



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE nCBP
EN CULTIVOS DE CALLOS PRO-EMBRIOGÉNICOS
DE *Arabidopsis thaliana*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SARAY JUÁREZ ACOSTA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

1. Datos del alumno

Juárez
Acosta
Saray
5421-7075
Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310172503

2. Datos del tutor

Dra.
Tzvetanka
Dimitrova
Dinkova

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Jorge
Nieto
Sotelo

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Tzvetanka
Dimitrova
Dinkova

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Javier Andrés
Juárez
Díaz

7. Datos del sinodal 5

Dr.
Sol
Cristians
Niizawa

8. Datos del trabajo escrito

Análisis de la expresión y función de
nCBP en cultivos de callos pro-
embriogénicos de *Arabidopsis thaliana*
93 p
2018

Dedicatorias

A mi familia por el apoyo que me ha brindado todo este tiempo para culminar en este escrito del cual espero que estén orgullosos.

A mis amigos de la carrera, quienes estuvieron estrechamente involucrados en mi formación académica y social. Gracias Janet y Brenda por las pláticas tan amenas que tuvimos en cada clase y por escucharme cada vez que lo necesitaba. A Nadia y Fer, quienes hicieron que los trabajos en equipo fueran divertidos. A Leo, por su compañía que siempre fue importante para mí y por todo lo que me enseñaste. Y a Nat, mi primera amiga en la universidad quien se volvió alguien muy importante en mi vida y con quien he pasado muy gratos momentos. Agradezco a todos enormemente su amistad e inmenso cariño.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender de ella, y sobre todo por el apoyo que me brindó para poder concluir con mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio 103 quienes me han aconsejado en los momentos más oportunos, en especial a Abraham, Brenda y Thamara.

A la Dra. Karina Jiménez Durán y a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria USAII, de la Facultad de Química, por los servicios brindados.

A la M. en C. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores de la Facultad de Química, por la asesoría brindada de cultivo *in vitro* y transformación por biobalística.

A la M. en C. Ma. Berenit Mendoza Garfias del Instituto de Biología UNAM, por el apoyo en la obtención de micrografías por microscopía electrónica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el proceso de elaboración de la tesis de licenciatura.

A los financiamientos de que apoyan el trabajo de los estudiantes de laboratorio 103 por parte del proyecto de Ciencia Básica CONACyT 238439, PAPIIT IN 214118 y a la Facultad de Química PAIP 5000-9

I. Índice

I.	Índice	i
II.	Abreviaturas usadas en el texto	iv
1	Resumen	1
2	Introducción	2
2.1	Traducción de RNA mensajeros en eucariontes	3
2.2	Origen de la estructura Cap de los mRNA.....	5
2.3	Origen del factor de iniciación 4E	6
2.4	La familia de proteínas eIF4E.....	7
2.5	nCBP, miembro de la familia eIF4E	9
2.6	Evolución de los miembros de la familia eIF4E en plantas	11
2.7	Arabidopsis thaliana como modelo de estudio	12
2.8	Uso de callos de Arabidopsis para el estudio de nCBP	13
3	Antecedentes.....	20
4	Hipótesis	24
5	Objetivos.....	24
5.1	Objetivo general.....	24
5.2	Objetivos particulares.....	24
6	Materiales y métodos.....	25
6.1	Material biológico	25
6.2	Cultivo in vitro de A. thaliana	25
6.3	Medios modificados MS y B5.....	26
6.4	Porcentaje de germinación	26
6.5	Seguimiento de la formación de callo	27
6.6	Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB)	27
6.7	Cinética de crecimiento	27
6.8	Viabilidad celular	28
6.9	Clonación en pENTR/D-TOPO	30
6.10	Reacción de recombinación tipo LR	30

6.11	Transformación bacteriana	31
6.12	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	32
6.13	Purificación de plásmidos.....	32
6.14	Digestiones con enzimas de restricción	32
6.15	Electroforesis de DNA en gel de agarosa	32
6.16	Secuenciación de plásmidos pncbp:GUS y pncbp:ncbp-GUS	33
6.17	Transformación de callos pro-embriogénicos de <i>A. thaliana</i> con biobalística	34
6.18	Análisis de muestras transformadas por microscopía confocal	34
6.19	Ensayo para la detección de la enzima β -glucoronidasa (GUS).....	34
7	Resultados	35
7.1	Germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
7.2	Formación de callos pro-embriogénicos de <i>A. thaliana</i>	36
7.3	Caracterización morfológica de callos pro-embriogénicos de <i>A. thaliana</i> mediante microscopía electrónica de barrido	40
7.4	Fenotipo en la testa de las semillas de la mutante ncbp-1 de <i>A. thaliana</i>	42
7.5	Cinéticas de crecimiento de <i>A. thaliana</i> Col-0 WT y ncbp-1.....	43
7.5.1	Comparación del crecimiento en los medios de cultivo MS y Gamborg 5 modificados 43	
7.5.2	Cinéticas de crecimiento de callos pro-embriogénicos en medio de cultivo Gamborg B5 semi-sólido	45
7.5.3	Cinéticas de crecimiento de callos pro-embriogénicos en medio de cultivo Gamborg B5 líquido.....	49
7.6	Viabilidad celular de cultivos en suspensión de <i>A. thaliana</i> Col-0 WT y ncbp-1.....	51
7.7	Generación de construcciones reporteras	53
7.8	Expresión de 35S:ncbp-GFP en callos pro-embriogénicos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
8	Discusión.....	62
8.1	Implicaciones de nCBP en la inducción de callos pro-embriogénicos	62
8.2	Diferencias en la velocidad de proliferación celular causadas por nCBP	64
8.3	Expresión de nCBP en callos pro-embriogénicos de <i>A. thaliana</i> Col-0 WT y ncbp-1.....	65
8.4	Función de nCBP en la formación temprana de la testa de las semillas de <i>A. thaliana</i> ...	67
9	Conclusiones.....	71
10	Perspectivas.....	72
11	Bibliografía.....	73

12	Anexos	82
12.1	Anexo 1. Mapas de los vectores empleados	82
12.2	Anexo 2. Secuenciación de construcciones generadas; pncbp:GUS y pncbp:ncbp-GUS..	86
12.3	Anexo 3. Soluciones para ensayo de GUS	93

II. Abreviaturas usadas en el texto

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIA – Ácido indol acético

ANA – Ácido 1-naftalenacético

B5- Medio de cultivo Gamborg B5

BA – Benciladenina

CBP – Proteína nuclear de unión a *Cap* (*Nuclear Cap-binding protein*)

CDK – Cinasa dependiente de ciclina

Col-0 – Columbia-0

CTD – Dominio carboxilo terminal

GFP – Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

Glufosinato de amonio – Sal de amonio de ácido 2-amino-4-(hidroximetilfosfinil) butírico

GUS – β -glucuronidasa

MES – Ácido monohidratado 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MS – Medio de cultivo Murashige & Skoog

NMD – *nonsense-mediated mRNA decay*

nCBP – *novel Cap Binding Protein*

Pol II – RNA polimerasa II

pnCBP – Promotor de *novel Cap Binding Protein*

pnCPB:ncbp – Promotor más gen de *novel Cap Binding Protein*

PVP - Polivinilpirrolidona

WT – Silvestre

X-GlcA - Sal de ciclohexilamonio de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido

1 Resumen

La proteína novedosa de unión a *Cap* (nCBP) es un miembro de la clase II de la familia de proteínas eIF4E, las cuales han sido ampliamente caracterizadas debido a su participación en el reconocimiento de la estructura 5' *Cap* para el posterior reclutamiento de la maquinaria traduccional. Sin embargo, en plantas existen muy pocas funciones que se le han atribuido a nCBP. Dada la aparente redundancia funcional entre la familia 4E y la expresión ubicua y diferencial en *A. thaliana* se ha sugerido que nCBP tiene un papel importante en condiciones y estadios de desarrollo determinados en los organismos. Se ha explorado la participación de nCBP en condiciones de estrés, y en el desarrollo como la embriogénesis, debido a la letalidad embriogénica en mutantes nulas de nCBP, y a su alta expresión durante los primeros días de subcultivo en cultivos celulares de *Arabidopsis*. Por lo que se planteó el uso de cultivos de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* como modelo de estudio, para indagar las funciones donde participa nCBP. Durante la inducción de los callos las plántulas *ncbp-1* presentaron proliferación en el meristemo apical de la plántula y en baja proporción en el hipocótilo y la radícula, mientras que en las plántulas silvestres la proliferación se presentó principalmente en el hipocótilo, zona radicular y parte distal de los cotiledones, lo que sugiere que nCBP participa en el control espacio-temporal del proceso de proliferación celular. Además, se evaluaron curvas de crecimiento de los callos obtenidos tanto en medio semi-sólido como en suspensiones celulares, encontrando disminución en el peso fresco en medios semi-sólidos en callos *ncbp-1* respecto a los silvestres. Se observó la localización subcelular de nCBP fusionada a GFP en los callos de *Arabidopsis*, localizándose en cúmulos citoplasmáticos. Se lograron transformar callos pro-embriogénicos con el vector *ncbp:GUS*, donde GUS se expresó de forma difusa en el citoplasma y núcleo de forma difusa. El material generado permitirá en un futuro regenerar embriones somáticos para analizar más a fondo el papel de nCBP a nivel de mRNA. De manera interesante, se encontró un fenotipo en la testa de las semillas de *ncbp-1* asociado a defectos en la formación de la columela y consecuentemente a la acumulación y extrusión del mucílago, lo cual sugiere que nCBP está involucrado con genes que participan en la formación de la testa en etapas tempranas del desarrollo embrionario.

2 Introducción

Todos los organismos están compuestos de macromoléculas ya sea que formen estructuras celulares y/o realicen diversas actividades dentro ellas. Estas son de gran tamaño y se encuentran organizadas dando lugar a formas intrincadas que son capaces de realizar tareas complejas con gran precisión y eficacia. Las macromoléculas se dividen en cuatro categorías principales: ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y proteínas.

Las proteínas, las cuales son del interés principal en este estudio, son macromoléculas que realizan una gran diversidad de actividades celulares, dividiéndose a su vez en diferentes grupos tales: como enzimas, las cuales aceleran las reacciones metabólicas; las proteínas estructurales, que brindan soporte mecánico, tanto dentro de las células como en su periferia; hormonas, factores de crecimiento y activadores genéticos. Además, las proteínas son capaces de realizar una gran cantidad de funciones reguladoras, tales como los receptores de membrana y transportadores, mismos que determinan ante qué reacciona una célula y qué tipos de sustancias entran y salen de ella; como filamentos contráctiles y motores moleculares que constituyen la maquinaria para los movimientos biológicos. Entre múltiples funciones adicionales, las proteínas actúan como anticuerpos, toxinas, forman coágulos sanguíneos, absorben y refractan la luz y transportan sustancias de una parte del cuerpo a otra. Cada proteína tiene una estructura única y definida que le permite realizar una función particular. Lo más importante, es que las proteínas pueden tener interacciones selectivas con otras moléculas, incluyendo otras proteínas también (Karp, 2011).

Se le llama traducción al proceso de cambio informacional de RNA a proteína, y representa una de las vías de flujo de información general postuladas en 1970 por Crick dentro del llamado Dogma central de la biología molecular (Fig. 1). Dicho proceso es fundamental para todas las formas de vida, y su control es crucial en la expresión genética durante diversos procesos celulares y del desarrollo. Además, las proteínas son moléculas elementales en la biósfera, las cuales catalizan la mayoría de las reacciones que sustentan la vida, de tal manera que juegan un papel estructural, de transporte y como reguladores en todos los organismos (Hernández *et al.*, 2016).

