21R 5'CCTCAAAGCATCCACACATAAT CACGATG3'	812
FLOR3 5' GAATTCACACCCATCTATT AGGCG 3'	FLOR5 5'TGCGAGCGATAGATTAGACTG GAAGGAGTC 3'	1820
LRATG1 5'CCATGGAGCTCTTTGTTTCATC3'	LRFIN 5'GGATCCACAAGCCTCAAGGGG3'	1318

**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *At2g41810***

<b>Oligo forward o sentido</b>	<b>Oligo revers o antisentido</b>	<b>Banda esperada (pb)</b>
TUBF 5'CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA3'	TUBR 5'TCACCTTCTTCATCCGCAGTT3'	420
LDCATG 5'ATGTCTCTCGTTCTCTCTC3'	LDCATF1 5'CACAAAAAAACCGGGTAAT3'	1113
LBB1 5'ACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTT 3'	LDCATF1 5'CACAAAAAAACCGGGTAAT3'	418
UKAG5 5'CCATGGGAAAGAGGCAAATAA TTGGC3'	UKAG3 5'CGAACTATTACAATCACAAAAA AACCGGGTATCTAGA3'	952

---

## VI. RESULTADOS

### 1. Obtención de la mutante homóciga *flor1*.

#### 1.1 Dos líneas son positivas para el inserto de T-DNA en el gen *FLOR1*

Por medio del análisis de Southern Blot se confirmó la inserción de T-DNA en las líneas derivadas de las plantas EII 3D y EI 1B (figura 11). Las bandas transferidas se amplificaron con los oligos AG20F y JL-202 para EI 1B y AG21R y JL202 para la línea EII 3D. Un fragmento del gen *FLOR1* marcado radiactivamente con ATP- $\gamma^{32}\text{P}$  fue utilizado como sonda.

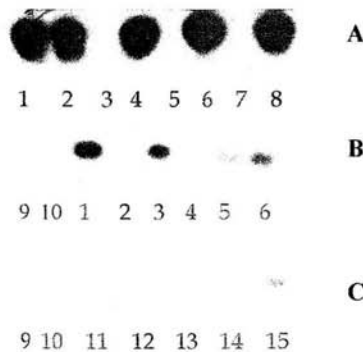


Figura 11. Análisis de hibridación DNA-DNA o técnica de Southern Blot. Los productos de PCR amplificados con los oligos AG20F y JL-202 para la línea EI 1B (panel A y B del 1 al 10) y AG21R y JL-202 para la línea EII 3D (panel B y C del 1 al 15) se transfirieron a una membrana y se hibridaron utilizando como sonda un fragmento del gen *FLOR1*. La sonda utilizada fue el producto de PCR amplificado con los oligos LRATG y LRFIN, dicho producto fue marcado con ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ .

Para la línea EI 1 B se encontraron 5 plantas positivas; 1, 2, 4, 6 y 8 de un total de 10 muestras. Para la línea la línea EII 3D se encontraron 9 plantas positivas; 1, 3, 5, 6 del panel B y las 10, 11, 12, 13 y 15 del panel C de un total de 17 plantas.



## 1.2 La inserción de T-DNA se encuentra localizada en el exón I de *FLOR1*

Se eligió la planta 1 de la línea mutante EII3D para continuar con la búsqueda de una línea homociga, debido a que no se amplificó el gen completo de *FLOR1* en esta muestra. Las bandas que se amplificaron a partir del DNA extraído de hojas de roseta de plantas mutantes y silvestres con los oligos AG21R y JL-202, junto con los análisis de clonación y secuenciación de estas, permitieron determinar que la inserción de T-DNA se localiza en el Exón I del gen *FLOR1* en la base número 52 (Figura 12).

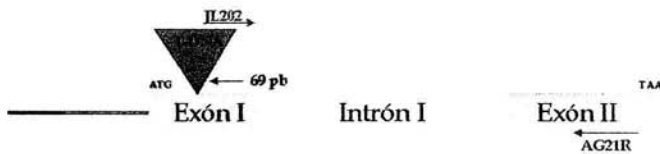


Figura 12. Esquema que muestra la localización del inserto de 5461 pb de T-DNA en el gen *FLOR1*. Los análisis de PCR, clonación y secuenciación permitieron determinar que el inserto se localiza en la base número 52 del primer exón del gen *FLOR1* 69 pb antes del final del exón. Los oligos utilizados para la amplificación de las bandas fueron AG21R del gen *FLOR1* y JL-202 del inserto de T-DNA.

## 1.3 Obtención de una línea mutante homociga *flor1*

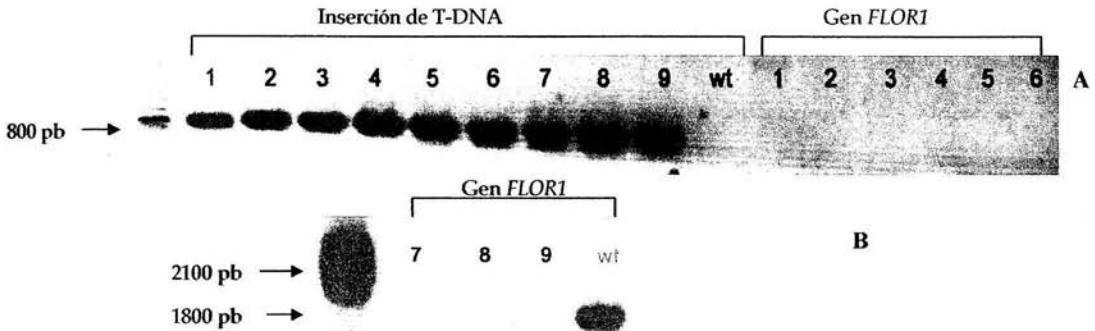


Figura 13. Confirmación por PCR de una línea homociga mutante *flor1*. En el panel A se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 800 pb en 9 muestras distintas de DNA de plantas mutantes. Dichas amplificaciones realizadas con los oligos JL-202 y AG21R corresponden al extremo izquierdo del T-DNA y parte del exón 1 del gen *FLOR1*. En el control (wt) no hay amplificación. En este mismo panel se observan 6 carriles vacíos, puesto que no hubo amplificación para el gen completo *FLOR1*, en las reacciones de PCR con muestras de DNA de plantas mutante. En el panel B se observan los espacios vacíos de las reacciones de PCR para 3 muestras de DNA de plantas mutantes. En la muestra control (wt) se observa una banda de 1800 pb correspondientes al gen completo *FLOR1*.

---

A partir de 9 muestras de DNA genómico del tejido colectado de hojas de roseta de plantas mutantes de la generación T<sub>3</sub> y WT se amplificaron mediante PCR bandas de aproximadamente 800 pb correspondientes a la amplificación de un extremo de T-DNA y parte del exón 1 del gen. Dichas bandas fueron amplificadas con los oligos AG21R y JL-202 (Figura 13 panel A). Para la amplificación del gen completo *FLOR1* en las mismas muestras se utilizaron los oligos FLOR 3 y FLOR 5. Los resultados del PCR se muestran en la figura 13, panel A segunda parte y panel B.

En el panel A las primeras nueve muestras de DNA de plantas mutantes *flor1* amplificaron una única banda de aproximadamente 800 pb que corresponde a la amplificación de un fragmento del borde izquierdo del inserto y un fragmento del gen *FLOR1*. En el siguiente carril (10, wt) no se observa ninguna banda, ya que es el control negativo para el inserto, es decir la reacción de PCR con los mismos oligos y DNA de una planta silvestre. En los siguientes 9 carriles no observamos amplificación para el gen completo *FLOR1* con los oligos FLOR 3 y FLOR 5, sin embargo, en el carril 10, el control positivo, se puede observar una banda de aproximadamente 1800 pb, correspondiente a la amplificación del gen *FLOR1* en una muestra de una planta WT.

Estos resultados indican que la línea EII3D-1 es homocíga dado que el 100% de las muestras presentó el inserto de T-DNA y no el gen completo.

## 2. La línea EII 3D-1 es una mutante nula para *FLOR1*.

El análisis de expresión del gen *FLOR1* mediante la técnica de RT-PCR de las plantas homocígas para la línea mutante *flor1* EII 3D-1 se puede observar en la figura 14.

Las reacciones de PCR realizadas con los oligos FLOR3 y FLOR5 y las muestras de DNA de flores e inflorescencias de plantas mutantes y plantas silvestres permiten demostrar que no existe expresión del gen *FLOR1*.

En los siete primeros carriles no se observa ninguna banda amplificada del gen *FLOR1* para las muestras de flores de plantas mutantes *flor1*. Dichas bandas corresponderían al transcrito del gen. En los siguientes cuatro carriles se observa una banda de aproximadamente 800 pb. Estas bandas corresponden a la amplificación del gen *FLOR1* en tejido de flores (8 y 10) e inflorescencias (9 y 11) de dos muestras de plantas silvestres ecotipo WS.

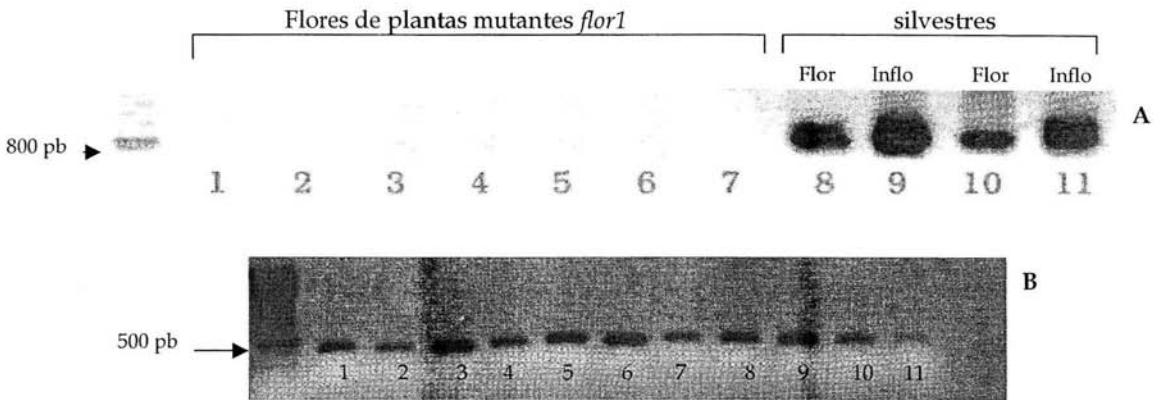


Figura 14. Expresión del gen *FLOR1* en la línea mutante *flor1*. En el panel A se muestra el análisis de RT-PCR para la amplificación del gen *FLOR1* a partir de cDNA de flores e inflorescencias de plantas mutantes *flor1* (1-7) y plantas silvestres (8-11). Las amplificaciones se observan únicamente en muestras de flores (carriles 8 y 10) e inflorescencias (carriles 9 y 11) de plantas silvestres ecotipo WS. En el panel B se observa la amplificación de tubulina como control positivo en las 11 muestras.

### 3. Las plantas mutantes *flor1*<sup>-/-</sup> no presentan fenotipo.

No se encontró ninguna diferencia entre las mutantes de *FLOR1* y las plantas silvestres WS en los siguientes parámetros: tiempo de germinación, tamaño de la radícula durante los seis primeros días a partir de su emergencia, número de hojas de roseta, tiempo de floración, altura, número de vainas y de hojas caulinas. Estos parámetros se observaron en diferentes réplicas.

Las plantas transgénicas de sobreexpresión para *FLOR1* de la línea 4 presentan un menor crecimiento y menor número de vainas.

Se midieron los siguientes parámetros: tiempo de germinación, tamaño de la radícula durante los seis primeros días a partir de su emergencia, número de hojas de roseta, altura, número de vainas y de hojas caulinas. Estos parámetros se determinaron en las dos líneas de sobreexpresión 1 y 4 y en plantas silvestres ecotipo Landsberg.