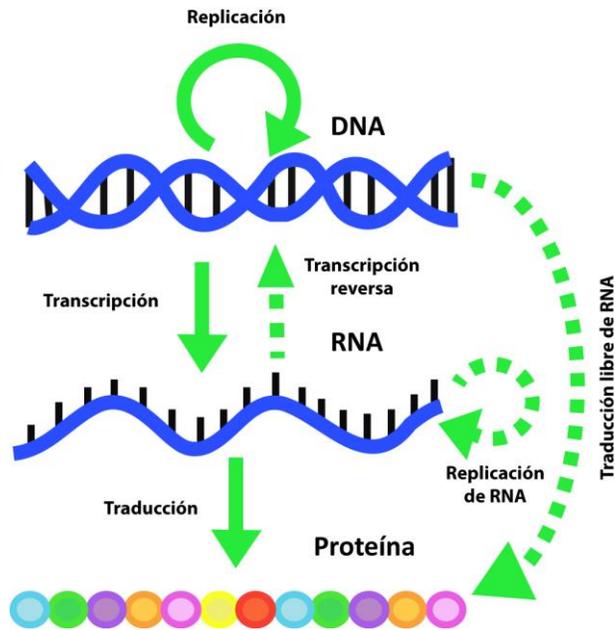


Figura 1. **Representación gráfica del Dogma central de la biología molecular.** Las flechas sólidas representan las vías de cambio informacional generales (replicación, transcripción y traducción), mientras que las flecha punteadas las vías especiales (transcripción reversa, replicación de RNA y traducción libre de RNA) del mismo dogma. Tomado y modificado de Crick (1970).

2.1 Traducción de RNA mensajeros en eucariontes

La traducción de los RNA mensajero (mRNA) es un proceso que consume aproximadamente el 90% de la energía de la célula. El control se ejerce primordialmente a nivel de inicio de la traducción, ya que es energéticamente favorable controlar el primer paso de dicha reacción, por lo que se considera que es un evento de gran importancia a nivel fisiológico (Martínez-Silva & Dinkova, 2010). Una variación en el inicio tiene influencia tanto en la cantidad de proteínas, como en los niveles relativos de síntesis de las mismas (Rhoads, 2009). El proceso de traducción está dividido esencialmente en cuatro etapas, cada una con sus respectivos factores involucrados, que son: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento. La regulación las etapas de la traducción permiten la síntesis diferencial de proteínas específicas, lo cual resulta en cambios profundos en la fisiología celular, sin necesidad de cambios en la transcripción de los genes correspondientes (Groppo & Richter, 2009).

El inicio de la traducción es uno de los pasos primordiales, y dentro de éste existen dos pasos regulatorios importantes; uno de ellos consiste en la primera unión del complejo eIF4F al extremo 5', es decir, el reconocimiento de la estructura 5' Cap (7-metilguanosintrifosfato, m7GpppN) y unión del mRNA, lo cual puede ejercer efectos variables en la traducción de diferentes mRNAs. En

este primer paso es cuando el 5' *Cap* del transcrito es reconocido por el factor de traducción 4E (eIF4E) unido a eIF4G (proteína de anclaje). Este último recluta a eIF4A, una helicasa dependiente de ATP facilitando el desenrollamiento de estructuras secundarias en el RNA. Una vez unidas dichas proteínas, se forma el complejo eIF4F el cual recluta eIF4B, (uniéndose a RNA y estabiliza la unión del ATP con eIF4). En este paso, eIF4G recluta a la proteína de unión a la cola de poli(A) (PABP) lo cual promueve la circularización del mRNA y se puede iniciar el reclutamiento de la maquinaria traduccional (Fig. 2).

La interacción de eIF4G con el factor eIF3, el cual se encuentra unido al complejo de pre-inicio 43S (compuesto por GTP, Met-tRNA, y el eIF2 $\alpha\beta\gamma$; el complejo multifactor por eIF5, eIF1 y eIF1A y la unidad ribosomal 40S), permite la formación del complejo de inicio 48S que recorre el mRNA en dirección 5' a 3' en busca del codón de inicio AUG. Una vez que el Met-tRNA reconoce el AUG, se hidroliza el GTP unido a eIF2 α con la asistencia de eIF5. Hay disociación de la mayoría de los factores de inicio y se lleva a cabo la unión de la unidad ribosomal 60S para formar el ribosoma 80S (Pain,1996; Fischer, 2009 y Groppo & Richter, 2009). Durante la elongación se requieren tres factores: (1) eEF1A, el cual unido a GTP ayuda a cargar a los aa-tRNAs correctos al ribosoma; (2) eEF1B necesario para el intercambio de GDP por GTP en eEF1A; y (3) eEF2, el cual mediante la hidrólisis de GTP promueve la translocación del ribosoma exactamente tres nucleótidos sobre el mRNA (Groppo & Richter, 2009). La terminación está mediada por el factor de liberación eRF1, el cual se une al ribosoma en lugar del tRNA para reconocer cualquiera de los tres codones de paro (UAA, UAG o UGA), induciendo la hidrólisis de la proteína recién sintetizada del último tRNA. Posteriormente, eRF3 unido a GTP promueve la liberación de eRF1. De esta manera ocurre un evento de hidrólisis de GTP para el proceso de terminación (Pestova, Lorsch & Hellen, 2007).

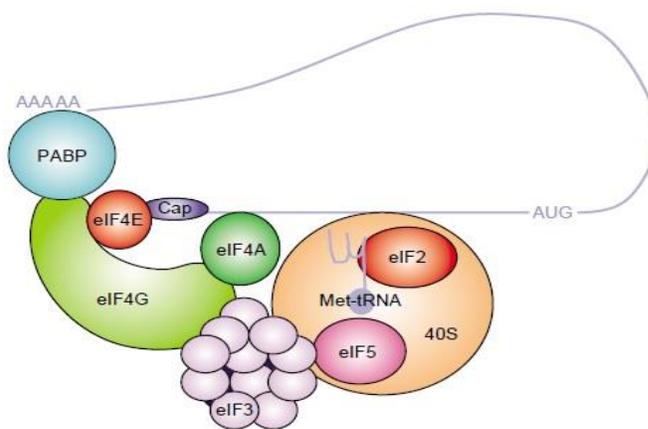


Figura 2. **Complejo pre-inicio 48S de la traducción de eucariontes.** El complejo eIF4F encargado de reclutar al mRNA, está integrado por los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A. eIF4E es la proteína de unión al 5' Cap; eIF4A es una helicasa de RNA ATP; eIF4G es una proteína de andamiaje, con dominios de unión a polyA (PABP). eIF4A, eIF4E y eIF3 (complejo de multisubunidades que se une al ribosoma 40S), permite circularizar el mensajero y reclutar a los demás factores de inicio de la traducción. Tomado de Robaglia & Caranta. (2006).

La traducción de la mayoría de los mRNA inicia por el mecanismo *Cap* dependiente en eucariontes actuales, vía anteriormente mencionada, la cual es mediada por los factores de inicio de la

traducción (eIFs) y consiste en el reclutamiento del mRNA a la subunidad ribosomal 40S sobre el reconocimiento de la estructura *Cap* (m^7GpppN , donde N es el nucleótido localizado en el extremo 5' del mRNA) por la proteína de unión a *Cap* eIF4E.

De manera alterna existe una secuencia interna en el 5'-UTR de los mRNA de picornavirus localizada cercanamente al codón de inicio que permite a la subunidad ribosomal 40S aterrizar directamente en el mRNA de manera independiente a *Cap* y sin involucrar a eIF4E; este descubrimiento lo lograron los grupos de Nahum Sonenberg y Eckard Wimmer a finales de los años 80. Esta secuencia es llamada Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés; *Internal Ribosome Entry Site*) (Hernández *et al.*, 2016). También hay IRES celulares en diversos eucariontes localizados generalmente en los mRNA que codifican proteínas relacionadas con la regulación de la expresión genética, durante el desarrollo, la diferenciación, la progresión del ciclo celular, el crecimiento celular, la apoptosis y el estrés. Los IRES celulares poseen una estructura *Cap*, por lo que los mRNA también pueden ser traducidos de forma dependiente a *Cap* y producir una proteína idéntica. Sin embargo, cuando los IRES celulares se encuentran dentro de las regiones codificantes del mRNA, se producen dos proteínas diferentes, mediante la traducción dependiente de *Cap* y la otra de manera dependiente de IRES. En otras ocasiones, la traducción de los mRNA celulares puede ser más compleja, y el balance entre ambos tipos de inicio de la traducción resulta en la producción de isoformas distintas de una proteína (Gutiérrez-Escolano, 2006).

2.2 Origen de la estructura *Cap* de los mRNA

La estructura *Cap* m^7GpppN de los mRNA de eucariontes juega un papel crucial en la biogénesis y estabilidad del mRNA. Además, es esencial para la eficiencia del *splicing*, la exportación y la traducción del mismo mRNA. Todos los procesos nucleares de la biogénesis del mRNA (*i.e.* transcripción, *capping*, poliadenilación, exporte nuclear de *splicing* y estabilidad) están estrechamente entrelazados.

Durante la transcripción realizada por la RNA polimerasa II (Pol II), se agrega el *Cap* en todos los pre-mRNA eucariontes durante la transcripción. Esto sucede una vez que se ha sintetizado una cadena de 20 a 30 nucleótidos debido a la interacción entre las enzimas *capping* con el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad de la Polimerasa II. El proceso dependiente del

CTD de la Pol II recibe una señal blanco de poliadenilación del mRNA por la polimerasa poly(A) al final de la transcripción, que justo después de transcribirla es liberada. Posteriormente, el transcrito sintetizado forma un complejo con las proteínas *Cap-binding* CBP20 y CBP80, los cuales conforman el *Cap-binding nuclear* para el *splicing* de intrones.

En cuanto al extenso acoplamiento en los diversos procesos de metabolismo de mRNA, la estructura *Cap* es reconocida por diferentes proteínas incluyendo a muchas que pertenecen a diferentes procesos del metabolismo de RNA. Esto también apoya la idea de que entre muchos de los primeros componentes y procesos que aparecieron en eucariontes el CTD de la Pol II, la estructura *Cap* y la proteína nuclear de unión a *Cap* (CBC) proporcionaron “una plataforma” para llevar a cabo el *splicing*, la exportación nuclear, protección de mRNA y las maquinarias NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*). Así, tanto *Cap* como la cola de poli (A) de los mRNA participaron durante la eucariogénesis, posteriormente siendo incorporados en el proceso de traducción en la evolución, únicamente después de involucrar a eIF4E, eIF4G y PABP (Hernández *et al.*, 2016).

2.3 Origen del factor de iniciación 4E

Existe evidencia que sugiere que eIF4E emergió como un factor de traducción. Sin embargo, esto aún continúa discusión, pues se plantean otros posibles escenarios evolutivos. Una de las teorías propone que eIF4E apareció en la eucariogénesis temprana como un mediador de la exportación nuclear, así como para mejorar la estabilidad del mRNA o como un mediador de almacenamiento citoplasmático, sin tener un papel en la traducción (Hernández & Vazquez, 2005). Evidencia de este posible escenario lo provee una de las isoformas de eIF4E en *Giardia lamblia*, debido a que la proteína solo se une a pequeños RNA nucleares no codificantes, por lo que se sugiere que la aparición del *Cap* y eIF4E pudieron haber tenido un gran salto adaptativo por la protección de los mRNAs de la degradación, suceso seguido de la aparición de las exonucleasas 5' (algunas de origen eucariótico) en la etapa temprana de la eucariogénesis (Deutscher & Li, 2001; Li & Wang, 2005).

La aparición de eIF4E pudo haber seguido esta secuencia evolutiva, ya incrementa la estabilidad de los mRNAs, pues en ausencia de algún medio de interacción directa con el mismo ribosoma, no puede participar en la traducción. eIF4E podría haber sido incorporado en los procesos de traducción solo después del surgimiento de una proteína de andamio (nombrada eIF4G), capaz de coordinar la actividad eIF4E. Por lo que la aparición de eIF4E ancestral implica que ese propio

mRNA fue muy probablemente traducido de forma dependiente de *Cap*, que de modo dependiente de IRES (Hernández *et al.*, 2016).

2.4 La familia de proteínas eIF4E

El factor de inicio de la traducción eIF4E, se encarga de reconocer la estructura 5' *Cap* en el extremo 5' de los RNAs mensajeros eucariontes y recluta a la maquinaria de síntesis de proteínas para dar inicio a la traducción. En eucariontes, la síntesis de más del 95% de las proteínas se inicia mediante el reconocimiento del *Cap* de los mRNAs (Browning, 2004; Fischer, 2009 y Kaye *et al.*, 2009). Además, la familia de las proteínas eIF4E se encuentra agrupada en tres clases (Fig. 3) acorde a Joshi y colaboradores (2005). La clase I contiene Trp en las posiciones 43 (importante para la estabilización estructural de la proteína) y 56 (aminoácido involucrado directamente con la unión m⁷GTP), la clase II, contiene Tyr, Phe o Leu en la posición 43 y Tyr o Phe en la posición 56, y la clase III contiene Trp en la posición 43 pero Cys o Tyr en la posición 56.

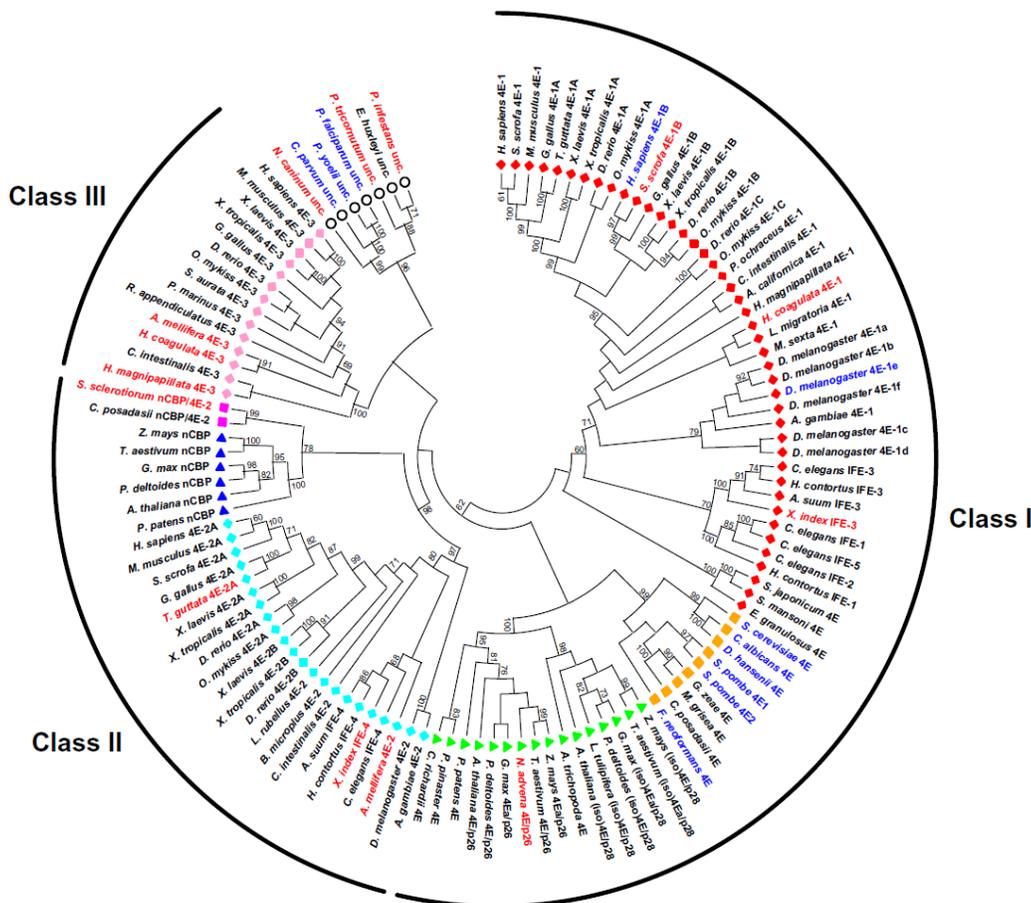


Figura 3. Cladograma radial que describe la relación general de los miembros de la familia eIF4E seleccionados de múltiples especies. Los nombres de los miembros de la familia eIF4E se encuentran en letras negras o rojas indicando si hay o no secuencia completa de la región consenso. Las letras azules indican datos de la secuencia genómica que fueron usados para verificar y determinar la secuencia nucleotídica. El ícono de la izquierda indica el grupo taxonómico: metazoarios (rombos); hongos (cuadrados); viridiplantae (triángulos) y protistas (círculos). Alrededor del diagrama se indica la clase a la cual pertenecen. Tomado de Joshi *et al.*, 2005.

realizado con secuencias de eIF4E y sus isoformas entre diferentes grupos taxonómicos se encontró que aproximadamente 55 aminoácidos están conservados por razones estructurales de la proteína, formando el núcleo hidrofóbico y otras interacciones terciarias esenciales para la misma. Los residuos más íntimamente relacionados con la unión m^7GTP se encuentran conservados a lo largo de todas las especies y 11 residuos están notablemente bien conservados en plantas. Sin embargo, difieren en identidad la de aminoácidos análogos en las formas de eIF4E de mamíferos y levaduras (Monzingo *et al.*, 2007).

Algunos de los miembros de la familia 4E presentan selectividad por diferentes estructuras *Cap*. Los mRNAs en *Caenorhabditis elegans* contienen dos tipos de *Cap*, monometilado (m^7GpppN) y trimetilado ($m^{7,2,2}GpppN$). IFE-3 (Clase I) e eIFE-4 (Clase II) se unen preferentemente a m^7GpppN , mientras que IFE-1, IFE-3 e IFE-5 (Clase I) se unen a ambos tipos de *Cap* (Keiper *et al.*, 2000). En plantas, se encontró que las afinidades de unión a *Cap* de eIF4E son de 4 a 10 veces más fuertes que en eIF(iso)4E (Clase I), mientras que las afinidades de unión para nCBP y eIF(iso)4E son similares (Kropiwnicka *et al.*, 2015).

El factor eIF4E es una proteína de aproximadamente 24 kDa, cuya estructura le permite tener contacto directo con el *Cap*, está involucrada en el reclutamiento de los mRNA al ribosoma y tiene potencial de influir en la expresión de distintas proteínas en la célula (Kaye *et al.*, 2009; Mayberry *et al.*, 2009). Además, su estructura primaria de aminoácidos está altamente conservada en todos los organismos que la presentan (Niedzwiecka *et al.*, 2002). En organismos que presentan varios miembros de la familia eIF4E, se ha encontrado que sólo uno de ellos es ubicuo y se expresa constitutivamente, siendo responsable de la traducción dependiente de *Cap*. Este está representado por eIF4E-1 en *Drosophila* (Hernández *et al.*, 2005), eIF4E-1 en mamíferos. IFE-3 en *C. elegans* (Keiper *et al.*, 2000), eIF4E-1a en pez cebra (Robalino *et al.*, 2004) y eIF4E en plantas (Rodríguez *et al.*, 1998). Los otros eIF4Es son activos en tejidos o etapas de desarrollo particulares o se unen a ciertos mRNA, lo que apoya la hipótesis de que no son completamente redundantes al presentar selectividad traduccional. Por otra parte, eIF4E es blanco de múltiples mecanismos de regulación que pueden afectar su función ya sea a nivel general, o solamente para ciertos mRNAs. Debido a dicha regulación, la célula es capaz de mantener niveles óptimos de crecimiento y división celular, así como responder a estímulos externos, así como a señales de desarrollo. Este factor también es blanco de regulación por infecciones virales y por la vía de microRNA (miRNA) celulares (Martínez-Silva & Dinkova, 2010).

2.5 nCBP, miembro de la familia eIF4E

En plantas, la familia de eIF4E está compuesta por las proteínas eIF4E (*eucaryotic Initiation Factor 4E*), por la isoforma eIF(iso)4E y por nCBP (*novel Cap-Binding Protein*); una de las características conservadas en los miembros de esta familia es la formación de un puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas 133 y la 151 que fue observado en la proteína eIF4E de trigo (Joshi *et al.*, 2005 y Monzingo *et al.*, 2007). La clase II incluye a nCBP (*novel cap-binding protein*), que fue inicialmente se identificó y caracterizó en *Arabidopsis thaliana*. Para esta proteína existen diferencias notables con respecto a eIF4E y eIF(iso)4E de la clase I, ya que la secuencia de residuos de triptófano -1 y -3 cambian, sitios que están relacionados con la afinidad a la estructura *Cap* del mRNA (Ruud *et al.*, 1998). Los tres miembros de la familia eIF4E se encuentran presentes en diversas plantas, pero hasta el momento no se ha podido determinar con certeza su especialización funcional (Martínez-Silva & Dinkova, 2010).

nCBP en *A. thaliana* es una proteína de 221 aminoácidos. El gen que la codifica (At5g18110) contiene 1938 nucleótidos y está localizado en el cromosoma V, contiene 1938pb y está conformado por 6 exones y 5 intrones. El gen *nCBP* codifica para una proteína de 24 kDa (www.arabidopsis.org). Posee un 32% de identidad y un 58% de similitud con el factor eIF4E de *A. thaliana* a nivel de aminoácidos (Joshi *et al.*, 2005). Además; se sabe que nCBP es capaz de unirse al factor eIF(iso)4G, pero no interacciona con eIF4A y eIF4B. Es capaz de mantener el inicio de la traducción cerca del 30% del nivel de eIF(iso)4E *in vitro*; lo cual implica que no sólo puede unirse a la estructura *Cap* de los mRNA, sino que también forma un complejo funcional con eIF(iso)4G. Sin embargo, no está claro si la baja actividad de la síntesis de proteínas es una característica propia de nCBP, o está determinada por alguna interacción aún desconocida. Su baja actividad durante la traducción sugiere que su función puede ser la de una proteína secuestradora de ciertos mRNA, proviniendo o disminuyendo su propia traducción (Ruud *et al.*, 1998).

Se sabe que al menos un miembro de la familia eIF4E es esencial para la viabilidad, como es el caso de IFE-3 en *C. elegans* (Keiper *et al.*, 2000), así como también se requiere la presencia de otros miembros de la familia en los organismos en ciertos eventos específicos durante su ciclo de vida (Rhoads, 2009). Además, los complejos correspondientes a eIF4F y eIF(iso)F, son capaces de discriminar mRNA con regiones no traducibles de diferente longitud y grado de estructuración. (Mayberry *et al.*, 2009). Los factores eIF4E están involucrados en respuesta a distintos tipos de

estrés, como es el caso del factor eIF4E-2 en *Schizosaccharomyces pombe*, el cual responde ante el estrés por falta de nutrientes, altas temperaturas y elevadas concentraciones de sal, deteniendo la división y el crecimiento celular (Ptushkina et al., 2004). En el caso de *A. thaliana*, se sugiere que el factor eIF(iso)4E es requerido particularmente durante condiciones de estrés por deficiencia de fosfato, donde son cruciales los niveles de la proteína PHO1 (Martínez et al., 2012).

Para el caso de nCBP existen diversos ortólogos: IFE-4 en *C. elegans*, d4E-HP en *Drosophila melanogaster*, eIF4E-1 en *Leishmania*, x4EHP en *Xenopus laevis* y, en *Homo sapiens* y *Mus musculus*, la proteína 4E-HP.