---

#### 4. Fenotipo de las líneas de sobreexpresión.

##### 4.1 Etapas tempranas

##### 4.1.2 Germinación de las semillas de líneas de sobreexpresión 1.39 y 4.10

De un total de 150 semillas sembradas en placas de petri con MS (50 semillas de la línea de sobreexpresión 1.39.30 y 50 semillas de la línea de sobreexpresión 4.10.11 así como 50 semillas de plantas silvestres ecotipo ler) se realizaron observaciones para registrar el día del comienzo de la germinación. Las contrucciones de estas líneas transgénicas hechas anteriormente se describen en Acevedo *et al.*, (2004)

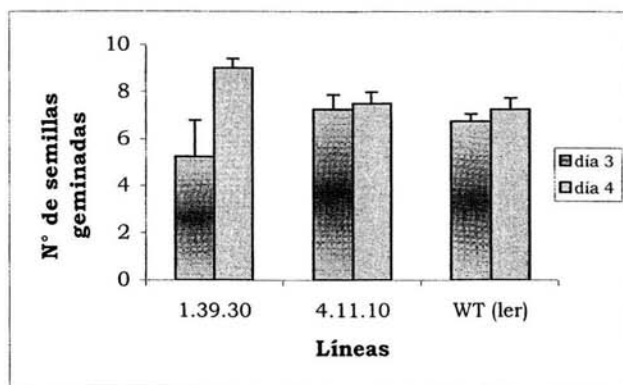


Figura 15. Gráfica que muestra la germinación de dos líneas distintas de sobre-expresión y de plantas silvestres (ler). Como se puede observar la germinación comenzó a ser registrada al tercer día post-siembra.. Las semillas se crecieron en placas con MS bajo condiciones de fotoperíodo largo. Las barras muestran el promedio de semillas germinadas por día para cada línea. No hubo diferencias significativas en la germinación entre las líneas.

La germinación de las semillas de las diferentes líneas se registró a partir del tercer día post-siembra. Se contó el número de semillas germinadas por placa y se hizo un promedio por día de las semillas germinadas de cada una de las líneas. Los datos de germinación de las tres líneas se sometieron a un Análisis de Varianza a partir de los cuales no se obtuvo diferencia significativa en la germinación entre las líneas (Figura 15).

#### 4.1.3 Tamaño de la radícula en líneas de sobreexpresión.

De un total de 150 semillas correspondientes a 50 semillas de las líneas de sobre-expresión 1.39.30 (10 semillas en 5 placas con MS), y 50 de la línea 4.11.10 así como 50 semillas de plantas silvestres (*ler*) crecidas bajo condiciones de fotoperíodo largo, se registró la longitud de las radículas por día a partir de la emergencia de estas. Los valores netos en cada línea fueron promediados y graficados por día. El día uno corresponde al día en que se observó la emergencia de la radícula en la mayoría de las semillas de las tres líneas.

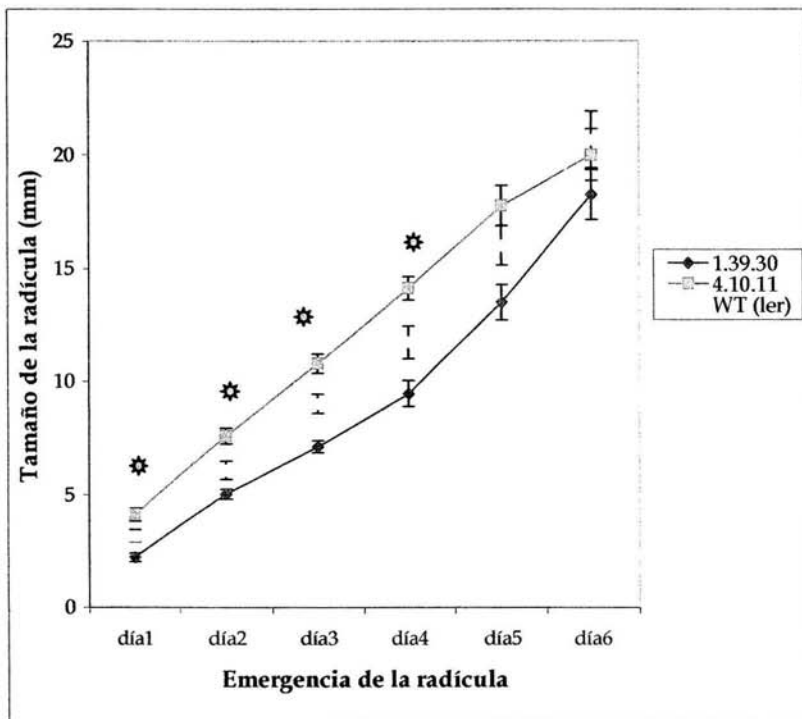


Figura 16. Gráfica que muestra la longitud de las radículas por día (en milímetros) de dos líneas de sobre-expresión para el gen *FLOR1* y una línea silvestre ecotipo Landsberg (*ler*). De un total de 50 semillas por línea sembradas bajo condiciones de fotoperíodo largo se midió el tamaño de la radícula por día y se promedió. Cada valor (promedio) por día, en cada línea, muestra el error estándar. El \* corresponde a  $p < 0.00001$

El de Análisis de Varianza realizado a partir de los registros netos del tamaño de la radícula por día, mostró diferencias significativas entre las tres líneas desde el día 1 hasta el día 4 obteniéndose los siguientes valores: Día 1  $F_{(2,94)} = 25.2308$   $p < 0.00001$ , día 2  $F_{(2,101)} = 17.840$   $p < 0.00001$ , día 3  $F_{(2,103)} = 26.495$   $p < 0.00001$ , día 4  $F_{(2,99)} = 14.982$   $p < 0.00001$ , En el día 5 se obtuvieron diferencias significativas  $F_{(2,93)} = 13.87$   $p = 0.000364$  y la prueba de Tukey HSD mostró que solo existían diferencias significativas entre la línea 1.39.30 y 4.11.10. En el día 6 no se encontraron diferencias significativas en la longitud de las raíces entre ninguna de las tres líneas  $F_{(2,93)} = 2.019$   $p = 0.138633$  (Figura 16).

Etapas tempranas del desarrollo								
	Promedio de semillas germinadas		Promedio del tamaño de la radícula (mm)					
	Día 3	Día 4	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Línea de sobreexpresión 1.39.30	<b>5.25</b> ±1.54	<b>9</b> ±0.4082	<b>2.24</b> ±0.18 ✱	<b>5.02</b> ±0.22 ✱	<b>7.12</b> ±0.27 ✱	<b>9.49</b> ±0.57 ✱	<b>13.49</b> ±0.79 ✱	<b>18.26</b> ±1.11
Línea de sobreexpresión 4.10.11	<b>7.25</b> ±0.62	<b>7.5</b> ±0.5	<b>4.11</b> ±0.27 ✱	<b>7.59</b> ±0.34 ✱	<b>10.79</b> ±0.42 ✱	<b>14.10</b> ±0.52 ✱	<b>17.75</b> ±0.89 ✱	<b>20.01</b> ±1.14
Línea silvestre (WS)	<b>6.75</b> ±0.31	<b>7.25</b> ±0.47	<b>3.19</b> ±0.26 ✱	<b>6.08</b> ±0.41 ✱	<b>9.00</b> ±0.42 ✱	<b>11.93</b> ±0.71 ✱	<b>16.0</b> ±0.87 ✱	<b>20.68</b> ±1.23

Tabla 1: Tabla que muestra los promedios (en negritas) ± el error estandar del número de semillas germinadas de líneas de sobreexpresión y plantas silvestres WS, en cajas de petri con MS al tercer y cuarto día post-siembra así como el promedio del tamaño de las radículas (mm) durante 6 días a partir del día de emergencia de la radícula. Las diferencias significativas entre las líneas, con un límite de confianza del 95% se marcan con ✱

#### 4.2 Fenotipo de plantas adultas de líneas de sobreexpresión

Los parámetros registrados a partir de 30 plantas transgénicas de sobreexpresión (15 plantas 1.39.30 y 15 plantas 4.11.10) y 15 plantas silvestres, fueron: altura máxima, número de vainas y número de hojas caulinas. Los promedios de las alturas máximas de las tres líneas se observan en la gráfica 3.

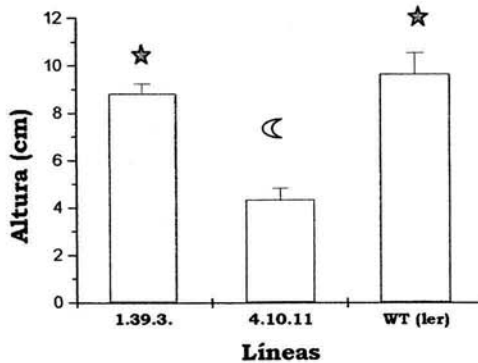


Figura 17. Gráfica que muestra el promedio de las alturas máximas de dos líneas distintas de plantas de sobreexpresión (1.39.30 4.11.10) y de plantas silvestres crecidas bajo condiciones controladas de fotoperíodo largo. Un total de 15 plantas por línea fueron medidas. Las barras muestran el promedio de las alturas en cada línea y el error estándar. Figuras diferentes por encima de las barras ★ ☾ marcan diferencia significativa  $p < 0.000001$ .

Los datos netos de cada línea fueron analizados mediante un ANOVA  $F_{(2,30)} = 23.4023$  y  $p = 0.000001$ . Los resultados en la prueba de Tukey muestran que existe diferencia significativa entre la altura de la línea de sobre-expresión 4.11.10 y la silvestre y entre las líneas transgénicas 1.39.30 y 4.11.10 pero no entre la altura de la línea de sobreexpresión 1.39.30 y la línea silvestre (Figura 17).

Otros parámetros cuantificados en las líneas de sobreexpresión para el gen *FLOR1* 1.39.30 y 4.11.10 fueron el número de hojas caulinas y el número de vainas. Como se muestra en la figura 18, los promedios de los valores para plantas silvestres y transgénicas fueron graficados y analizados también mediante una ANOVA.

Los resultados de los análisis arrojaron diferencias significativas en el número de vainas  $F_{(2,30)} = 23.0787$   $p = 0.000001$ . La prueba de Tukey mostró diferencias significativas entre la línea de sobre-expresión 4.11.10 y las plantas silvestres y entre las dos líneas de sobre expresión 1.39.30 y 4.11.10. No se encontró diferencia significativa en el número de vainas entre la línea transgenica 1.39.30 y las plantas silvestres.

En el análisis del número de hojas caulinas no se obtuvo ninguna diferencia significativa  $F_{(2,30)} = 1.0272$   $p = 0.370128$ .

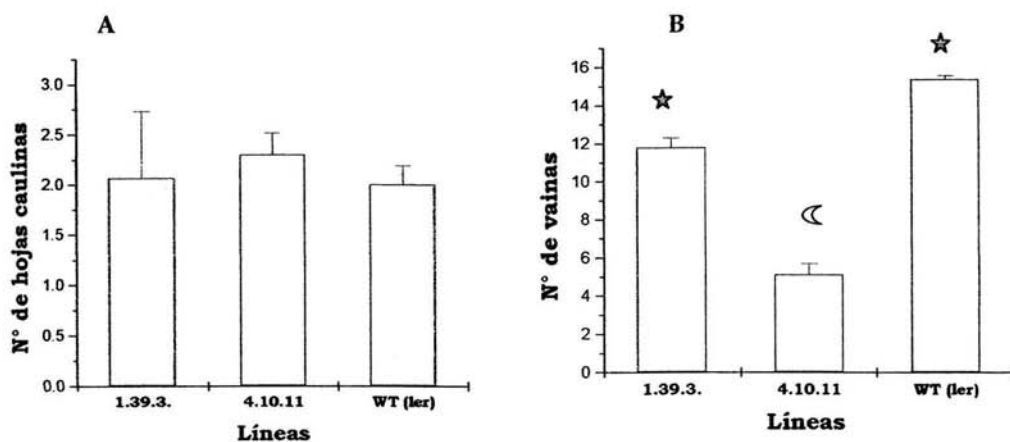


Figura 18. Gráficas que muestran la diferencia en el número de hojas caulinas (A) y el número de vainas (B) de dos líneas de sobre-expresión *FLORI* y plantas silvestres ecotipo *ler*. Las plantas fueron crecidas bajo condiciones de fotoperíodo largo. Un total de 15 plantas por línea se utilizaron para hacer las mediciones y los valores obtenidos en cada planta se promediaron. La ANOVA mostró diferencia significativa en el número de vainas. Las diferencias significativas entre las líneas se muestran con figuras diferentes ★ ☾.

Los resultados obtenidos desde las primeras etapas del desarrollo y las observaciones de otros parámetros realizadas durante etapas más tardías del desarrollo en las plantas mutantes *flor1*, como fueron el tiempo de emergencia del escape de la inflorescencia o tiempo de floración, la altura, el número de vainas, el número de hojas de rosetas y hojas caulinas, entre otros, no arrojaron ninguna señal de diferencia entre las plantas silvestres y las plantas mutantes bajo diferentes condiciones de crecimiento de luz continua y fotoperíodo por lo que no se muestran los datos obtenidos.



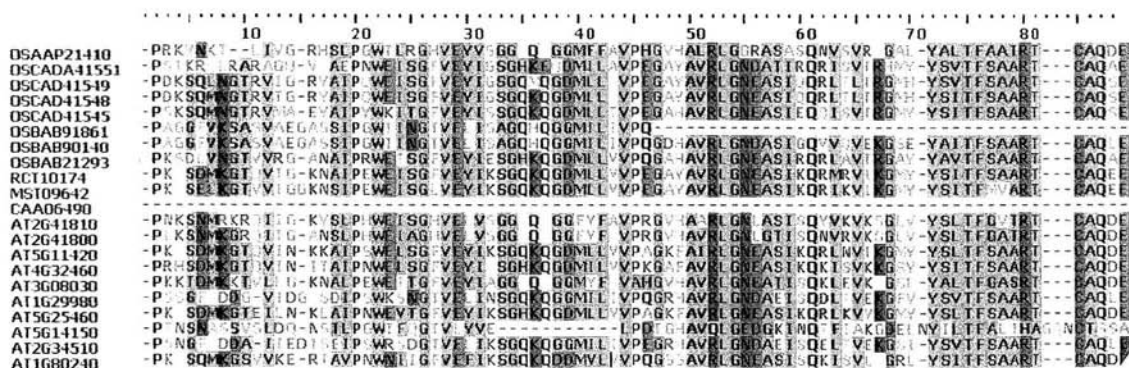
Plantas adultas			
	Altura máxima (cm)	N° de vainas	N° de hojas caulinas
Línea de sobreexpresión 1.39.30	<b>8.82</b> ±0.41 ★	<b>11.8</b> ±0.74 ★	<b>2.06</b> ±0.06
Línea de sobreexpresión 4.11.10	<b>4.32</b> ±0.50 ⊂	<b>5.1</b> ±0.55 ⊂	<b>2.3</b> ±0.21
Línea silvestre (ler)	<b>9.60</b> ±0.89 ★	<b>15.37</b> ±1.80 ★	<b>2</b> ±0.18

Tabla 2: Tabla que muestra los promedios (en negritas) ± el error estandar de la altura máxima, el número de vainas y el número de hojas caulinas de plantas adultas de líneas transgénicas de sobreexpresión y plantas silvestres ecotipo ler. Figuras diferentes ★ ⊂ marcan diferencias significativas entre las líneas con un límite de confianza del 95 %.

### 5. Alineación de las secuencias de proteínas.

Con el objeto de determinar el grado de homología entre las diferentes proteínas reconocidas como miembros de la familia DUF642 se realizó la alineación de las secuencias de aminoácidos (Figura 19). Un total de 21 secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas registradas como DUF 642 fueron comparadas,

Una porción al final (25 aminoácidos en promedio) y al inicio de cada proteína (45 aminoácidos en promedio, incluido el péptido señal) se omitió en los análisis. Las bandas de diferentes colores señalan la identidad o similitudes entre las secuencias peptídicas.



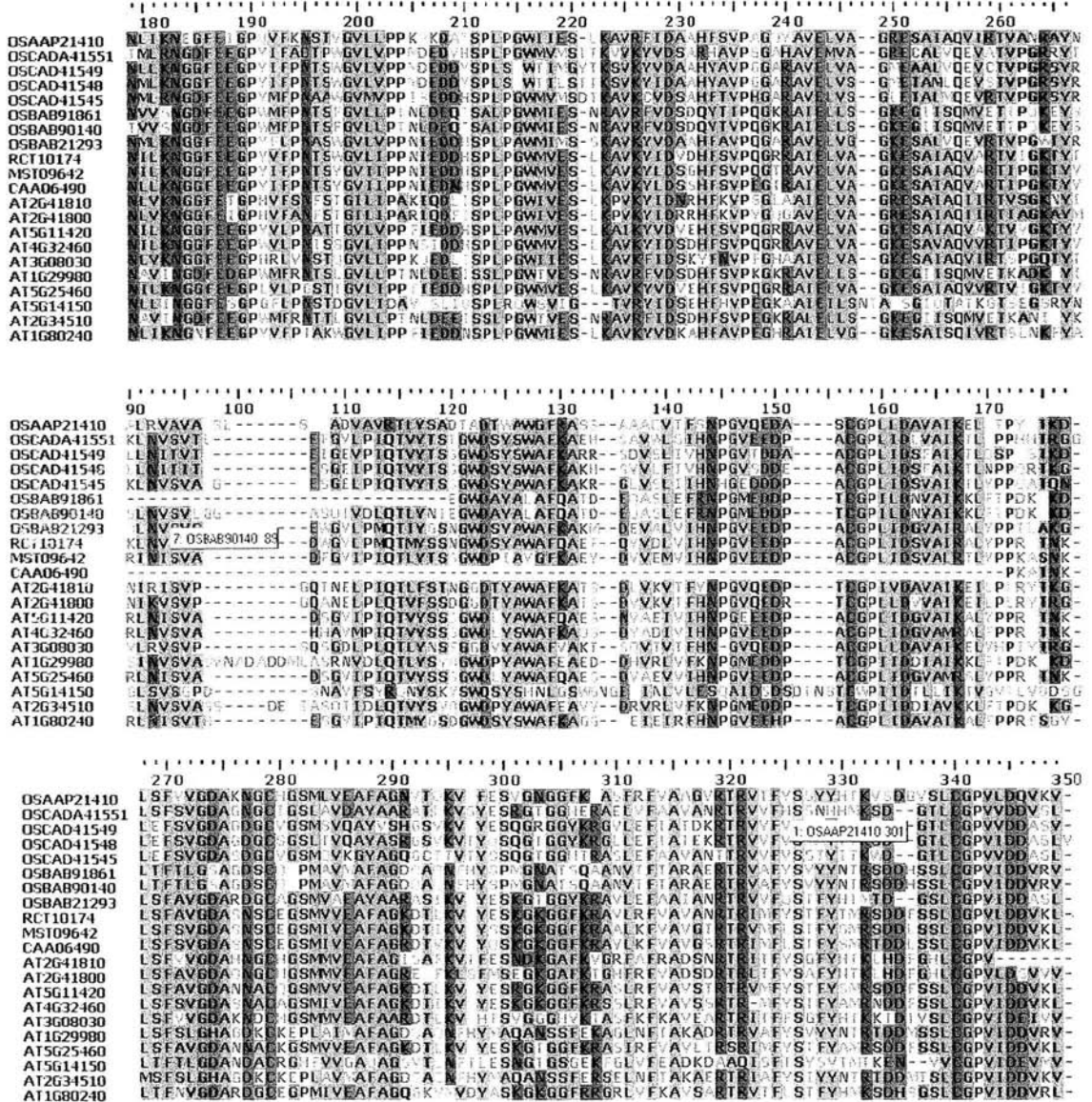


Figura 19. Alineación múltiple de secuencias correspondientes a proteínas con un dominio desconocido DUF642. Las secuencias pertenecen a proteínas de las especies *Oriza sativa* (OS), *Ricinus comunis* (RC), *Medicago satioa* (MS), *Cicer arietinum* y *Arabidopsis thaliana* (AT). Las secuencias fueron alineadas en Bioedit Sequence Alignment.

**6. Las proteínas de *Arabidopsis* codificadas por los genes At3g08030, At2g41810 y At2g41800 se agrupan en el mismo clado que la proteína de arroz OSAAP21410.**

El análisis de máxima parsimonia que se realizó con las 21 proteínas de diferentes especies registradas que poseen un dominio DUF642 se muestra en la figura 20. Las proteínas de *Arabidopsis* se distribuyeron a lo largo de los diferentes clados agrupadas con las proteínas de otras especies. El clado al que pertenece la proteína de arroz incluye las proteínas de *Arabidopsis* codificadas por los genes At3g08030, At2g41810 y At2g41800.

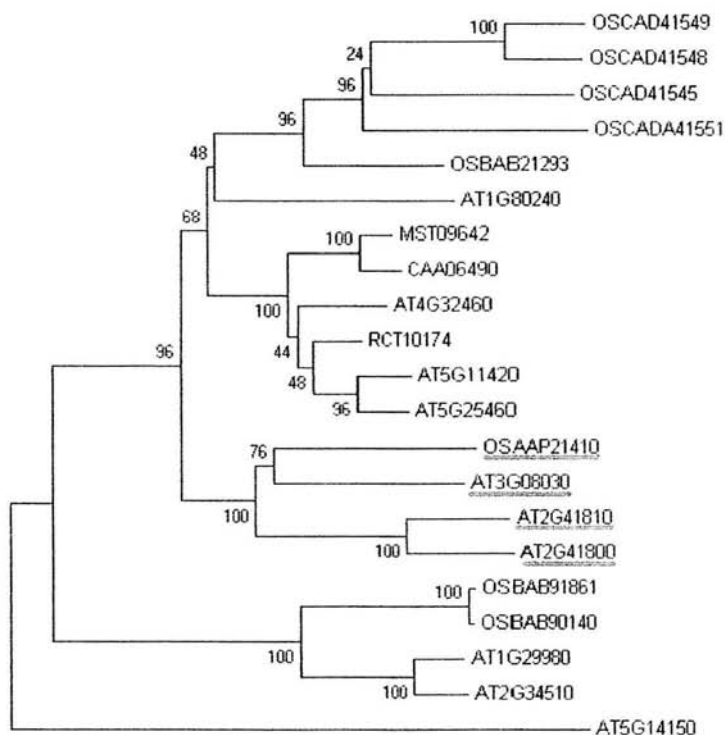


Figura 20. Filogenia de proteínas con dominio desconocido DUF642 de diferentes especies de plantas. En el análisis fueron incluidas 10 proteínas de *Arabidopsis thaliana*, 8 de *Oriza sativa* (arroz), 1 de *Ricinus communis*, 1 de *Medicago sativa* (alfalfa), y 1 de *Cicer arietinum* (garbanzo). El árbol se obtuvo a partir de una análisis de Máxima Parsimonia (MS). Los números en las ramas muestran el soporte entre las ramas o bootstraps (100 réplicas).

Se escogió analizar primero la expresión del gen At2g41810 debido a que se encontró una línea mutante de este gen en el banco de SALK INSTITUTE.

### 7. Estructura del gen At2g41810.

El gen At2g41810 presenta tres exones y dos intrones <http://www.arabidopsis.org/index.jsp> (Figura 21).

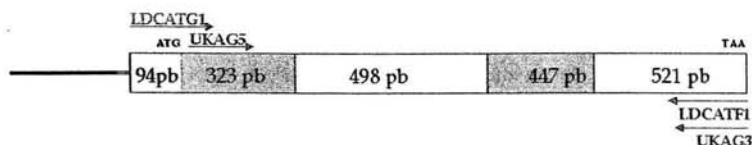


Figura 21. Estructura del gen At2g41810 que codifica para una proteína de dominio desconocido DUF642 homóloga a la proteína de arroz AAP21410. El gen está constituido por tres exones (en amarillo) de 94 pb, 498 pb y 521 pb respectivamente y dos intrones (en verde) de 323 pb y 447 pb. El gen posee un promotor de 5393 pb y una UTR de 53 pb. La localización de los oligos utilizados para la amplificación del gen completo se muestra también en esta figura

### 8. El gen At2g41810 se expresa exclusivamente en flor.

Mediante la técnica de RT-PCR se pudo determinar el sitio de expresión de este gen, At2g41810, que codifica para una proteína DUF642.

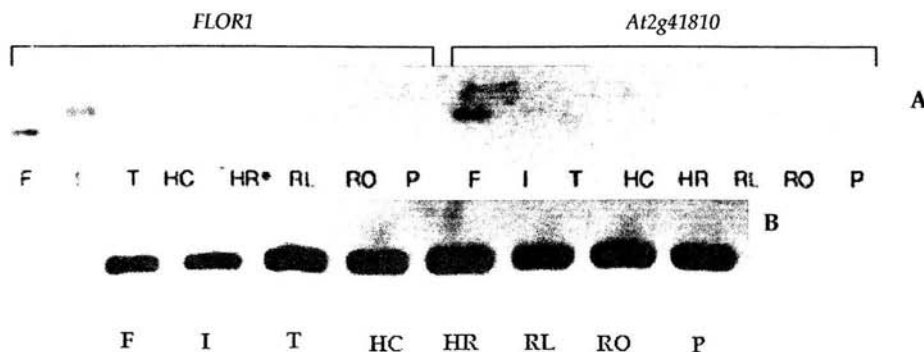


Figura 22. Expresión del gen At2g41810 en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* (A). El cDNA de flores (F), inflorescencias (I), tallo (T), hojas caulinas (HC), hojas de roseta (HR), raíces de plantas que fueron crecidas en luz continua (RL) y raíces de plantas que fueron crecidas en oscuridad se utilizaron como templado para amplificaciones de PCR usando los oligos LDCATG Y LDCATF1. Una banda de 1100 pb correspondiente al gen At2g41810 se observa en la muestra de flor. La amplificación específica de FLOR1 en flores e inflorescencias se utilizaron como control (dos primeras bandas). También se amplificó tubulina para verificar la calidad del cDNA y como control positivo (B).