IFE-4 en *C. elegans* puede unirse al 5' Cap para la traducción selectiva de ciertos transcritos. La proteína se ha visto expresada con una fusión IFE-4 a GFP se expresa de forma tejido-específica en músculo y neuronas de la faringe, en cuerpos de células neurales, en el cordón neuro-ventral, en el músculo de la vulva, así como en la pared corporal del músculo y la espermateca. La mutación por *knockout* de *ife-4* mediada por RNA de interferencia (RNAi) produce un fenotipo pleiotrópico en el organismo que incluye defectos en la ovoposición, y como consecuencia, un retraso en la reproducción sin afectar su viabilidad (Dinkova et al., 2005).

Los mutantes de *Drosophila melanogaster* que expresan marcadamente niveles reducidos de d4E-HP muestran defectos en la formación del eje antero-posterior durante la embriogénesis temprana (Cho et al., 2005). El desarrollo del eje antero-posterior en embriones de *D. melanogaster* es dependiente de la distribución por genes de efecto materno que incluyen a *bicoid* y *caudal*. En el oocito, el mRNA de *caudal* es distribuido de manera homogénea, mientras que el mRNA de *bicoid* está restringido a la parte anterior de la célula. La traducción del mRNA de *bicoid* es activada por la fertilización lo que resulta en un gradiente decreciente de proteína *bicoid* hacia la parte posterior del embrión. d4E-HP muestra selectividad por ciertos mRNAs durante el desarrollo, y ejerce una función regulatoria negativa sobre su traducción, como ocurre en el mRNA de *caudal*, en la cual se reconoce una secuencia específica en el 3'UTR (BBR, región de unión a Bicoid) por la proteína Bicoid (BCD), quien a su vez interacciona con d4E-HP unido al 5' Cap, formando así un círculo cerrado que impide la traducción del mensajero y como resultado se genera un gradiente opuesto de la expresión de *caudal* (Cho et al., 2005; Hernández et al., 2005). Por otra parte, la proteína eIF4E-2 (4E-HP) es ubicua, pero principalmente se expresa en gónadas de *Mus musculus*. Esta proteína en *Homo sapiens* y *M. musculus* tiene la capacidad de unirse a 4E-

BPs débilmente a comparación de eIF4E-1, y a la estructura *Cap*. Sin embargo, no puede asociarse con eIF4G, lo cual sugiere una baja probabilidad de tener un papel como factor de inicio de la traducción y más bien podría desempeñar una función de regulación traduccional en estas especies (Joshi *et al.*, 2004).

2.6 Evolución de los miembros de la familia eIF4E en plantas

Los análisis filogenéticos de las secuencias disponibles de eIF4E y eIF4G de genomas secuenciados de Viridiplantae sugieren que eIF(iso)4E apareció en primera instancia en plantas con flor, mientras que eIF(iso)4G es más antiguo, pues en todos los genomas secuenciados se encuentra al menos una copia de esta isoforma (Patrick & Browning, 2012). En esos análisis, dos miembros de la familia eIF4E se reportan en las gimnospermas, uno más parecido a eIF4E conservado en plantas y el otro diferente del eIF4E canónico, pero también distinto de eIF(iso)4E. Ya que tanto eIF4E como eIF(iso)4E están en gimnospermas, es posible que cada eIF4E presente una afinidad particular por eIF4G o eIF(iso)4G, sin embargo, para probar la hipótesis se requiere de la caracterización bioquímica de la unión de la subunidad de Gimnospermas. Una reconstrucción filogenética con datos recientes de secuencias en Viridiplantae de eIF4E, basadas en la región núcleo, está representada en la Fig. 3. El árbol fue inferido del alineamiento de aminoácidos de la región núcleo de proteínas similares a eIF4E de plantas y algas verdes donde se muestra la familia eIF4E de plantas vasculares está dividida en 3 linajes principales; un clado de secuencias de 4EHP, uno de eIF4E y otro clado de eIF(iso)4E.

Los clados similares a eIF4E y eIF(iso)4E aparecen como hermanos uno de otro, formando un grupo monofilético (aunque con bajo soporte de *bootstrap*), que a su vez es hermano del linaje de 4EHP. La monofilia de cada uno de esos tres grupos está bien soportada por valores de *bootstrap* del 63% para el clado de eIF4E, 83% para eIF(iso)4E de secuencias de plantas con semilla (aunque el apoyo disminuye al 51% si se incluyen secuencias de los linajes de las Briofita y las Lycopodioiditas), y sube al 100% del linaje de secuencias 4EHP para plantas vasculares.

La rama más larga de la filogenia de la familia de eIF4E de las plantas está basada a partir de secuencias de un grupo monofilético de algas verdes y *Amborella trichopoda*. El árbol está enraizado con su rama más larga, y un clado de algas verdes se forma adyacentemene al clado 4EHP. Sin embargo, en un análisis previo, las secuencias similares a 4EHP fueron consideradas ausentes de las algas verdes. El análisis filogenético del clado 4EHP contiene secuencias de

musgos, licopodios, gimnospermas y angiospermas (incluyendo *A. trichopoda*). Interesantemente, ninguno de los clados eIF4E o eIF(iso)4E son tan diversos como el clado 4EHP. Por ejemplo, el clado eIF4E incluye secuencias de *Picea sitchensis* (una gimnosperma), pero no de algún musgo o licopodiophyta, mientras el clado de eIF(iso)4E está cercanamente relacionado con secuencias de *Selaginella moellendroffii* y *Physcomitrella patens*, pero no de gimnospermas.

El orden del anidamiento de esos grupos monofiléticos, así como la procedencia taxonómica de sus constituyentes es compatible con un escenario en el que ya existía una proteína ancestral de unión a *Cap* en las algas. Entonces, en el antepasado de las plantas vasculares, un gen ancestral, es decir, con una sola copia, se duplicó y dio lugar al linaje de 4EHP y a los linajes eIF4E y eIF(iso)4E. La duplicación secundaria que dio lugar a los linajes eIF4E y eIF(iso)4E parece haber pasado en seguida. Debido a su cercanía con las secuencias de algas, parecería que 4EHP conserva características similares a las de la proteína ancestral de unión a *Cap* (Dinkova *et al.*, 2016).

2.7 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es un miembro de la familia Brassicaceae con una extensa distribución a lo largo de Europa, Asia y Norte América. Presenta una gran variedad de ecotipos de los cuales Columbia y Landsberg tienen estándares aceptados para estudios genéticos y moleculares. (Meinke *et al.*, 1998). Varias características de *Arabidopsis* la convierten en un organismo modelo de utilidad. En primer lugar, tiene un ciclo de vida corto, desde la germinación de la semilla hasta la producción de semillas es de 6 semanas a tres meses. Además, las plantas son pequeñas y su tallo floral puede medir hasta 35 cm por lo que son de fácil cultivo y manipulación.

Las rosetas de dicha planta tienen un intervalo de 2 a 10 cm de diámetro, dependiendo de las condiciones de cultivo. Las hojas están cubiertas por tricomas, característica que las hace un modelo conveniente para estudiar la morfogénesis y diferenciación celular. Las flores, completas y perfectas, tienen 2 mm de longitud con pétalos color blanco. En esta especie es fácil obtener productos de polinización cruzada y autopolinización, además, cada planta produce 10,000 semillas en promedio. Las semillas maduran en frutos alargados, denominados silicuas, donde una semilla llega a medir en promedio 0.5 mm de largo.

Por otra parte, el genoma de *Arabidopsis* es relativamente pequeño, con 125 millones de pares de bases (MBP), 33,600 genes aproximadamente, y cinco cromosomas que contienen toda la

información genética. La secuencia de su genoma se completó en el 2000 (Nakamura & Tabata, 2000). Otra ventaja que tiene esta planta es que puede transformarse fácilmente con el uso de *Agrobacterium tumefaciens* como vector biológico por medio del método de inmersión floral o por otros métodos tales como la biobalística. Además, existe un gran número de líneas mutantes y recursos genómicos disponibles para *Arabidopsis thaliana* (Sowers & Karcher, 2015). Para el presente estudio se cuenta con material de semillas WT de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 tipo silvestre (WT) y con las mutantes nulas de nCBP, la proteína de interés.

2.8 Uso de callos de *Arabidopsis* para el estudio de nCBP

Bush *et al.* (2009) se dieron a la tarea de investigar proteínas asociadas al 5' *Cap* de los mRNAs durante el de crecimiento en *Arabidopsis*. Entre sus resultados, muestran perfiles de diversas proteínas de la familia eIF4E hechos a partir de extractos de proteína de meristemas apicales, hojas y cultivos celulares en suspensión. En las suspensiones celulares de 2 días se muestra que la abundancia relativa para de la proteína nCBP es mayor con respecto a otras proteínas de la misma familia (Fig. 4B) y que dicha abundancia se presenta durante los primeros 4 días a partir del subcultivo de las suspensiones celulares (Fig. 4A). Esto ha dado lugar a plantear el uso de cultivos *in vitro* de *A. thaliana* como modelo para estudiar las posibles funciones que involucran a la proteína nCBP.

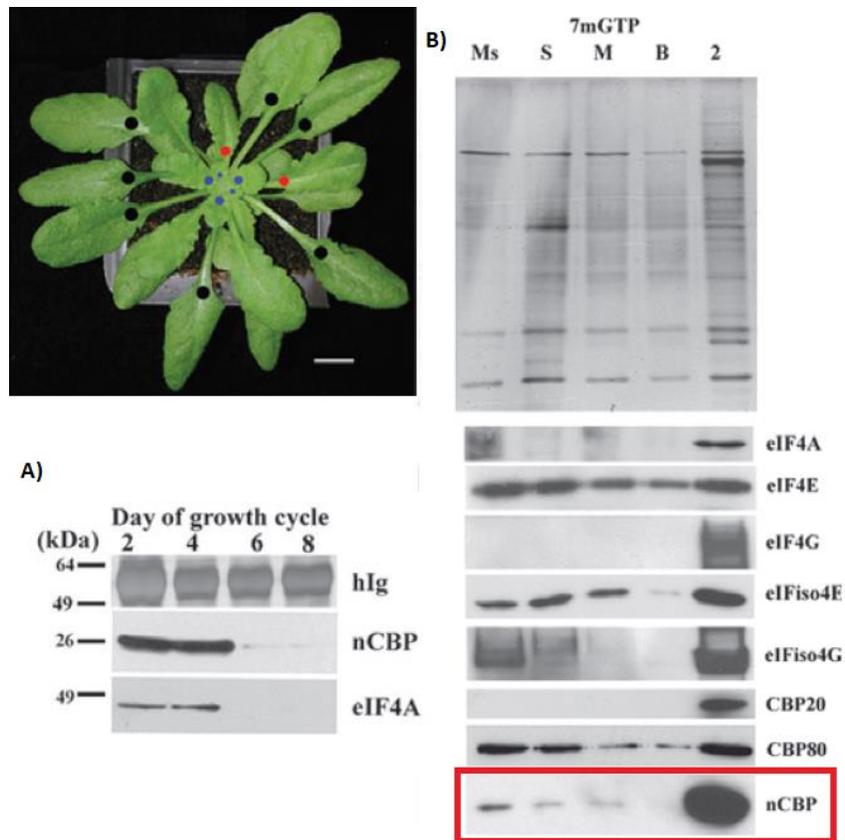


Figura 4. **Afinidad de los miembros de la familia eIF4E al complejo Cap en *Arabidopsis thaliana*.** A. Inmunodetección en ensayo tipo *western-blot* de nCBP y eIF4A unido al complejo *Cap* durante la proliferación celular; control hIg (cadena pesada de la inmunoglobulina). B. Inmunodetección en ensayo tipo *western-blot* para detección de afinidad a *Cap* de diversos miembros de la familia eIF4E en Ms= meristemos; S= hojas chicas; M= hojas medianas; B= hojas grandes (imagen de *Arabidopsis* de la parte superior izquierda) y 2= extractos de cultivos celulares de 2 días de subcultivo. Tomado y modificado de Bush *et al.*, 2009.

El crecimiento de las plantas superiores depende de la distribución organizada de funciones en órganos que, en consecuencia, comienzan a diferenciarse, es decir, se modifican y especializan para realizar sus respectivas funciones esenciales. El crecimiento desorganizado es raramente encontrado en la naturaleza, pero ocurre frecuentemente cuando los fragmentos de plantas enteras son cultivados *in vitro*, el cual se basa en la totipotencialidad celular. El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica con la cual se puede evaluar el crecimiento de células de plantas, tejidos u órganos aislados de la planta madre, en un medio artificial. Incluye técnicas y métodos usados para la investigación en muchas disciplinas botánicas y tienen diversos objetivos prácticos.

El crecimiento organizado contribuye a la formación o mantenimiento de estructuras definidas. Esto ocurre cuando los órganos de la planta, así como los puntos de crecimiento de brotes o raíces

(meristemos), hojas, botones jóvenes de flores o pequeños frutos, son transferidos a cultivos y continuamente crecen con su estructura preservada. El crecimiento coherentemente organizado también ocurre cuando se induce la formación de los órganos. Esto puede ocurrir *in vitro*, ya sea directamente sobre un órgano o sobre un fragmento de tejido colocado en un cultivo (un explante), o durante el cultivo de masas celulares previamente desorganizadas. El proceso de la formación de órganos *de novo* es llamado organogénesis o morfogénesis (el desarrollo de la forma) donde las células son nuevamente diferenciadas, es decir, que han desarrollado una forma especializada (morfología) y/o función (fisiología) y, consecuentemente llevan a la formación de tejidos diferenciados (por ejemplo, xilema o epidermis) (George *et al.*, 2008). Para llevar a cabo los procesos antes mencionados es importante la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal de manera externa.

Las auxinas son fitorreguladores que se usan extensamente en el cultivo de tejidos vegetales y usualmente forman parte integral del medio de cultivo nutritivo. Dichas moléculas promueven, en combinación con las citocininas, el crecimiento de callo, de células en suspensión y de órganos. También regulan la dirección de la morfogénesis. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos tales como la división y elongación celular. Ya que son capaces de iniciar la división celular están involucradas en la formación de meristemos dando lugar a tejidos desorganizado u de órganos. En tejidos organizados, las auxinas están involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad y en plantas completas su efecto más marcado es el mantenimiento de la dominancia apical y la mediación de los tropismos (Friml *et al.*, 2003; George *et al.*, 2008)

Las auxinas son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, que contienen ya sea un indol o un anillo aromático. Son cristalinas y poco solubles en agua, pero fácilmente solubles en solventes orgánicos (etanol, metanol, acetona, dietil éter y dimetil sulfóxido, en ácidos débiles o en soluciones acuosas alcalinas. Con excepción del ácido indol acético (AIA), las auxinas son estables y persisten en medios de cultivo.

Las citocininas comprenden una clase separada de los reguladores de crecimiento. Producen varios efectos cuando son aplicadas en plantas intactas. Particularmente estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular. Esa es quizá la razón por la que pueden promover la maduración de los cloroplastos y retrasar la senescencia de hojas desprendidas. La

aplicación de citocininas en un solo sitio de la planta (por ejemplo, a una hoja) causa que el órgano tratado comience a activar la disminución de aminoácidos, que luego migran a los órganos circundantes. El efecto de las citocininas es el más reportado en cultivo de tejidos, donde son utilizados, a menudo junto con las auxinas, para estimular la división celular y el control de la morfogénesis. Agregadas a los medios de cultivos, superan la dominancia apical y liberan la dormancia de las yemas laterales.

Se han sintetizado y probado un gran número de compuestos químicos por su actividad como citocininas. Diversos análisis han proporcionado una idea sobre las necesidades estructurales para su actividad. Casi todos los compuestos activos como citocininas son aminopurinas sustituidas en el N⁶, como la beciladenina (BA). Es decir, todas las citocininas naturales son derivados de aminopurinas. También hay citocininas sintéticas, que no se han encontrado en plantas, destacando las citocininas tipo difenilurea, como el tidiazurón, que se usa comercialmente como defoliante y herbicida (George *et al.*, 2008; Taiz & Zeiger, 2006)

En cuanto a algunos de los tipos de crecimiento desorganizados reconocidos en el cultivo de tejidos vegetales tenemos a los cultivos de callos; representan el crecimiento y mantenimiento de masas de células desorganizadas que surgen de un crecimiento descoordinado y desorganizado de pequeños órganos de la planta, explantes de tejidos o de cultivos celulares previos. Como consecuencia de la obtención de callo, es posible establecer cultivos celulares en suspensión donde hay diversas poblaciones de células vegetales y pequeñas aglomeraciones celulares, dispersadas con agitación, y que además son aireadas en medio líquido. Se pueden encontrar agregados celulares que se caracterizan por la ausencia de alguna estructura reconocible y contienen un número limitado de células especializadas y diferenciadas encontradas en una planta intacta.

El callo es una masa irregular de tejido parenquimatoso con sitios meristemáticos. Carece de una estructura organizada y generalmente se inducen por heridas, por la presencia de insectos o microorganismos o como resultado de estrés. El proceso de formación de callo puede inducirse *in vitro* por pequeños fragmentos de la planta (explantes) en un medio de cultivo nutritivo en condiciones de esterilidad bajo los estímulos de reguladores de crecimiento endógenos o reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio. Regularmente muestra diferenciación celular, principalmente compuesto por elementos traqueales. La heterogeneidad del callo es

derivada de explantes multicelulares usados para el inicio de cultivos de callo y/o inducidos por condiciones del cultivo. El callo del explante puede mostrar considerable variación respecto al color, textura, grado de compactación, cantidad de agua, y potencial quimiosintético y morfogénico. Además, puede ser compacto o friable, seco o húmedo, con coloración clara u oscura. Esas características también pueden cambiar con el paso del tiempo de los cultivos, así como los cambios genéticos o epigenéticos (variación somaclonal) o debido a cambios de medio de cultivo. Con frecuencia ha sido posible aislar diferentes tipos de callo de los mismos explantes. El callo puede mantenerse como un tejido desorganizado por tiempo ilimitado a través de subcultivos periódicos en medio fresco o inducido a la diferenciación de estructuras organizadas (e. g. raíces, brotes, embriones) manipulando el contenido del medio de cultivo.

Los cultivos *in vitro* pueden presentar diversas anomalías, las cuales pueden afectar el crecimiento de los tejidos de interés. Una de estas es el proceso de oxidación, que se debe a que algunas plantas producen altas concentraciones de sustancias fenólicas cuando las células están dañadas o senescentes. Los tejidos aislados comienzan a oxidarse, cambian su coloración a café o negro suspendiendo el crecimiento. Por otra parte, existe la hiperhidratación o la vitrificación, la cual se presenta en los tejidos regenerados bajo condiciones de alta humedad ambiental y condiciones heterotróficas dentro de viales de cultivo. Las plantas suelen mostrar anomalías morfológicas, anatómicas, fisiológicas y metabólicas (Ziv 1991; Kharrazi *et al.* 2011). Las plantas con hiperhidratación se caracterizan por tener una apariencia vidriosa, traslúcida, succulenta y rígida, con hojas gruesas y quebradizas, así como en los tallos y los callos. El grado de hiperhidratación depende de la especie, el medio de cultivo, dispositivo de cierre del vial de cultivo, tipo y cantidad de agente gelificante, así como la concentración y tipo de citocininas.

La embriogénesis es un modo de desarrollo especializado por el cual un óvulo fecundado, mediante una serie de divisiones celulares con un patrón predeterminado resulta en la diferenciación de un embrión, es el precursor de la siguiente generación. La doble fecundación, característica de las angiospermas, donde dos gametos masculinos participan en un acto de fusión: uno se une con la célula huevo para formar el cigoto diploide del cual se desarrolla el embrión, mientras que el otro gameto se fusiona con la célula central del saco embrionario que después desarrolla el endospermo triploide.

El desarrollo en las angiospermas puede dividirse en dos principales pasos (Dodeman *et al.*, 1997):

(1) embriogénesis *sensu stricto* (Fig. 5), comenzando con el cigoto y finalizando en el estado cotiledonario. El desarrollo a través de los estados globular, corazón, torpedo y cotiledonario pueden ser divididos en una secuencia de diferentes estadios representando tres mayores eventos (Goldberg *et al.*, 1994): (i) división asimétrica del cigoto, dando un aumento a pequeñas células apicales y las células largas basales; (ii) formación de un patrón específico, que da lugar al embrión globular; y (iii) transición del estado cotiledonar que coincide con la iniciación del primordio de raíz seguido, en dicotiledóneas, por la emergencia del primordio. (2) Maduración del embrión seguido por la germinación.

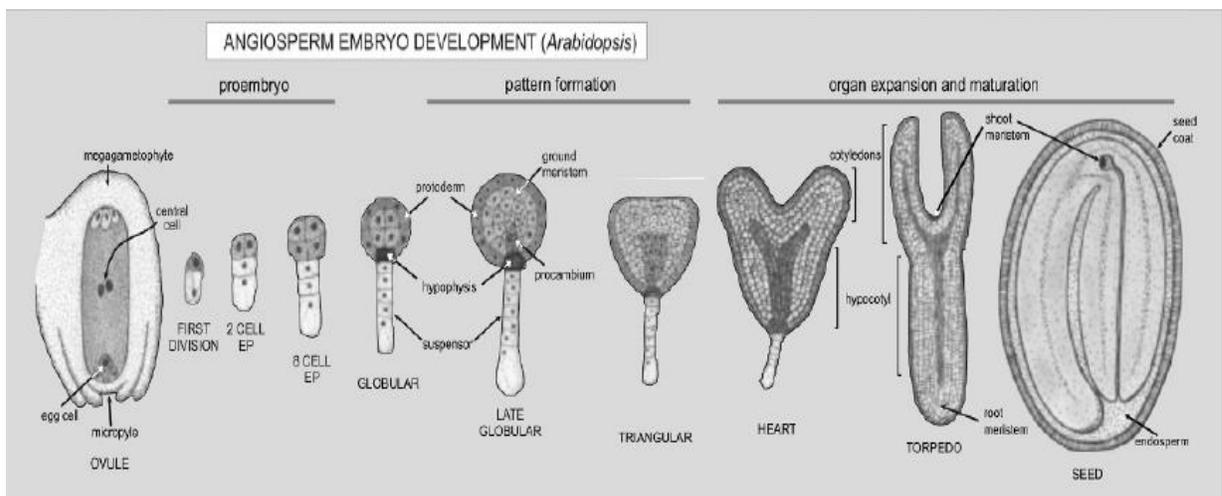


Figura 5. Representación esquemática de desarrollo embrionario de angiospermas (*Arabidopsis*) para dicotiledóneas. En el pro-embrión se dan las primeras etapas de división celular a partir de que la célula huevo ha sido fecundada, posteriormente se presenta un patrón de formación del embrión al pasar por el estado globular y triangular. Finalmente, el embrión llega a los estadios de corazón y torpedo como forma de maduración y expansión. Tomado de Goldberg *et al.*, 1994.

En la naturaleza, la embriogénesis está restringida a un óvulo e involucra la fusión de los gametos masculino y femenino. Ocasionalmente, en condiciones naturales se forman embriones en algunas variedades de mango y cítricos a partir de células esporofíticas de la nucela, dentro de óvulos (por ejemplo, *Paeonia*) y raramente en hojas (por ejemplo, *Asplenium* y *Kalanchoe*) que son independientes de la fecundación.