---

Las amplificaciones con los oligos FLOR 3, FLOR 5, LDCATG y LDCATF1 a partir de cDNA de diferentes tejidos pueden ser observadas en la figura 22.

Las muestras de PCR fueron cargadas en el siguiente orden: flor, inflorescencia, tallo, hoja caulina, hoja de roseta, raíz con luz, raíz sin luz y plántula o seedling. Las primeras dos bandas en el carril 1 y 2 corresponden a la amplificación del gen *FLOR1* que es específica de flores e inflorescencias. En los siguientes 6 carriles no hay expresión.

En los siguientes 8 carriles se cargaron las reacciones de PCR realizadas con los mismos tejidos en el mismo orden pero amplificando esta vez el gen *At2g41810*, como se puede observar existe únicamente una banda en el carril número 9 correspondiente a la muestra de flor.

## 9. Obtención de una línea mutante homóciga por inserción de T-DNA en el locus *At2g41810*.

### 9.1 Localización del inserto del T-DNA en el locus *At2g41810*

Mediante el análisis de las secuencias obtenidas a partir de la clonación de las bandas amplificadas con los oligos LBB1 y LDCATF1 en muestras de DNA genómico de plantas mutantes para el gen *At2g41810* se logró establecer el sitio exacto de inserción del T-DNA (Figura 19).

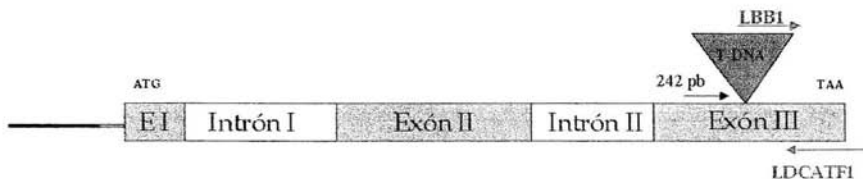


Figura 23. Localización del inserto de T-DNA en el gen *At2g41810*. El inserto de 5420 pb se localizó en la base 242 del último exón.

Como se puede observar en la figura 23, el inserto de T-DNA de 5420 pb se localizó en el tercer y último exón del gen *At2g41810*, casi a la mitad de este en la base número 242.

---

## 9.2 Establecimiento de una línea mutante homociga en el locus At2g41810 por genética clásica.

Al hacer la búsqueda de la línea mutante homociga para la inserción se obtuvieron los siguientes resultados de PCR.

En la figura 24 se observan bandas de aproximadamente 400 pb que fueron obtenidas con los oligos LDCATF1 y LBB1 que se unen a un fragmento del gen At2g41810 y a un fragmento del borde izquierdo del T-DNA respectivamente. Mediante PCR no se pudieron amplificar bandas para el gen completo en muestras de plantas mutantes ni en muestras de plantas silvestres, por lo que la homocigosis de la mutación únicamente se asumió mediante genética clásica ya que en todas las muestras utilizadas (13), que correspondían a plantas mutantes de la generación T<sub>3</sub> elegidas aleatoriamente de un total de 30 plantas, se observó la banda esperada de aproximadamente 400 pb.

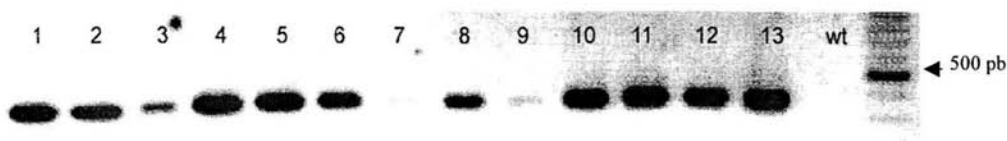


Figura 24. Análisis de PCR a partir de muestras de plantas mutantes por inserción de T-DNA en el locus At2g41810. Las bandas (carriles 1-13) de aproximadamente 400 pb, amplificadas con los primers LBB1 y LDCATF corresponden a un fragmento del borde izquierdo del T-DNA y a un fragmento del exón III de este gen. En la muestra de la planta control (wt) no se observa amplificación.

Para 13 muestras de plantas mutantes en el locus At2g41810 se puede observar una banda del tamaño esperado de aproximadamente 400 pb correspondiente al extremo izquierdo de la inserción de T-DNA y una parte del exón 3 que es interrumpido. El carril final muestra que no existió amplificación en el control negativo con la muestra de una planta silvestres.

## 10. Caracterización del fenotipo de las plantas mutantes homocigas para el gen *At2g41810* en condiciones de fotoperíodo largo

Se midieron un total de 25 plantas silvestres y 25 plantas mutantes.

Los parámetros medidos en plantas silvestres ecotipo Col y en plantas mutantes para el gen *At2g41810*, crecidas bajo condiciones de fotoperíodo largo fueron: altura, número de vainas, número de hojas de rosetas, número de hojas caulinas, número de ramificaciones y tiempo de emergencia del escapo de la inflorescencia. Los promedios de cada parámetro fueron graficados y comparados con los promedios de plantas silvestres (Figura 25 y 26).

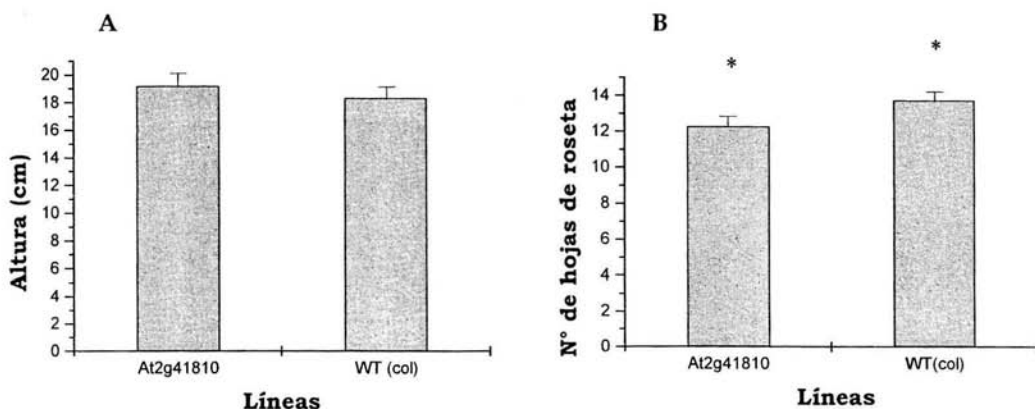


Figura 25. Gráficas que muestran la comparación en altura máxima (A) y el número de hojas de roseta (B) cuantificadas al momento de aparición del escapo de inflorescencia entre plantas mutantes *At2g41810* y plantas silvestres ecotipo Col crecidas bajo condiciones de fotoperíodo largo (16 L: 8 O). Fueron medidas un total de 25 plantas silvestres y 25 mutantes. Una prueba de T para muestras independientes resultó ser marginalmente significativa  $t_{(1,25)} = -2.003422$   $p = 0.047476$  para el número de hojas de roseta de plantas silvestres y plantas mutantes *At2g41810* (\*).

Los valores registrados para cada parámetro fueron analizados mediante una prueba de T para datos independientes. Sólo se observaron diferencias significativas entre las plantas silvestres y las plantas mutantes en el número de hojas de roseta. Las pruebas estadísticas para ver si existían diferencias significativas en la altura entre las plantas mutantes y las silvestres, el número de hojas caulinas y el número de vainas no mostraron diferencias significativas.

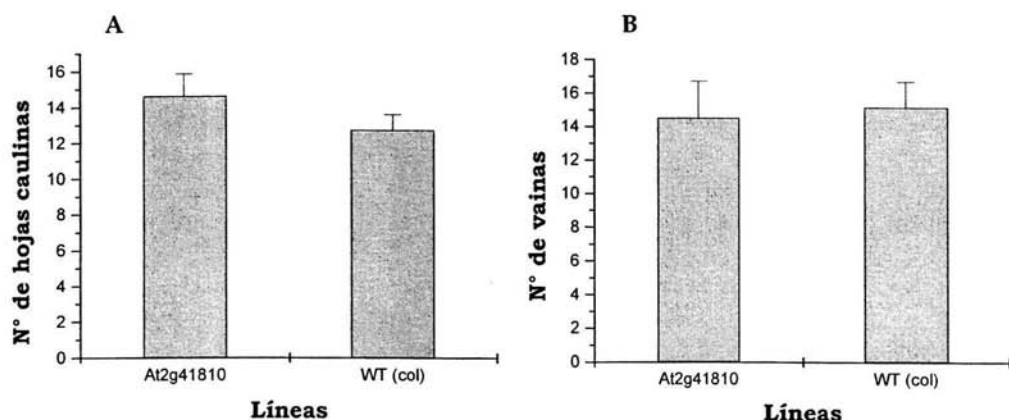


Figura 26. Gráficas que muestran la comparación en el número de hojas caulinas (A) y número de vainas (B) entre plantas mutantes *At2g41810* y plantas silvestres ecotipo Col crecidas bajo condiciones de fotoperiodo largo. Las barras muestran el error estandar (S) del promedio en cada caso. La prueba de T no mostró diferencias significativas entre las plantas mutantes y las silvestres.

Plantas adultas				
	Altura máxima (cm)	N° de hojas de roseta	N° de hojas caulinas	N° de vainas
Plantas mutantes <i>At2g41810</i>	<b>19.2</b> ±0.89	<b>12</b> ±0.55 *	<b>14.64</b> ±1.23	<b>14.52</b> ±2.18
Plantas silvestres (Col)	<b>18.32</b> ±0.80	<b>13.76</b> ±0.47 *	<b>12.72</b> ±0.85	<b>15.16</b> ±1.52

Tabla 3: Tabla que muestra el promedio (en negritas) ± el error estandar de la altura máxima el número de hojas de roseta, el número de hojas caulinas y el número de vainas de plantas mutantes para el locus *At2g41810* y plantas silvestres ecotipo Col. Diferencias marginalmente significativas se encontraron en el número de hojas de roseta entre plantas de la línea mutante y plantas silvestres \*. Para cada línea n=25.



---

## VII. DISCUSIÓN

Hace ya más de una década que *Arabidopsis thaliana* ha servido como una planta modelo en diferentes líneas de investigación. Es gracias a la disponibilidad de bancos genéticos de ésta y otras especies que se ha logrado profundizar en algunos de los procesos esenciales del desarrollo en plantas. La obtención de mutantes homocigas nulas de T-DNA para genes específicos es una herramienta de gran ayuda, sin embargo, es común que en numerosas ocasiones se dificulte la identificación de un fenotipo asociado con una mutación (Douglas, 2001; Krysan, 1999).

La obtención de una línea mutante homociga para el gen *FLOR1* permitirá hacer inferencias más detalladas sobre las funciones de este gen durante el desarrollo. Los resultados obtenidos indican que la inserción del T-DNA en el exón 1 impide la transcripción del gen y por lo tanto no existe expresión del mRNA. A pesar de ello, los datos arrojados por los análisis de crecimiento mostraron que la mutación nula para el gen *FLOR1* no produce ningún efecto visible durante el desarrollo de las plantas, sin embargo, algunos reportes recientes apoyan la hipótesis de que un gen de la familia LRR que codifica para una proteína que únicamente presenta el dominio LRR como es el caso de *FLOR1*, podría estar jugando un papel muy importante en las vías de transducción de señales que regulan los procesos de organogénesis floral. *OsFOR1* es la proteína LRR homóloga, al igual que *FLOR1*, a una PGIP (proteína inhibidora de la Poligalacturonasa). El análisis de expresión de otros genes florales, en plantas transgénicas indican que *OsFOR1* también podría estar regulando genes involucrados durante el desarrollo floral en arroz y de esta manera participar en la determinación del número de órganos florales, a pesar de que *OsFOR1* también presenta una actividad de PGIP al inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* (Jang *et al.*, 2003).