Los embriones formados por células somáticas son llamados embriones somáticos. El proceso mediante el cual una célula somática se diferencia en un embrión es llamado embriogénesis somática. Los embriones somáticos son parecidos morfológicamente a los embriones cigóticos. Son bipolares y producen los típicos órganos de un embrión. Sin embargo, se desarrollan por una

vía diferente. *In vitro* la embriogénesis somática ha encontrado amplias aplicaciones en la ciencia básica y aplicada (Saran & Kumar, 2013; George *et al.*, 2008).

Los embriones somáticos pueden diferenciarse ya sea directamente del explante sin pasar por la fase de callo o indirectamente después de la fase de callo (Williams & Maheswaran, 1986). La embriogénesis somática indirecta puede darse a partir de células indeterminadas y callo no diferenciado, el cual es formado previamente. Usualmente es fácil distinguir a un callo embriogénico del no embriogénico basado en su morfología y su color. El callo embriogénico está compuesto de masas pro-embriogénicas (PEMs).

La regeneración vía embriogénesis somática incluye cinco pasos:

- 1.- Iniciación de cultivos embriogénicos por el cultivo primario del explante en un medio suplementado con reguladores de crecimiento vegetal, principalmente auxinas, pero a menudo en combinación con citocininas.
- 2.- Proliferación de cultivos embriogénicos en medio semisólido o líquido suplementado con reguladores de crecimiento vegetal, de manera similar al inicio.
- 3.- Pre-maduración de los embriones somáticos en medios ausentes de reguladores de crecimiento vegetal, que inhiben la proliferación y estimulan la formación del embrión somático y su temprano desarrollo.
- 4.- La maduración de los embriones somáticos por el cultivo en medio suplementado con ABA y/o reduciendo el potencial osmótico.
- 5.- Regeneración de plantas en medio libre de reguladores de crecimiento vegetal.

3 Antecedentes

El conocimiento sobre las funciones de nCBP en plantas resulta importante para entender ampliamente la diversidad dentro de la familia de proteínas eIF4E, así como los posibles mecanismos de interacción de la proteína en cuestión. La presencia de nCBP dentro del grupo de las plantas aún cuenta con muchas incógnitas, las cuales han llevado a algunos grupos de investigación a tratar de dilucidarlas mediante diferentes métodos.

Actualmente hay reportes a nivel de mRNA en *A. thaliana*, donde se presenta una expresión ubicua de nCBP en diferentes tejidos de la planta (Fig. 6A). Además, se observan mayores niveles de expresión en raíz, semilla y plántula (Fig. 6A). En cuanto a los estudios proteómicos, se detecta a nCBP principalmente en botones florales (Fig. 6B), lo que ha llevado a sugerir una función tejido específica para este miembro de la familia 4E (Hidalgo, 2007; de la Torre, 2009).

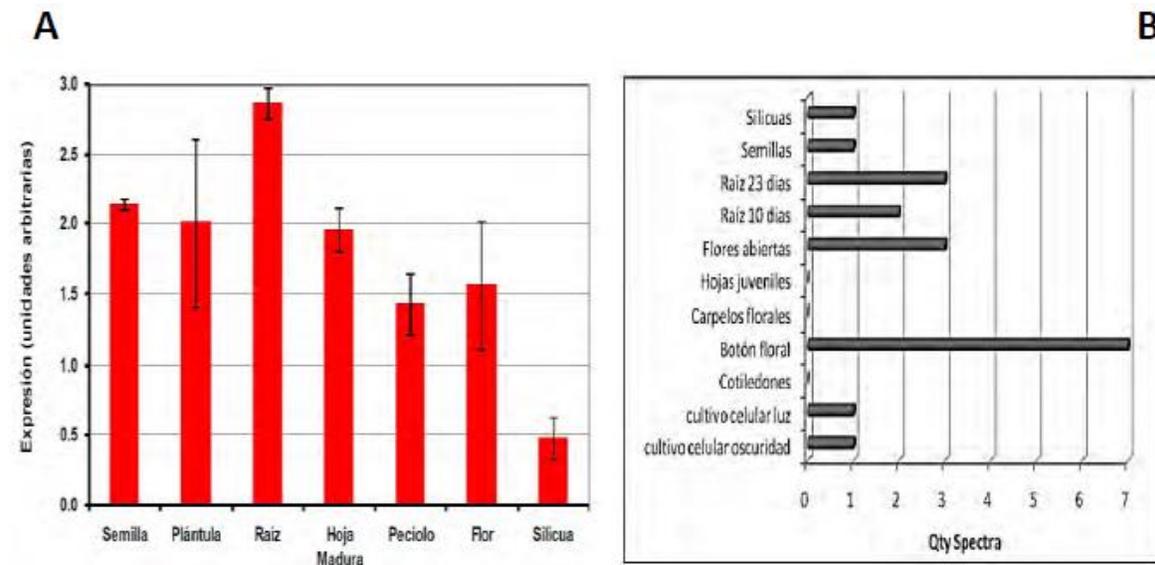


Figura 6. Perfil de expresión del mensajero y proteína de nCBP en *Arabidopsis thaliana*. A. Medición de los niveles de mRNA de nCBP por densitometría RT.PCR semicuantitativa en diferentes tejidos de la planta a lo largo de su desarrollo. B. Expresión de la proteína nCBP en diferentes tejidos de la planta. Tomado de Hidalgo, 2007 y de la Torre, 2009.

También se ha sugerido la participación de nCBP en procesos durante la etapa reproductiva, como la floración en *Arabidopsis*. Esto se debe a que en ausencia de nCBP se ha reportado un retraso en dicho proceso, así como cambios en la expresión de genes como AGL28, FCA y FCL, los cuales forman parte de la vía autónoma de floración. En cuanto a la embriogénesis, se ha registrado un

13% de letalidad embriogénica en ausencia de la proteína en cuestión (Fig. 7), característica de algunas mutantes en genes de la vía autónoma de floración.

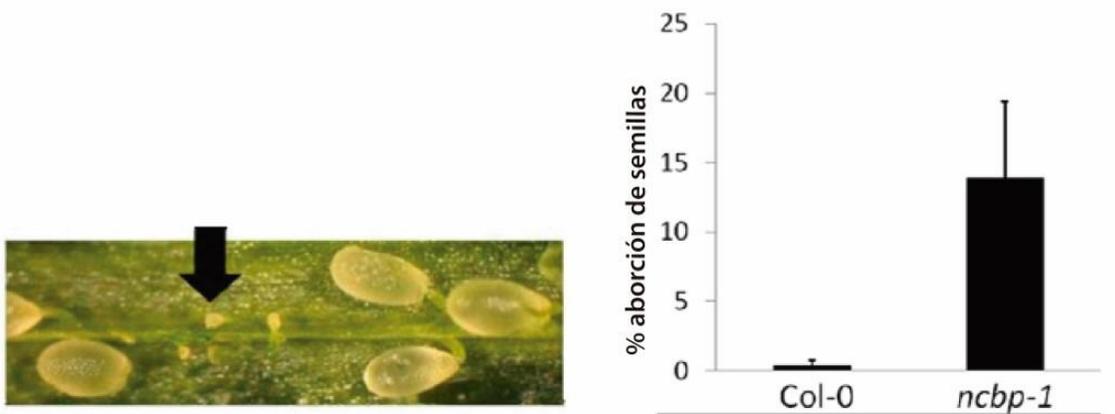


Figura 7. Frecuencia de semillas abortadas en la mutante *ncbp-1*. Semillas abortadas en la mutante *ncbp-1* indicadas con flecha negra. Tomado de de la Torre, 2009.

Se sabe que nCBP en *Arabidopsis* interactúa directamente con otras proteínas relacionadas con estrés como *Heat Shock Proteins* (HSPs), con proteínas relacionadas a jacalinas y proteínas tipo tubulinas implicadas en la dinámica del citoesqueleto, formando así complejos. Esto ha llevado a pensar que están implicados en la respuesta a estrés. Además, la proteína nCBP se expresa en protoplastos de *A. thaliana* en cúmulos citoplasmáticos específicos (Fig. 8A), sugiriendo una localización de estrés y/o de cuerpos de procesamiento (cuerpos P). Por otra parte, los análisis fenotípicos en ausencia de nCBP en condiciones de estrés osmótico muestran una disminución significativa en la raíz principal de la planta de *A. thaliana* (Fig. 8B), evidencia que apoya la participación de la proteína en la respuesta a estrés. (de la Torre, 2009, Flores, 2013; León, 2016) Aunque nCBP ha sido poco estudiada, y se han logrado dilucidar algunas características fisiológicas que nos dan pistas sobre sus posibles implicaciones en plantas, se han propuesto principalmente dos modelos traduccionales (Fig. 9) para explicar dichos procesos fisiológicos, donde nCBP puede tener una interacción directa o indirecta con proteínas de unión selectiva a determinados mensajeros proporcionando una especificidad funcional como miembro de la familia eIF4E.

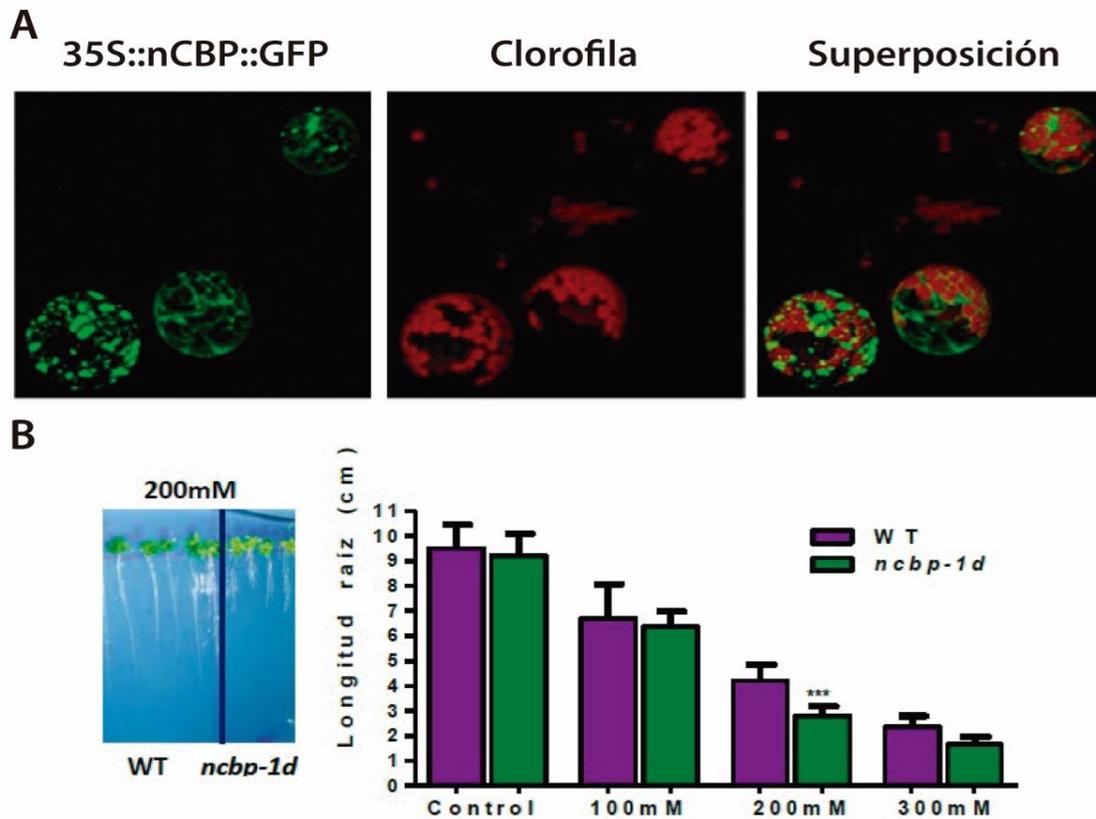


Figura 8. Participación de nCBP en respuesta a estrés. A. Localización subcelular de nCBP-GFP en protoplastos de *A. thaliana*. B) Análisis fenotípico del desarrollo de raíz en plantas de *A. thaliana* bajo estrés osmótico, en condiciones control y con manitol a 100, 200 y 300 mM. Tomado de de la Torre, 2009; León, 2016.