En el genoma completo del arroz se han identificado únicamente tres PGIP's entre las que se encuentra la proteína *OsFOR1* la cual es codificada por un único gen. En arroz también se ha descrito otra proteína que pertenece a esta misma familia que está involucradas en procesos de desarrollo; la proteína *OsLRK1* que codifica para una LRR proteína-cinasa que es altamente homóloga a *CLV1* y también participa en la determinación del meristemo (Kim *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado una proteína altamente homóloga a la proteína *FLOR1*. Muchas de las familias multigénicas y gran parte del genoma de *Arabidopsis* han sido blanco de eventos de duplicación muy importantes. Se sabe, por ejemplo, que en el cromosoma 2 de *Arabidopsis* existen 239 duplicaciones

---

---

en tandem que involucran a 593 genes, además el 60% de las proteínas predichas presentan proteínas relacionadas u homólogas con secuencias altamente conservadas (Meyerowitz, 1999). En el caso de los factores de transcripción MADS-box, los eventos de duplicación han convertido a esta gran familia en uno de los ejemplos más importantes que ilustran la especialización de las funciones a partir de las variaciones de secuencias ancestrales (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Martínez-Castilla *et al.*, 2003).

Un análisis de secuencias expresadas solo en flores de *Arabidopsis* demuestra la existencia de al menos 7 proteínas LRR's, incluyendo la codificada por el locus At3g12148, cuyas funciones no han sido definidas (Hu, *et al.*, 2003). Es posible que la función de alguna de estas proteínas sea redundante con la función que desarrolla FLOR1 durante la cascada de transducción de señales, este puede ser un motivo por el cual no se observó un fenotipo particular ni en la mutante nula ni en la línea de sobre-expresión de la proteína completa. La función de FLOR1 en el desarrollo de *Arabidopsis* podría ser esclarecida con dobles mutantes que incluyan algunas de estas proteínas.

La línea de sobreexpresión 1, que corresponde a la proteína completa, tampoco presentó un fenotipo. Por otro lado, los análisis de las plantas transgénicas de sobre-expresión con la proteína incompleta (línea 4) sí desplegaron alteraciones en su desarrollo ya que muestran menor altura y un menor número de vainas. Se ha descrito que la sobre-expresión de proteínas incompletas puede causar alteraciones en el desarrollo de las plantas (Shpak *et al.*, 2003).

Existen muchas proteínas que son funcionales cuando se combinan e interactúan específicamente con otras proteínas. La determinación de estas interacciones permite establecer las funciones esenciales de las redes genéticas involucradas en la transducción de señales (Immink, 2002). Se ha confirmado que muchos o la mayor parte de los genes en el genoma de una célula podrían estar involucrados en cascadas transduccionales permitiendo un equilibrio entre las señales internas de la planta y las condiciones ambientales. Las vías internas y los complejos de transducción de señales son importantes para asegurar la estabilidad de la morfogénesis de hojas, tallos, flores y raíces.

La plasticidad como una capacidad de adaptación en las plantas es un mecanismo en el que están involucrados, moléculas tales como las citocininas, auxinas, etileno, giberelinas, brasinoesteroides, jasmonatos y algunas otras hormonas peptídicas. La participación de estas hormonas vegetales incrementa la complejidad del entendimiento de los procesos y redes genéticas internas que dan lugar a los procesos del desarrollo. Es por eso que dichos procesos deben estar soportados internamente por una serie de redes genéticas. Dentro de estas mismas redes las interacciones proteína-proteína representan uno de los principales

---

---

mecanismos de transducción que permitirán la comunicación celular. (Trewavas, 2002).

La estructura LRR de FLOR1, como la de todas las proteínas descritas en esta familia, indica que es una proteína cuya función está relacionada con las interacciones proteína-proteína. Es posible que la proteína incompleta sobre-expresada de FLOR1 sí presente el sitio de unión a la caja MADS de los factores de transcripción, pero no la región de aminoácidos necesaria para interactuar con VSP1 y probablemente con otras proteínas. El hecho de que se presente un fenotipo sólo en la línea 4, que corresponde a la proteína incompleta, sugeriría la importancia de los sitios de reconocimiento en FLOR1 y por tanto la importancia de las interacciones de FLOR1 con otras proteínas. Estas interacciones son finalmente las determinantes para una correcta señalización durante las cascadas transduccionales involucradas durante el desarrollo. Nuevos trabajos más detallados sobre la interacción de FLOR1 con otras proteínas serán necesarios para entender la importancia de la función de la proteína FLOR1 durante el desarrollo.

También es importante reconocer que el patrón básico y la identidad de la parte aérea de las plantas están determinados por el meristemo apical. Tanto los órganos laterales como los internodos se generan a partir de distintos dominios del meristemo apical y en este último ocurren continuamente la diferenciación y proliferación celular. El tamaño final y la forma de una planta se determinan a partir de las divisiones celulares localizadas y la expansión celular durante la morfogénesis de los órganos de la planta (Shpak *et al.*, 2003). La expresión ectópica y constitutiva de FLOR1 puede estar relacionada con las vías de regulación de proliferación celular en el meristemo vegetativo de las plantas. La presencia de FLOR1 en el SAM podría ser la causa de las alteraciones en el crecimiento del eje principal, que está determinado por el meristemo. Para CLV1 la expresión está detectada tanto en el meristemo vegetativo como en el meristemo de inflorescencia. En las mutantes CLV1, por ejemplo, se pueden observar alteraciones en el número de órganos florales. De igual manera los patrones de expresión y la identidad molecular de la LRR protein-cinasa ERECTA apoyan la idea de que esta proteína media las rutas de señalización célula-célula coordinando el crecimiento de los órganos del brote (Shpak *et al.*, 2003).

Por otro lado, los hallazgos de la existencia de mecanismos genéticos conservados durante el desarrollo floral en las eudicotiledóneas está sustentado gracias a los análisis hechos en especies tales, como *Arabidopsis* y *Antirrhinum* (Weigel & Meyerowitz, 1994). Los estudios enfocados hacia otras especies de importancia agronómica como *Zea mays*, *Oriza sativa* y otras monocotiledóneas (Tzeng *et al.*, 2003) también han permitido confirmar la existencia de ciertos mecanismos genéticos persistentes, involucrados en la morfogénesis floral de estas especies pertenecientes al grupo de las monocotiledóneas. Este grupo de plantas

---

---

divirgió de las eudicotiledóneas hace aproximadamente 180 millones de años y las flores de este grupo muestran estructuras muy distintas a las de las dicotiledóneas (Kaplinsky, 2003; Mena, 1996; Theissen, 2001). Se dice que un gen es ortólogo de otro cuando ambos genes pudieron haber originado de un gen ancestral común durante la evolución.

Anteriormente se han descrito algunos de los genes involucrados en el desarrollo de *A. thaliana*, y muchas de las investigaciones se han enfocado a tratar de determinar si los mismos modelos de redes genéticas pueden ser aplicados en otras especies. A través de esta búsqueda se han logrado caracterizar genes homólogos, cuyas secuencias conservadas y análisis de interacción demuestran presentar una alta similitud a los genes ya caracterizados, por lo que en algunos casos se han propuesto como genes ortólogos (Jong-Seong, *et al.*, 2000; Münster *et al.*, 2000; Chuck *et al.*, 2002; Bomblies *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2004).

El gran número de mutantes en *Zea mays* que afectan la identidad meristemática y la conversión de identidades, ha convertido al maíz en un poderoso sistema de estudio (Kaplinsky, 2003). El maíz es una planta monoica que presenta dos tipos de inflorescencias unisexuales. Las inflorescencias masculinas forman una panícula de espiguillas en el ápice de la planta y las inflorescencias femeninas crecen en las axilas de las hojas. Las flores de estas inflorescencias se desarrollan alrededor de un eje. Se ha hablado de estructuras homólogas entre las flores de las eudicotiledóneas y el grupo de los pastos a pesar de las grandes diferencias entre las estructuras reproductivas de estos dos grupos. Estas homologías han permitido hacer inferencias de los genes que se han conservado durante la evolución del desarrollo floral y nuevas investigaciones se están desarrollando para entender sus funciones (Theissen, 2000).

Nuestro interés por comprender las funciones de las proteínas que interactuaron *in vitro* con un dominio MADS llevó al aislamiento de una proteína de maíz homóloga a una proteína DUF642 en *Arabidopsis thaliana*. Este mismo interés se vio estimulado con los resultados obtenidos a partir de los diferentes análisis realizados con esta familia de proteínas.

Los registros de la familia DUF642 revelaron, en principio, que esta familia está presente únicamente en plantas. La alineación realizada con las 21 proteínas DUF642 descritas nos muestra que este dominio está bastante conservado aún entre proteínas de diferentes especies, es decir, que la identidad entre las secuencias es muy alta (Figura 19). Datos previos hacían suponer que la proteína homóloga en *A. thaliana* a la de maíz, podría también expresarse únicamente en las flores, pues la expresión de esta misma proteína en arroz AAP21140 se había reportado en panículas de arroz y meristemo apical.

---

---

El análisis filogenético nos permitió definir las relaciones entre las proteínas DUF642 a través del análisis de parsimonia el cual nos mostró la existencia de clados combinados, es decir, hay proteínas de *Arabidopsis thaliana* relacionadas con proteínas tanto de *Ricinus communis* como de *Oriza sativa* en ramas a su vez relacionadas con *Cicer arietinum* y *Medicago sativa* (Figura 20). Este análisis nos sugirió la posibilidad de que alguna de las proteínas codificadas por los locus At3g08030, At2g41800 y At2g41810 estén relacionadas con la proteína de arroz AAP21140 y que pudieran expresarse únicamente en las flores de *Arabidopsis thaliana*.

Nosotros elegimos hacer primero el análisis de la proteína DUF642 codificada por el locus At2g41810 ya que durante la búsqueda de mutantes en SALK pudimos hallar una mutante por inserción de T-DNA en dicho locus.

Los análisis de expresión mediante la técnica de RT-PCR para el gen At2g41810 proporcionaron más evidencias sobre la posibilidad de que esta proteína pudiera estar involucrada en el desarrollo floral. Como se muestra en la figura 17, se pudo comprobar la expresión de este gen únicamente en tejido de flores mientras que en ningún otro tejido fue detectado. La obtención de una línea mutante homóciga para el locus At2g41810 fue el siguiente paso. Los análisis de las secuencias pudieron ayudarnos a determinar la localización en el exón 3 del inserto de 5410 pb (Figura 23). La obtención de la línea homóciga no se pudo comprobar por PCR ya que la amplificación del gen completo en plantas silvestres no se corroboró a pesar de que se hicieron amplificaciones con distintos oligos, sin embargo, semillas de la generación T<sub>3</sub> fueron crecidas y analizadas; y en estos análisis de un total de 13 plantas el 100% presentó la inserción de T-DNA en el locus At2g41810.

Existen varios ejemplos de genes con secuencias altamente conservadas entre especies cuyas funciones son similares y existen también ejemplos de las funciones antagonistas de algunos otros genes con secuencias homólogas. Se sabe que muchos de los genes homólogos que participan durante las distintas etapas del desarrollo floral y durante la transición a la floración pueden tener papeles redundantes o antagonistas (Araki, 2001).

La proteína DUF642 es una proteína que al igual que FLOR1 interactúa *in vitro* con dominios MADS. Su función es aún un misterio pues son necesarias más investigaciones, sin embargo, los datos obtenidos nos hacen pensar que es una proteína que probablemente esté participando durante el desarrollo de las plantas y específicamente durante el desarrollo de la flor.

---

---

Las plantas mutantes para el locus At2g41810 que codifica para esta proteína de función desconocida, no desplegaron fenotipo alterado. Existe otro gen codificado por el locus At2g41800 que está en tandem y que es altamente homólogo a la proteína DUF642 seleccionada en este trabajo. La redundancia funcional podría ser uno de los motivos por los que no se observó fenotipo en dichas mutantes.

Los resultados obtenidos en este trabajo sustentan la posibilidad de que la función de las proteínas FLOR1 y DUF 642 este relacionada con los procesos de desarrollo a través de su interacción con otras proteínas incluyéndolos factores de transcripción de la familia MADS. El establecimiento de las plantas mutantes nulas es una herramienta fundamental para el estudio de la función de estas proteínas a pesar de que éstas no presentaron ninguna alteración en el desarrollo de acuerdo a los parámetros estudiados. El uso de dobles mutantes permitirá profundizar en el entendimiento de las funciones de FLOR1 y DUF642 durante el desarrollo de *Arabidopsis*.

---

## VIII. CONCLUSIONES

1. Las plantas mutantes nulas *flor1* no presentan ninguna alteración en el fenotipo, debido tal vez a la redundancia funcional con otras proteínas homólogas LRR's de flor que no han sido caracterizadas.
2. La línea 1 de sobre-expresión que expresa la proteína completa no muestra ningún fenotipo. Las plantas de la línea 4 de sobre-expresión de FLOR1 fueron las únicas en presentar un fenotipo alterado al mostrar una menor altura y un menor número de vainas. El fenotipo de la línea 4 puede ser consecuencia de la falta de sitios de reconocimiento en la proteína FLOR1 para interactuar con otras proteínas incluyendo VSP1. La interacción de FLOR1 con estas otras proteínas puede ser crucial durante las vías de transducción de señales que determinan el patrón de desarrollo en las plantas.
3. El dominio de función desconocida de las proteínas pertenecientes a la familia DUF642 está altamente conservado en diferentes especies de plantas. Dicho dominio no tiene asignada ninguna función conocida, sin embargo, es probable que, al igual que el dominio LRR de FLOR1, participe en la interacción con otras proteínas como pueden ser los factores de transcripción MADS-box. Estas interacciones pueden ser determinantes durante el desarrollo general de la planta o específicamente durante el desarrollo floral.
4. El análisis filogenético realizado con las proteínas reportadas DUF642 de diferentes especies nos muestra ramas agrupando a ciertas proteínas de *Arabidopsis* con proteínas de *Medicago sativa*, *Cicer arietinum*, *Oriza sativa* y *Ricinus communis*. Este análisis nos permite confirmar la relación estrecha que existe entre proteínas pertenecientes a diferentes especies más que a proteínas pertenecientes a la misma especie. Es posible que este análisis sencillo nos permita confirmar la existencia de relaciones de ancestría y por lo tanto mecanismos genéticos conservados durante el desarrollo.
5. El gen del locus At2g41810 es un gen que se expresa únicamente en flores en *Arabidopsis*.
6. Las plantas mutantes para la proteína DUF642 codificada por el locus At2g41810, no presentan ninguna alteración durante el desarrollo. Esto puede ser consecuencias de funciones redundantes entre genes desconocidos.

---

## IX. PERSPECTIVAS

La obtención de líneas mutantes dobles de *FLOR1* y su proteína homóloga, pueden ser un primer paso, aunque también es factible que la obtención de mutantes dobles de *VSP1* y *FLOR1* sea una herramienta útil para el estudio de la función de *FLOR1* ya que la interacción de estas proteínas puede ser clave durante el desarrollo floral.

Para comprobar la interacción *in vitro* de la proteína DUF642 se podría construir una columna de afinidad. En dicha columna se adheriría la proteína recombinante DUF642, y se pasaría el dominio MADS de la proteína AGAMOUS esto nos permitiría probar si existe una interacción *in vitro* entre la proteína de *Arabidopsis* DUF642 y el dominio MADS del factor de transcripción AGAMOUS.

Como parte del estudio de las posibles funciones de la familia DUF642 es necesario conocer el o los sitios de expresión de estos genes. El análisis de expresión para cada uno de los genes hasta ahora reportados como DUF642 en *Arabidopsis* (son 10) nos ayudaría a determinar si estos genes, al igual que el codificado por el locus At2g41810, son o no específicos de flor. Es posible que algunos de estos genes sean específicos de flor mientras otros no, sin embargo, si para alguno o algunos resultase una expresión específica el análisis de las mutantes podría ser también muy útil. Hasta el momento sabemos que ya existen mutantes para los locus At2g41810, At2g41800, At5g11420, At4g32460 y At1g29980 en los exones. El establecimiento de líneas homocigas mutantes nos permitiría obtener líneas mutantes dobles para algunos de estos genes y así posiblemente entender la función del dominio de función desconocida DUF642 de estas proteínas.



---

---

## X. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- ❖ Acevedo FG., Gamboa A., Paéz-Valencia J., Jiménez-García LF., Izaguirre-Sierra M., Alzare-Buylla E. (2004). FLOR1 a putative interaction partner of floral homeotic protein AGAMOUS, is a plant specific intracellular LRR. *Plant Science*. 167:225-231
  - ❖ Alvarez J., Smyth D. (1999). *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development*. 126: 2377-2386.
  - ❖ Alvarez-Buylla E., Pelaz S., Liljegren S., Gold SE., Burgeff C., Ditta GS., Ribas de Pouplana L., Martinez-Castilla L., Yanofsky MF. (2000). An ancestral MAS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS*. 97 (10): 5328-5333.
  - ❖ Alvarez-Buylla., Liljegren SJ., Pelaz S., Gold se., Burgeff C., Ditta., GS., Vergara-Silva F., Yanofsky MF. (2000'). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cell, root and trichomes. *The Plant Journal*. 24(4): 457-466.
  - ❖ Araki T. (2001). Transition from Vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 63-68.
  - ❖ Baum DA., Doebley J., Irish V. F., Kramer EM. (2002). Response: Missing links: the genetic architecture of flower and floral diversification. *TRENDS in Plant Science*. 7 (1): 31-34.
  - ❖ Barton M., Poething S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development*. 119: 823-831.
  - ❖ Bendetti CE. (1995). Coi1-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol*. 109 (2): 567-72.
  - ❖ Berger S., Bell E., Sadka A., Mullet JE. (1995). *Arabidopsis thaliana* AtVsp is homologous to soybean Vsp $\alpha$  and Vsp $\beta$ , genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Mol. Biol.*, 27 (5): 933-42.
- 
-

- 
- ❖ Berger S., Bell E., Mullet JE. (1996). Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding, *Plant Physiol.* 111 (2): 525-531.
  - ❖ Berger S., Mitchell-Olds T., Stotz HU. (2002). Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum.* 114:85-91.
  - ❖ Blazquez M., Greem R., Nilsson O., Sussman MR, Weigel D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell.* 10(5): 791-800.
  - ❖ Blazquez M., Koornneef M., Putterill J. (2001). Flowering on time: genes that regulate the floral transition. Workshop on the molecular basis of flowering time control. *EMBO.* 21(12): 1078-82.
  - ❖ Blazquez., M. (2000). Flower development pathways. *J. Cell Sci.* 113 (20): 3547-3548.
  - ❖ Bomblies K., Wang RL., Ambrose BA., Schmidt RJ., Meeley RB., Boebley J. (2003). Duplicate *Floricaula/Leafy* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development.* 130: 2385-2395.
  - ❖ Bowman J., Smyth DR., Meyerowitz EM. (1989). Genes Directing Flower Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 1 : 37-52.
  - ❖ Bowman J., *An Atlas of Morphology and Development*, Springer-Verlag, New York 1994, 450 p.
  - ❖ Boyes D., Zayed AM., Ascenzi R., McCaskill AJ., Hoffman NE., Davis KR., Görlach J. (2001). Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell.* 13: 1499-1510.
  - ❖ Brad U., Margit G., Martin H., Simon R. (2002). Regulation of *CLV3* Expression by Two Homeobox Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 129: 566-575
  - ❖ Busch M., Bomblies K., Weigel D. (1999). Activation of Floral Homeotic Gene in *Arabidopsis*. *Science.* 285: 585-587.
-

- 
- ❖ Chuck G., Muszynski M., Kellogg E., Hake S., Schmidt R. (2002). The Control of Spikelet Meristem Identity by the branched *silkless1* Gene in Maize. *Science*. 298:1238-1241.
  - ❖ Clark S. (2001). Meristems: start your signaling., *Current Opinion in Plant Biology*., 4:28-32.
  - ❖ Clark S., Running MP., Meyerowitz EM. (1995). *CLAVATA3* is specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development*. 121: 2057-2067.
  - ❖ Coen E., Nugent J. (1994). Evolution of flowers and inflorescences., *Development*., 107-106.
  - ❖ Coen ES., Meyerowitz EM. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. 353 (6339):31-7
  - ❖ Conner J., Zhongchi L. (2000). *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *PNAS*. 97: 12902-12907.
  - ❖ Crane P., Friis EM., Pedersen R. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature*. 374: 27-33.
  - ❖ Dean RT., Sheldon CC., Bagnall DJ., Peacock WJ., Dennis ES. (2002). *FLC*, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *The Plant Journal*. 29 (2): 183-191.
  - ❖ Desiderio A., Aracri B., Leckie f., Mattei B., Salvi G., Tigelaar H., Van Roekel JS., Baulcombe DC., Melchers LC., De Lorenzo G., Cervone F. (1997). Polygalacturonase-Inhibiting Proteins (PGIP's) with different Specificities are Expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10(7): 852-860.
  - ❖ DeWald D. (1992). The SOYBEAN vegetative Storage proteins VSP $\alpha$  and VSP $\beta$  are Acid Phosphatases Active on Polyphosphates. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(22) 15958-18964.
  - ❖ Fan HY. (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant Journal*. 12 (5):999-1010.
-

- 
- ❖ Favaro R., Pinyopich A., Battaglia R., Kooiker M., Borghi L., Ditta G., Yanofsky MF., Kater MM., Colombo L. (2003). MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 15: 2603-2611.
  - ❖ Ferrario S., Immink GH., Angenet GC. (2004). Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 84-91.
  - ❖ Gallois JL., Wood Ward C., Reddy GV., Sablowski R. (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. 129 (13): 3207-17.
  - ❖ Gamboa A., Paéz-Valencia J., Acevedo FG., Vázquez Moreno L., Alvarez Buylla E. (2001). Floral transcription Factor AGAMOUS Interacts in Vitro with a Leucine- Rich Repeat and Acid Phosphatase Protein Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288: 1018-1026.
  - ❖ Gustafson- Brown C., Savidge B., (1994). Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Cell*. 76 (1): 131-43.
  - ❖ Hayama R., Coupland G. (2003). Shedding light on the circadian clock and photoperiodic control of flowering. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 13-19.
  - ❖ Honma T., Goto K. (2001). Complexes of MADS -BOX proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*. 409: 525-529.
  - ❖ Hu W., Wang Y., Bowers C., Ma H. (2003). Isolation, sequence analysis, and expression studies of florally expressed cDNA's in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 53: 545-563.
  - ❖ Immink R., Gandella TW., Ferrario S., Busscher M., Angenet GC. (2002). Analysis of MADS box protein- protein interactions in living plant cell. *PNAS*. 99 (4): 2416-2421.
  - ❖ Jack T. (2001). Plant Development going MADS. *Plant Molecular Biology*. 46: 515-520.
  - ❖ Jong JS., Jang S., Lee S., Nam J., Kim C., Lee SH., Chung YY., Kim Sr., Lee Hy., Cho YG., An G. (2000). *Leafy hull sterile1* Is a Homeotic Mutation in Rice MADS- Box Gene Affecting Flower Development. *The Plant Cell*. 12: 871-884.
-

- 
- ❖ Kajava A. (1998). Structural Diversity of Leucine-rich Repeat Proteins. *Journal of Molecular Biology*. 277:519-527.
  - ❖ Kajava A., Kobe B. (2002). Assessment of ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information. *Protein Science*. 11: 1082-1090.
  - ❖ Kaplinsky N., Freeling M. (2003). Combinatorial control of meristem identity in maize inflorescences. *Development*. 130: 1149-1158.
  - ❖ Kobe B., Kajava A. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*. 11: 725-732.
  - ❖ Koornneef M., Alonso-Blanco C. Peeters JM., Soppe W.. (1998). Genetic Control of flowering time in *Arabidopsis*. *Ann. Rev. Plant Physiology. Plant Molecular Biol.* 49: 345-370.
  - ❖ Krysan PJ., Young JC., Sussman MR. (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 11: 2283-2290.
  - ❖ Kyojuka J., Shimamoto K. (2002). Ectopic Expression of OsMADS3, a Rice Ortholog of *AGAMOUS*, Caused a Homeotic Transformation of Lodicules to Stamens Transgenic Rice Plants. *Plant Cell Physiology*. 43 (1): 130-135.
  - ❖ Laux T., Mayer KF., Berger J., Jürgens G. (1996). The *WUSCHEL* genes is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*. 122: 87-96.
  - ❖ Laux T., Jurgens G. (1997). Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell*. 9(7): 989-1000.
  - ❖ Lawton- Rauh A., Alvarez-Buylla E., Purugganan MD. (2000). Molecular Evolution of flower development. *TREE*. 15 (4) 144-148.
  - ❖ Lenhard M. Bohnert A., Jüegens G., Laux T. (2001). Termination of Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Floral Meristems by Interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell*. 105: 805-814.
  - ❖ Lim MH, Kim J., Kim YS., Chung KS., Seo YH., Lee I., Kim J., Hong CB., Kim HJ., Park CM. (2004). A new *Arabidopsis* Gene, *FLK*, Encodes an RNA Binding Protein with K Homology Motifs and Regulates Flowering Time via *Flowering Locus C*. *The Plant Cell*. 16: 731-740.
-