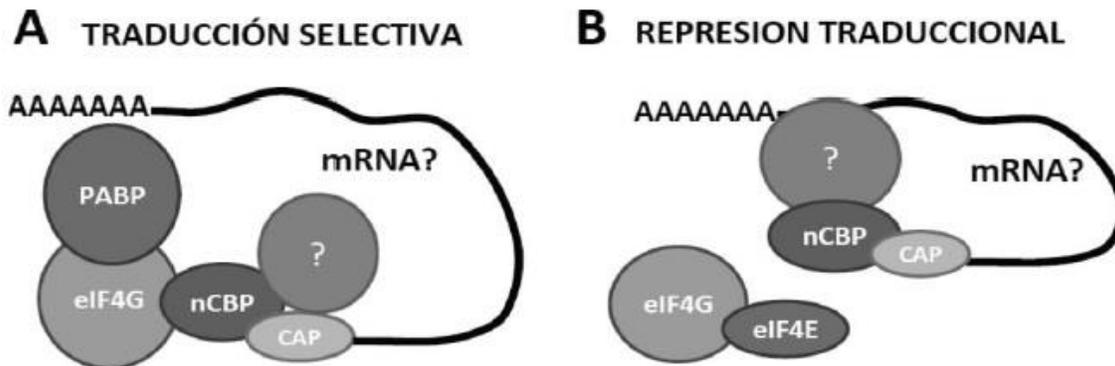


Figura 9. Posibles modelos de regulación mediados por nCBP. A. Traducción mediada por nCBP de mRNAs específicos. B. Represión de la traducción de mRNAs específicos mediante la unión de nCBP con otras proteínas que puedan reconocer a su vez secuencias en la región 3'UTR. Tomado de Martínez-Silva *et al.*, 2009.

Debido a que no existe información acerca del papel del factor de inicio de la traducción nCBP en diversas condiciones, y a que su expresión es muy elevada en cultivos celulares, se propone analizar su función en la inducción y crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* mediante el uso de una mutante nula para la proteína, así como la generación de construcciones reporteras transcripcionales y traduccionales para evaluar la regulación de su expresión durante la proliferación de los callos.

4 Hipótesis

Dada la elevada abundancia de nCBP en cultivos celulares de *A. thaliana*, proponemos que su presencia es relevante durante la inducción y proliferación, mostrando una localización específica durante el cultivo *in vitro* de callos pro-embriogénicos.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Explorar la relevancia de nCBP en la inducción y proliferación de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*, así como su expresión y localización en estos tejidos.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar la inducción, el fenotipo y el crecimiento de los callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* en presencia y ausencia de nCBP
- Generar las fusiones transcripcionales *pncbp:GUS* y *pncbp:ncbp-GUS*.
- Transformar *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* con las construcciones *p35S:ncbp-GFP*, *pncbp:GUS* y *pncbp:ncbp-GUS*.

6 Materiales y métodos

6.1 Material biológico

Las semillas tipo silvestre (WT) y las mutantes nulas homocigotas *ncbp-1* de *A. thaliana* que se utilizaron fueron del ecotipo Columbia-0. Las semillas *ncbp-1* se obtuvieron de la colección de mutantes por inserción de T-DNA de SALK (SALK_131503.32.70).

6.2 Cultivo *in vitro* de *A. thaliana*

Las semillas se desinfectaron de acuerdo al protocolo de Encina (2001), con ciertas modificaciones. Las semillas se lavaron con 1 ml de solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) y 1 µl de yodo con agitación durante 20 min y posteriormente se hicieron 5 enjuagues con 12 ml de agua estéril por 30 s cada uno.

Se realizaron dos tratamientos: (1) el de germinación en un medio Murashige & Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento vegetal con 250 mg/L de cefotaxima; y (2) el tratamiento de inducción en medio MS adicionado con bencil aminopurina (BAP) 0.5 mg/L, ácido 1-naftalenacético (ANA) 1 mg/L, ácido indol acético (AIA) 1 mg/L, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1 mg/L y 250 mg/L de cefotaxima (Encina *et al.*, 2001). Para la solidificación del medio se agregó agar al 0.7% (P/V) y como fuente de carbono se usó sacarosa al 3% (P/V).

Se colocaron los cultivos en estratificación a 4°C durante 48 h en oscuridad.

Los cultivos del tratamiento de germinación se incubaron a 22°C en un fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad; L:O); el tratamiento de inducción se incubó a 28°C en un fotoperiodo 0:24 (L:O).

Los subcultivos del material vegetal de *Arabidopsis* se realizaron cada dos semanas. Posteriormente, se cambió el tiempo de dichos subcultivos a 4 semanas, debido a que en las primeras tres semanas el callo de *Arabidopsis* presentó hiperhidratación, y al inicio de la cuarta semana se quitó esta condición y comenzó la proliferación del callo; esto se determinó cualitativamente. Sin embargo, para determinar que hubo proliferación del callo de *A. thaliana* de manera cuantitativa fue importante realizar una cinética de crecimiento por un periodo de 4 semanas.

6.3 Medios modificados MS y B5

Debido a los niveles de oxidación causados por las sales del medio MS se decidió probar otros medios.

- 1) Se hizo una modificación del medio MS anterior donde los nitratos se redujeron al 50% y las demás sales al 75% (sulfatos, halógenos, fosfatos y quelantes). Además, se añadió ácido monohidratado 2-(N-morfolino) etanosulfúrico (MES) y polivinilpirrolidona (PVP), 1 g/L de cada reactivo.
- 2) Se preparó un medio de cultivo Gamborg B5, con los siguientes reguladores de crecimiento vegetal: AIA 1 mg/L, 2,4-D 1 mg/L y kinetina 0.1 mg/L. A este medio también se agregó MES 1 g/L y PVP 1 g/L. 10

Debido a los problemas de hiperhidratación en los callos se aumentó la concentración de agar a 0.8% (P/V)

Estos tratamientos sólo se probaron en semillas de *A. thaliana* Col-0 WT y a la mutante *ncbp-1*.

Se colocaron los cultivos en estratificación a 4°C durante 48 h en oscuridad.

Los cultivos del tratamiento de germinación se incubaron a 22°C en un fotoperiodo 16:8 (L:O); el tratamiento de inducción se incubó a 28°C en un fotoperiodo 0:24 (L:O).

Se hicieron subcultivos cada cuatro semanas.

Para la proliferación de callo se realizaron cambios respecto al tamaño de los frascos donde los callos más jóvenes se colocaron en frascos pequeños con 25 ml de medio de cultivo B5 modificado; entre más viejos fueron los callos son necesarios subcultivos en frascos de mayor tamaño para evitar la oxidación.

En el caso de los cultivos en suspensión se utilizaron los medios modificados mencionados anteriormente sin el agente gelificante, para *A. thaliana* Col-0 WT y la mutante *ncbp-1*.

6.4 Porcentaje de germinación

Se contabilizaron las semillas cultivadas en medio MS modificado y en Gamborg B5 tanto para *A. thaliana* silvestre y mutante. Se hicieron observaciones cada tercer día durante 10 días, debido al subsecuente subcultivo requerido por la especie en estudio. Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

6.5 Seguimiento de la formación de callo

Una vez realizada la desinfección de semillas de *Arabidopsis thaliana* a 3 años de haber sido cosechadas y su posterior inducción en el medio de cultivo Gamborg B5, se hizo el seguimiento de la germinación y formación de callo con la toma de una fotografía por día con el programa Motic® en el microscopio estereoscópico a partir del día 4 de la inducción hasta el día 20.

6.6 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se realizó una nueva germinación e inducción de semillas de *A. thaliana* a 11 meses de haber sido cosechadas para obtener muestras para su análisis por microscopía electrónica de barrido. Las muestras fueron tomadas en los mismos días en que en el primer lote de semillas germinadas y observadas mediante microscopía estereoscópica.

Inicialmente las muestras colectadas se fijaron con FAA (formaldehído al 10%, etanol al 50% y ácido acético glacial al 5%) por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 5 enjuagues con agua destilada para quitar el exceso de FAA y en seguida, se comenzó el proceso de deshidratación de las muestras, el cual consiste en cambios de etanol cada 24 h en el siguiente orden: etanol al 30%, 50%, 70%, 85% 96% y 3 cambios con estanol absoluto. Después, las muestras fueron secadas a punto crítico con CO₂. Una vez que las muestras fueron montadas, se cubrieron con oro durante 2 min (QUORUM Q150RES) para finalmente tomar las micrografías en el MEB Hitachi SUI510, operando entre 10-15 kV.

6.7 Cinética de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento de los callos producidos en los medios de cultivo MS y B5 modificados de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* en medio sólido se realizaron determinando el peso fresco. Se utilizó el callo que presentó características cualitativas favorables, es decir, sin oxidación o un grado mínimo de oxidación. Inicialmente se pesaron 0.5 g de callo y se llevó a cabo un registro de la diferencia en el peso de los mismos 3 veces a la semana durante 4 semanas.

Se realizaron precultivos en suspensión con 3 g de callo de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* por separado, en 30 ml de medio líquido B5 modificado en matraces de 125 ml. Se mantuvo en incubación durante 30 días a 25 °C con un fotoperiodo de oscuridad constante a 100 rpm. Después los cultivos se disgregaron una vez con el dispersor celular con malla 50 (No. Catálogo S0895) de Sigma-Aldrich cada 3 semanas quitando el exceso de callo acumulado, evitando así tomar agregados celulares muy variables que pudieran afectar en las mediciones.

La cinética de crecimiento en medio líquido se realizó en matraces de 125 ml con 15 ml de medio B5 modificado de *A. thaliana* y 15 ml del pre-cultivo de células en suspensión de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* con una baja densidad celular. Se obtuvo el peso fresco y el peso seco para la realización de la cinética de crecimiento y se determinó la fase exponencial para realizar las pruebas de viabilidad celular. Se les dio seguimiento durante 4 semanas.

6.8 Viabilidad celular

Las pruebas de viabilidad se realizaron con el *Fluorescent cell counting kit* (FCCK) de Sigma-Aldrich® basada en la reacción de calceína-AM (3', 6'-Di(O-acetil)-2', 7'-bis [N, N-bis-(carboximetil) aminometil]-fluoresceína, tetraacetoximetil éster) la cual permea rápidamente al citoplasma de las células. Si las células son viables las esterasas producen calceína, la cual es fluorescente a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión a 535 nm (Fig. 10).