- 
- ❖ Lin X., Kaul S., Rounsley S., Shea TP., Benito ML., Town CD., Fujii CY., Mason T., Bowman CL., Barnstead M. (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 402, 761-768.
  - ❖ Mandel MA., Gustafson-Brown C., Savidge B., Yanofsky ME. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature*. 360(6401):273-7.
  - ❖ Márquez-Guzman J., Engleman M., Martínez-Mena A., Martínez E., Ramos CH. (1989). Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Miss. Bot. Gard.* 76:128-135.
  - ❖ Martínez-Castilla L., Alvarez-Buylla E. (2003). Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *PNAS*. 100(23): 13407-13412.
  - ❖ Mayer KF, Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jüegens G., Laux T. (1998). Role of *WUSCHEL* in Regulating Stem Cell Fate in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Cell*, 95 (6): 805-15.
  - ❖ Mayer K., Schuller C., Wambutt R., Murphy G., Volckaert G., Pohl T., Dusterhoft A., Stiekema W., Entian KD., Terry N. (1999). Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 402, 761-768.
  - ❖ Medford J., Behringer FJ., Callos JD., Feldmann KA. (1992). Normal and Abnormal Development in the *Arabidopsis* Vegetative Shoot Apex. *The Plant Cell*. 4:631-643.
  - ❖ Mena M., Ambrose BA., Meeley RB., Briggs SP., Yanofsky MF., Schmidt RJ. (1996). Diversification of C-Functions Activity in Maize Flower Development. *Science*. 274: 1537- 1540.
  - ❖ Meyerowitz E. (1999). Today we have naming of parts. *Nature*. 402: 731-732.
  - ❖ Michael SD, Amasino RM. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*. 11 (5): 949-56.
  - ❖ Michaels S., Amasino R. (2000). Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell and Environment*. 23: 1145-1153.
-

- 
- ❖ Meinke, DW., Cherry JM., Dean C., Rounsley SD., Koornneef M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*. 282 (5389): 662, 679-82.
  - ❖ Mittelsten S. (1998). Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (2): 632-637
  - ❖ Mizukami Y., Ma H. (1997). Determination of *Arabidopsis* floral Meristem Identity by *AGAMOUS*. *The Plant Cell*. 9 : 393-408.
  - ❖ Münster T., Wingel Lu., Faigl W., Wert S., Saedler H., Teissen G. (2001). Characterization of three GLOBOSA-like MDS-box genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *GENE*. 262:1-13.
  - ❖ Nakagawa M., Shimamoto K., Kyzuka J, (2002). Overexpression of RCN1 and RCN2, rice TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS homologs, confer delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. *The Plant Journal*. 29 (6): 743-750.
  - ❖ Nei M., Kumar., *Molecular Evolution and Phylogenetics* (2000). Ed. Oxford, New York. 51-85, 118-164 p.p
  - ❖ Nilson O., Weigel D. (1997). Modulating the timing of flowering. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 195-199.
  - ❖ Parcy F., Nilsson O., Busch MA., Lee I., Weigel D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature*. 395: 561-566.
  - ❖ Patrick K. (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 11: 2283-2290.
  - ❖ Purugganan M. (1998). The molecular evolution of development. *BioEssays* 20: 700-711.
  - ❖ Ratcliffe OJ., Amaya I., Vincent CA., Rothstein S., Carpenter R., Coen Es., Bradley DJ. (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*. 125 (9): 1609-15.
  - ❖ Rounsley S., Ditta GS., Yanofsky MT. (1995). Diverse roles for MADS- Box genes in *Arabidopsis* Development. *The Plant Cell*. 7: 1259-1269.
-

- 
- ❖ Saedler H., Becker A., Winter KU., Kirchner C., Theissen G. (2001). MADS-box genes are involved in floral development and evolution. *Acta Biochimica Polonica*. 48 (2): 351-358.
  - ❖ Salanoubat M., Lemcke K., Rieger M., Ansorge W., Unseld M., Fartmann B., Valle G., Blocker H., Pérez-Alonso M., Obermaier B. (2000). Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 820-822.
  - ❖ Schoof H., Lenherd M., Haecker A., Mayer K., Jürgens G., Laux T. (2000) The Stem Cell Population of *Arabidopsis* Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* Genes. *Cell*. 100: 635-644.
  - ❖ Shannon S., Meeks-Wagner. (1993). Genetic Interactions That Regulate Inflorescence Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 5: 639-655.
  - ❖ Shore P., Sharrocks A. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J. Biochem*. 229 (1): 1-3.
  - ❖ Shpak E. D., Lakeman M. B., Torii K.U. (2003). Dominant-Negative Receptor Uncovers Redundancy in the *Arabidopsis* ERECTA Leucine-Rich-Repeat Receptor-Like Kinase Signaling Pathway That Regulates Organ Shape. *The Plant Cell*. 15: 1095-1110.
  - ❖ Simpson G., Gendall R., Dean C. (1999). When to switch to Flowering. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 99: 519-50.
  - ❖ Simpson G., Dean C. (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta Stone of flowering Time. *Science*. 296: 285-289.
  - ❖ Simpson GG., Dijkell PP, Quesada V., Henderson I., Dean C. (2003). FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell*. 113 (6): 777-87.
  - ❖ Soppe WJ., Koornneef M. (1999). The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 126(21) : 4763-70.
  - ❖ Suh S., Choi KR, Lee I. (2003). Revisiting Phase Transition during Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*. 44 (8): 836-843.
-



- 
- ❖ Tabata S., Kaneko T., Nakamura Y., Kotani H., Kato T., Asamizu E., Miyajima N., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T. (2000). Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 823-826
  - ❖ Theissen G. (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 75-85.
  - ❖ Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim JT., Munster T., Winter KU., Saedler H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42 (1): 115-149
  - ❖ Theissen G., Saedler H. (2001). Floral quartets. *Nature*. 409: 459-471.
  - ❖ Theologis A., Ecker JR., Curtis JP., Federspiel NA., Kaul S., Venter C. (2000). Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816-820.
  - ❖ Trewavas, A. (2002). Plant Cell Signal Transduction: The Emerging Phenotypes. Supplement The Plant Cell.
  - ❖ Tzeng, TY., Hsiao CC., Chi PJ., Yang CH. (2003). Two *Lily SEPALLATA*-Like Genes Cause Different Effects on Floral Formation and Floral Transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 133: 1091-1101.
  - ❖ Utsagi S., Sakamoto W., Murata M., Motoyoshi F. (1998). *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gen organization and tissue-specific expression. *Plant Molecular Biology*., 38: 565-576.
  - ❖ Vogler H., Kuhlemeier C. (2003). Simple hormones but complex signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 51-56.
  - ❖ Weigel D., Alvarez J., Smyth Dr., Yanofsky MF., Meyerowitz EM. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*. 69(5): 843-59
  - ❖ Weigel D., Meyerowitz EM. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*. 78 (2): 203-9.
  - ❖ Wilson RN., Somerville CR. (1995). Phenotypic Suppression of the *Gibberellin-Insensitive Mutant (gai)* of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 108 (2): 495-502.
-

- 
- ❖ Yanovsky MJ., Kay SA. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*. 419 (6904): 308-12.
  - ❖ Xiao X., Xu J., Zhai W., Zhu L. (2003). Functional analysis of the rice AP3 homologue *OsMADS16* by RNA Interference. *Plant Molecular Biology*. 52: 957-966.
  - ❖ Zoe AW., *Arabidopsis a Practical Approach*, 2000 Oxford University Press, New York, 275 p.

**I. Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* modificado de (Maíz Leaf Mini DNA Prep)**

1. Cortar 2 hojas de roseta y colocarlas en un tubo eppendorf limpio y estéril, congelar el tubo en nitrógeno líquido.
2. Triturar el tejido congelado en el tubo utilizando para ello un palito de plástico previamente esterilizado. Moler el tejido con ayuda del vortex hasta pulverizarlo.
3. Agregar al tejido pulverizado 500 µl de amortiguador de extracción de DNA\*, agitar con vortex y mantener a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Agregar 500 µl de fenol-cloroformo isoamílico (25:24:1), agitar por inversión y mantener a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 12500 rpm.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 1/10 de acetato de sodio 3M.
7. Agregar 350 µl de isopropanol, mezclar por inversión y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm.
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 150 µl de Etanol al 70 %.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm y eliminar el sobrenadante.
11. Dejar secar el pellet y resuspenderlo en 20 µl de ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas GIBCO (Invitrogen Corporation).

\*Amortiguador de extracción para DNA (100 ml)

20 ml 1M Tris-HCl, pH 7.5

5 ml 5M NaCl

5 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

5 ml 10% SDS

65 ml ddH<sub>2</sub>O

---

---

## II. Extracción de RNA total

Moler al menos 100 mg de tejido en nitrógeno líquido y homegenizar con 1 ml de trizol (Invitrogen Life Technologies), mezclar con vortex.

Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.

Añadir 200 µl de cloroformo y mezclar por inversión 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.

Centrifugar a 4° C por 15 minutos a 10000 rpm.

Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 500 µl de isopropanol, mezclar por inversión e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 4° C durante 15 minutos a 10000 rpm.

Decantar y lavar el pellet con 1 ml de EtOH al 75%, mezclar con vortex.

Centrifugar a 4° C por 5 minutos a 10000 rpm.

Decantar y volver a centrifugar con EtOH al 75 %.

Secar 5 minutos y resuspender el pellet en 20 µl de dH<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

Almacenar el RNA a - 70 °C.

*Nota. Por cada 100 mg de tejido utilizar 1 ml de trizol, si cambia la cantidad de muestra agregar proporcionalmente el trizol.*

## III. Síntesis de cDNA

1. Poner los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas:

1 µl de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µg / ml) o 2 pmoles de oligo gen-específico.

1 µl de RNA total

1 µl de dNTP's Mix 10 mM a pH neutro

Llevar la mezcla a un volumen total de 12 µl con agua estéril destilada.

- 
2. Calentar el tubo a 65° C durante 5 min y poner inmediatamente en hielo. Dar un spin al tubo y agregar: 4 µl de amortiguados 5X First-Strand y 2 µl de DTT.
  3. Mezclar el contenido del tubo gentilmente e incubar a 42 °C durante 2 min.
  4. Agregar 1 µl (200 unidades) de Super Script II Transcriptasa Reversa (Invitrogen Life Technologies) y mezclar pipeteando gentilmente.
  5. Incubar 50 min a 42 °C.
  6. Inactivar la reacción calentando a 70 °C durante 15 min.

#### **IV. CLONACIÓN DE UNA BANDA (purificación, ligación transformación, cultivo, extracción de DNA plasmídico, digestión y secuenciación)**

La banda que desea ser clonada se corre en un gel de agarosa al 1%

##### **Gel de agarosa**

1. Para preparar un gel de agarosa al 1%, disolver la agarosa en amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA 0.05 X). Para ello calentar en el horno de micro-ondas durante 1 min y dejar enfriar un poco antes de agregar el Bromuro de etidio (Normalmente 6 µl de Bromuro de etidio por cada 100 ml)
2. Cargar y correr la muestra de PCR en su totalidad a 100 V en el gel de agarosa 1% utilizando 2 µl LB (Amortiguador de carga) + la muestra. Poner 5 µl de marcador 100 pb.

##### **Purificación de bandas de DNA en gel de agarosa con SGW (Siliconized Glass Wool)**

1. Hacer un agujero en un tubo de 0.5 ml con una guja de insulina.
  2. Introducir el SGW hasta que abarque 30% del tubo.
  3. Cortar la banda del gel y colocarla en el tubo de 0.5 ml.
  4. Colocar este tubo de 0.5 ml en uno de 1.5 ml y centrifugar 10 min a 6000 rpm.
  5. Agregar 1/10 de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na (acetato de sodio) 3M más 2.5 volúmenes de EtOH al 100%.
-

- 
6. Incubar en hielo durante 10 min.
  7. Centrifugar a 1300 rpm durante 10 min.
  8. Quitar el sobrenadante con pipeta, con mucho cuidado de no disturbar el pellet.
  9. Lavar con 200  $\mu$ l de EtOH al 70 %.
  10. Centrifugar a 1300 rpm por 3 min.
  11. Eliminar el sobrenadante.

Secar el pellet por 15 min a temperatura ambiente.

Resuspender en 10  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

#### **Ligación del fragmento de DNA aislado del gel de agarosa**

1. Preparar la mezcla de ligación en un tubo eppendorf de 0.5 ml:
  - a) 5  $\mu$ l de amortiguador de ligación 2x
  - b) 0.5  $\mu$ l Vector PGEAM-T/PGEAM-T easy
  - c) 1  $\mu$ l T4 ligasa
  - d) 3.25  $\mu$ l de DNA
2. Poner la mezcla de ligación en el refrigerador (4° C) y dejarla toda la noche.

#### **Transformación (*E. coli*)**

Se necesita previamente:

- Hielo
- Tubos con medio LB
- Placas con medio LB + carbenicilina
- Block a 42 ° C
- Shaker o agitador a 37 °C y 200-250 rpm

En presencia de mechero:

1. Sacar células competentes (TOP 10) del REVCO -70° C y poner en hielo (descongelar eventualmente con la mano).

- 
2. Añadir 50  $\mu$ l de células competentes a cada tubo de ligación. Mezclar suavemente por pipeteo.
  3. Incubar en hielo 20 min.
  4. Incubar las células a 42 °C de 45 a 50 seg y regresar al hielo.
  5. Añadir 950  $\mu$ l de medio LB líquido a cada tubo.
  6. Incubar 1 h 30 min a 37 °C en agitación a 250 rpm.
  7. Preparar placas de medio LB con carbenicilina (1-2 placas por tubo) con:

- |                                    |   |                              |
|------------------------------------|---|------------------------------|
| a) 20 $\mu$ l de X- Gal (50 mg/ml) | } | Distribuir con asa de vidrio |
| b) 100 $\mu$ l IPTG (0.1M)         |   |                              |

8. Centrifugar 1 min a 6000 rpm.
9. Retirar 800  $\mu$ l de sobrenadante. Resuspender el pellet en los 100  $\mu$ l restantes y plaqurear 50  $\mu$ l por cada caja de Petri con asa de vidrio.
10. Incubar toda la noche a 37 °C. Después poner en refrigeración.

### **Cultivo para MINIPREP**

Para cada cepa que resulte con el inserto (cepas color blanco) y que se elija para crecer, realizar el siguiente procedimiento al mechero:

1. Añadir 6  $\mu$ l de carbenicilina (100 mg/ml) a un tubo con 6 ml de medio LB.
2. Picar con un palillo estéril una colonia transformante (blanca) de la caja de Petri y ponerla en el tubo.

Nota: si es un cultivo líquido secundario a partir de un cultivo líquido inicial, tomar 5  $\mu$ l del cultivo inicial y añadirlo el tubo ( medio LB + carbenicilina).

3. Incubar toda la noche a 37° C con agitación 100-200 rpm.
  4. Usarlo directamente para extraer plásmido o guardarlo a 4° C hasta que se haga extracción y/o stock de glicerol.
-

---

---

### Extracción DNA plasmídico por miniprep: STET o lysis alcalina

#### Boiling mini-prep: Amortiguador STET

*Nota: En un vaso de precipitados poner agua a hervir al comenzar este procedimiento.*

1. Poner 1.5 ml de cultivo en un tubo eppendorf en presencia de mechero.
2. Centrifugar 1 min a 8000 rpm y quitar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 150  $\mu$ l de amortiguador STET (con vortex).
4. Añadir 10  $\mu$ l de Lisozima (10 mg/ml) (con vortex).
5. Incubar durante 40 seg en H<sub>2</sub>O hirviendo.
6. Centrifugar 10 min a 10000 rpm. quitar el pellet con palillo.
7. Añadir 150  $\mu$ l de Isopropanol frio. Mezclar y dejar 30 min a -20 °C.
8. Centrifugar 15 min a 12500 rpm a 4°C. Quitar el sobrenadante.
9. Añadir EtOH al 70% aproximadamente 100  $\mu$ l.
10. Centrifugar 5 min a 12500 rpm. Quitar el sobrenadante y dejar que seque el pellet. Resuspender en 20  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

11. Añadir 1  $\mu$ l de RNAsa (10mg/ml) e incubar
- 30 min a  $\nearrow$  37° C  
toda la  $\searrow$   
la noche 4° C

#### STET para preparar 250 ml total.

En 200 ml de dH<sub>2</sub>O agregar los siguientes reactivos en el mismo orden:

20 g de Sacarosa

1.25 ml Triton X-100

25 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

12.5 ml Tris 1M ph 8.0

Aforar a 250 ml y esterilizar por filtración almacenar a 4° C en botella de cristal.

---

---



---

### Digestión del plásmido.

**PGEM-T:** cortar con NdeI y SacII

**PGEM-T easy:** cortar con Eco RI o NotI o (NdeI + SacII)

Para preparar Master Mix para 10 muestras:

Amortiguador 10 X (4 biolabs)	10 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
NdeI (20 u/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
SacII (20 u/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Volumen final	20 $\mu$ l

*Nota: preparar siempre Master Mix para el número de muestras por digerir más una muestra (n+1). Mezclar el volumen final y darle un spin.*

Para cada muestra preparar un tubo con:

7.a Muestra obtenida por Boiling mini-prep	7.b Muestra obtenida por Wizard mini-prep
5 $\mu$ l muestra (DNA plásmido)	3 $\mu$ l muestra (DNA plásmido)
3 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O
2 $\mu$ l Master Mix	2 $\mu$ l Master Mix
Volumen final: 10 $\mu$ l	Volumen final: 10 $\mu$ l

1. Incubar 1-2 horas a 37°C.
2. Añadir 2  $\mu$ l LB (Amortiguador de carga) a cada tubo y mezclar por pipeteo.
3. Correr la totalidad de la muestra en gel de agarosa al 1% (usar gel al 2% si se espera un fragmento de  $\approx$  200 pb) colocando 5  $\mu$ l de marcador 100 pb.

---

---

## Secuenciación

Para purificar el plásmido PGEM-T easy cuyo fragmento insertado se deseaba mandar a secuenciar se utilizó el Kit de purificación de plásmido QIAprep Spin Miniprep (250) de QIAGEN.

### Stock Glicerol para conservar plásmidos con el fragmento deseado.

1. En presencia de mechero poner en tubos eppendorf estériles 250  $\mu$ l de glicerol estéril al 30% y 250  $\mu$ l del cultivo líquido.
2. Mezclar por inversión
3. Almacenar en REVCO a  $-70^{\circ}\text{C}$

### V. Lavado y esterilización de semillas

1. Colocar las semillas en un tubo eppendorf y agregar 1 ml de agua estéril. Dejar reposar durante 10 min. Con agitación ocasional.
2. Eliminar el agua y agregar EtOH al 70 % y dejar agitar ocasionalmente durante 5 min.
3. Eliminar EtOH, agregar solución para lavado (Cloro 5%, SDS 1%) y agitar ocasionalmente de 15 a 20 min.
4. Lavar al menos 5 veces con ddH<sub>2</sub>O
5. Dejar en 1 ml de ddH<sub>2</sub>O y guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### VI. Medio de Cultivo MS (Murashige-Skoog)

*Nota: Para preparar un litro de medio de cultivo la cantidad de MES, de vitaminas (Tiamina 1mg/ml, Piridoxina 5mg/ml y Nicotinamida 5mg/ml) y de agar es la misma, independientemente de la concentración de sales MS o de sacarosa*

	1000 ml	500 ml	250 ml	100 ml
Sales MS 1X	4.4 g	2.2	1.1 g	0.44 g
Sacarosa	10 g	5 g	2.5 g	1 g
MES	0.5 g	0.25 g	0.125 g	0.05 g
Vitaminas MS (1000X)	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	0.1 ml
Agar	8 g	4 g	2 g	0.8 g

---

---

---

Para 1 litro de cultivo:

1. Pesar sales MS
2. Disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O
3. Pesar la sacarosa y agregarla a la solución anterior
4. Pesar 0.5 g de MES y agregarlo a la solución anterior
5. Agregar 100 µl de vitaminas MS a la solución anterior
6. Ajustar el pH a 5.7 con KOH
7. Aforar a un litro Dividir la solución en dos matraces de una litro cada uno
8. Agregar 4 gramos de agar a cada matraz (no mezclarlo)
9. Esterilizar en autoclave
10. Dejar enfriar y vaciar en cajas de petri

## VII. Southern Blot.

1. Agregar 3 µl de amortiguador de carga a las muestras de PCR que se van a hibridar.
  2. Cargarlas en un gel de agarosa al 1% y correr las muestras.
  3. Colocar el gel en un recipiente de vidrio y desnaturalizarlo durante 30 min con una solución de NaOH 0.4 N y NaCl 0.6 M.
  4. Eliminar la solución desnaturalizante y neutralizar el gel durante 30 min con una solución 0.5 M Tris pH 7.5 NaCl 1.5 M.
  5. Transferir el DNA contenido en el gel a una membrana de nylon durante toda la noche con SSC 10X pH 7.5
  6. Desmontar la transferencia y marcar con lápiz la cara de la membrana que estuvo en contacto con el gel.
  7. Fijar el DNA a la membrana mediante rayos UV en el crosslinking Stratalinker 2004, dos veces a 1200 µJoules X 100.
  8. Prehibridar la membrana con 10 ml de amortiguador de hibridación y agregar la sonda marcada radioactivamente.
  9. Hibridar a 65 °C toda la noche y posteriormente eliminar o guardar la sonda radioactiva.
  10. Lavar la membrana durante 1 min con SSC 2X y con SDS 10% (1 ml de SDS al 10 % por cada 200 ml de SSC 2X)
  12. Si se detecta marca específica después de este lavado, poner la membrana en una bolsa de plástico y sellarla.
  12. Si existe marca inespecífica repetir el lavado anterior.
- Si aún así la marca sigue siendo inespecífica, realizar un último lavado con la solución anterior diluida 1:10 en agua durante 20 min a 65 °C.
14. Colocar la membrana en una bolsa de plástico y sellarla.
- Exponer la membrana a una placa fotográfica dentro de un cassette durante el tiempo que se considere necesario.
16. Revelar y fijar la placa.
-

---

### Marcaje de la sonda con $\gamma^{32}\text{P}$ .

1. Tomar 8  $\mu\text{l}$  de DNA y desnaturalizarlo durante 10 min. En un baño de agua hirviendo.
2. Inmediatamente pasarlo a hielo
3. Agregar 4  $\mu\text{l}$  de la mezcla High Primer Reaction 5X (Polimerasa Klenow, una mezcla de random primers y amortiguador), 3  $\mu\text{l}$  de la mezcla de desoxiribonucleósidos trifosfatados (dATP, dGTP, dTTP,) y 5  $\mu\text{l}$  de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ .
4. Incubar a temperatura ambiente durante toda la noche o de una a dos horas a 37° C
5. Precipitar la sonda añadiendo 1.5  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5 M pH 8 O 0.2  $\mu\text{l}$  DE EDTA 0.2 M pH 8. Además agregar 0.75  $\mu\text{l}$  de DNA espermático de salmón 10 mg/ml, 30  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio 3 M y 100  $\mu\text{l}$  de EtOH al 100%.
6. Centrifugar durante 10 minutos a ~ 14000 rpm.
7. Eliminar el sobrenadante con pipeta y resuspender la sonda en 100  $\mu\text{l}$  de Buffer TE.
8. Hervir la sonda a 95 ° C durante 5 min.
9. Pasar inmediatamente la sonda a hielo y agregarla completamente al tubo de hibridación que contienen la membrana y 10 ml de buffer de hibridación.

### Soluciones

#### Buffer TE

100 mM Tris (pH 7.4)  
1mM EDTA (pH 8)  
MOPS 10X                    1 litro  
MOPS 0.2 M                41.8 g  
Acetato de sodio 0.05 m    6.8 g  
EDTA 0.01 M                20 ml de  
EDTA 0.5 M  
Ajustar pH a 7.0, filtrar, autoclavar.

#### SSC 20X pH 7.4 (1 litro)

NaCl 175.2 g  
Citrato de Sodio 88.25 g  
Ácido Clorhídrico concentrado 3.6 ml

#### Buffer de hibridación

0.3 volúmenes de Buffer de fosfatos  
1M pH7.2  
0.7 volúmenes de SDS al 10%  
1/500 volúmenes de EDTA 0.5 M

#### Buffer de fosfatos

0.684 volúmenes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M  
(para un litro agregar 92 g)  
0.316 volúmenes de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M  
(para un litro agregar 90 g)  
Ajustar con NaOH a pH 6.5  
Esterilizar en autoclave