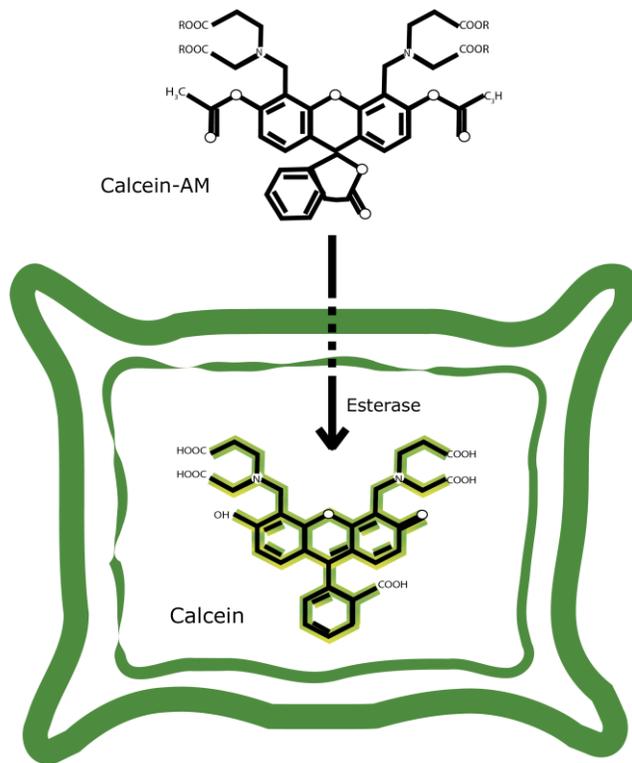


Figura 10. **Reacción de viabilidad celular con calceína-AM.** La calceína-AM permea la membrana celular la cual al interactuar con las esterases del citoplasma genera calceína, la cual emite fluorescencia.

Las pruebas de viabilidad se realizaron en los días 0, 5, 11 y 18 que corresponden a puntos de fase exponencial durante las cinéticas de crecimiento en cultivos líquidos para *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1*. En cada uno de los días indicados se tomaron alícuotas para generar curvas de dilución para la viabilidad celular. En placas de ELISA se colocaron 100 μ l de células y posteriormente se añadieron 10 μ l de calceína-AM/medio B5 (medio preparado para células en suspensión de *A. thaliana*, dilución de trabajo 1:50). Se incubó durante una noche a 24°C a 140 rpm. Posteriormente la intensidad de la fluorescencia se leyó con un filtro de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 535 nm.

De manera complementaria, con la cámara de Neubauer, se obtuvo el número total de células de *A. thaliana* vivas, el cual se pudo correlacionar con la intensidad de la fluorescencia dada por la reacción de las esterases sobre la calceína-AM.

Para determinar la viabilidad por este método se tomaron muestras de 1 ml de cultivo en suspensión de acuerdo a las utilizadas para la realización de una curva de dilución. Las muestras se centrifugaron en una microfuga durante 15 segundos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregó medio Gamborg B5 modificado fresco, una vez repetido ese paso nuevamente se añadieron 5 μ l del colorante azul de tripán a una concentración de 0.4% y se agitó

suavemente por 10 min. Se realizaron dos lavados para quitar el exceso de colorante de las muestras. Finalmente, se colocaron 10 μ l de la muestra con la tinción y se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 40X para hacer el conteo celular.

6.9 Clonación en pENTR/D-TOPO

Los fragmentos de interés que se colocaron fueron la secuencia asignada al promotor teórico de *nCBP* (*pnCBP*), que se encuentra 796 pb río arriba del codón de inicio de la traducción del gen correspondiente a *nCBP* (*At5g18110*) (de la Torre, 2009) y el fragmento del promotor más el fragmento del gen (*pnCBP:ncbp*).

Para la clonación de los fragmentos *pnCBP* y *pnCPB:ncbp* en pENTR/D-TOPO fue necesario diseñar un oligonucleótido *Forward* el cual tuviera integrada la secuencia CACC con el inicio del promotor en el extremo 5', mientras que los oligonucleótidos antisentido (*Reverse*) fueron usados para amplificar a partir el extremo 3' del *pnCBP* y *pnCPB:ncbp*. Los fragmentos se obtuvieron por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima *Phusion* de alta fidelidad (Thermo Fisher) que deja extremos romos. Enseguida, los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, a partir del cual se purificaron usando el kit ilustra GFX PCR DNA y purificación de bandas de gel, GE Healthcare®. Los productos de PCR fueron cuantificados con NanoDrop™.

Para cada reacción TOPO se añadiendo de 0.25 a 2 μ l (20 ng totales) del producto de PCR, 2 μ l de solución salina, 0.5 μ l (10 ng totales) del vector TOPO y se llevó a un volumen de 3 μ l con agua estéril, incubando a temperatura ambiente durante una noche. Los nuevos plásmidos obtenidos *pnCBP* y *pnCPB:ncbp* a partir de la reacción con TOPO fueron transformados en células competentes de *E. coli* DH5 α . Una vez seleccionadas las bacterias con kanamicina (50 μ g/ml), se aislaron varias colonias que fueron analizadas por PCR y con reacciones de digestión con las enzimas *NdeI* y *NotI* para *pnCBP* y con *EcoRI* para *pnCPB:ncbp*.

6.10 Reacción de recombinación tipo LR

Una vez clonadas las secuencias del *pnCBP* y *pnCPB:ncbp* en el vector pENTR/D-TOPO (Anexo 1), éstas fueron digeridas con la enzima *PvuII* para separarlas del gen que confiere resistencia a kanamicina, debido a que el vector destino pGWB3 también cuenta con el mismo gen de

resistencia. Posteriormente, los insertos correspondientes se separaron por electroforesis en gel de agarosa, a partir del cual se purificaron siguiendo el protocolo del kit ilustra GFX PCR DNA y purificación de bandas de gel, GE Healthcare®.

Se utilizó el plásmido pGWB3 (Anexo 1). Para transferir los insertos del vector de entrada (pENTR/D-TOPO) al vector destino, se hizo una reacción de recombinación tipo LR. El plásmido pGWB3 estaba a una concentración aproximada de 150 ng/μl, mientras que cada uno de los insertos provenientes del de entrada se utilizaron en una concentración de entre 50 a 150 ng/μl. En cada reacción se colocaron de 1 a 5 μl de la clona de entrada, 1μl del vector destino (pGWB3), 2 μl de Buffer 5X Reacción LR Clonasa™ y se llevó a 8 μl con Buffer TE, pH 8.0. En seguida se adicionaron 2 μl del mix de la enzima LR Clonasa™ y se incubó a 25°C por 4 h. Después, se detuvo cada reacción agregando 1 μl de Proteinasa K, la cual se incubó a 37°C por 10 minutos. En seguida se realizó la transformación bacteriana de las células competentes de *E. coli* DH5α.

Las colonias obtenidas fueron comprobadas por digestiones enzimáticas utilizando *EcoRI*, *PvuII* y *HindIII*; y mediante PCR con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para comprobación de vectores con GUS

PRONCBP5 Fw	AAGCTTTAAATCTACGGCGAAACAG
PRONCBP3 Rv	GGATCCTTTTTTCTCGATTAGAGC
NCBPSCT3 Rv	GGATCCTCCTCTCAGCCATGT
GUS Fw	GCCATTTGAAGCCGATGTCACG
GUS Rv	CGAATCCTTTGCCACGTAAGTCC

6.11 Transformación bacteriana

Se agregaron 2 μl del plásmido de interés a 50 μl de células competentes de *E. coli* DH5α y se mezclaron con la micropipeta. Inmediatamente la mezcla se dejó reposar en hielo durante 10 min y en seguida se realizó el choque térmico a 42°C por 50 segundos sin agitación. Posteriormente la preparación se dejó incubar en hielo durante 2 minutos y se añadieron 900 μl de medio LB para incubar a 37°C durante 60 min a 200 rpm.

Se plaquearon 100 μl de las células transformantes en medios de cultivo LB con kanamicina a 50 μg/ml y se dejaron en incubación a 37°C durante 24 h.

6.12 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de un gel de agarosa con el kit ilustra GFX PCR DNA y purificación de bandas de gel, GE Healthcare®. Cada uno de los fragmentos se cortaron directamente del gel de agarosa y fueron colocados en un tubo Eppendorf, se agregaron 10 µl de buffer 3 por cada 10 mg de gel (se agregó una cantidad mínima de 300 µl). Posteriormente los tubos se incubaron a 60°C durante 20 min y se mezclaron por inversión cada 3 min para la completa disolución del gel. Las muestras obtenidas se colocaron en una columna de purificación GFX MicroSpin con su tubo de colecta y se incubaron durante 1 min. Después las muestras se centrifugaron a 16,000xg por 30 s. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de buffer 1 de lavado a la columna de purificación, en seguida se centrifugó nuevamente a 16,000xg por 30 s. En seguida se colocó la columna en un tubo nuevo donde se eluyeron los fragmentos en 20 µl de agua libre de DNasa; se incubaron las muestras durante 1 min y finalmente se centrifugaron a 16000xg durante 1 min. Los fragmentos purificados se almacenaron a -20°C hasta uso.

6.13 Purificación de plásmidos

Para la extracción y purificación de DNA plasmídico se realizaron cultivos de 5 ml en medio LB con kanamicina a 50 µg/ml. En este procedimiento se utilizó el kit *GenElute® Plasmid Miniprep* (Sigma-Aldrich). Los plásmidos purificados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.14 Digestiones con enzimas de restricción

A cada reacción con enzimas de restricción se le agregaron 2 µl del respectivo buffer 10X para las enzimas utilizadas, se añadieron 420 ng de DNA plasmídico y se añadieron finalmente las enzimas de restricción (20U por reacción). Las reacciones se llevaron a un volumen total de 20 µl con agua mili Q y se incubaron a 37°C durante 2 h.

6.15 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis se realizó con un amortiguador TBE 0.5X y el gel preparó al 1% de agarosa y se añadió bromuro de etidio para la tinción del DNA.

Para el gel se cargaron diferentes volúmenes de plásmido de acuerdo a su concentración con amortiguador de carga (6X *DNA Loading Dye* de Thermo Scientific). El tamaño de los insertos

analizados se determinó usando el marcador de peso molecular *GeneRuler® 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific).

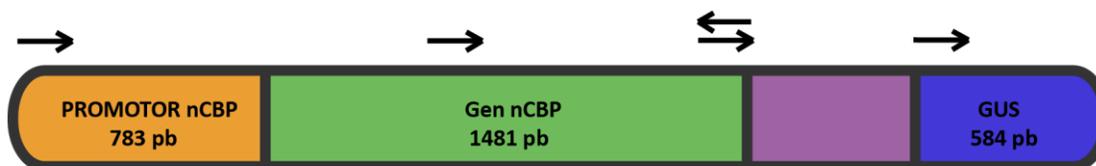
6.16 Secuenciación de plásmidos *pncbp:GUS* y *pncbp:ncbp-GUS*

Los vectores generados del promotor y promotor más gen de nCBP fusionados al gen reportero *GUS* (Fig. 11) fueron comprobados adicionalmente mediante secuenciación (Anexo 2) con la utilización de los oligonucleótidos presentados en la Tabla 2. Dicha secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para secuenciación de vectores con GUS

PRONCBP5 Fw	AAGCTTTAAATCTACGGCGAAACAG
NCBPSCT3 Rv	GGATCCTCCTCTCAGCCATGT
GUS Fw	GCCATTTGAAGCCGATGTCACG
GUS Rv	CGAATCCTTTGCCACGTAAGTCC
I-E6 nCBP Fw	CAGGGACTCGGGAAACATGGACAGC
nCBP1.3 Fw	CTCTCCGCGACAACCTTCC

PRO+gennCBP::GUS



PRONCBP::GUS



Figura 11. Construcciones de los vectores de *nCBP* fusionados al reportero *GUS*. Se muestran los diseños teóricos de las construcciones obtenidas a partir de la recombinación de *pnCBP* y *pnCPB:ncbp* (inicialmente clonados en pENTR) con el vector destino PGWB3. Las flechas en color negro indican el sitio donde se unen los oligonucleótidos para la secuenciación de los vectores.

6.17 Transformación de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* con biobalística

Los callos se subcultivaron 7 días antes del proceso de transformación en el medio B5 con una concentración de 8.5g/L de Agargel (Sigma-Aldrich) para promover la deshidratación y compactación de los callos. Una noche previa al bombardeo, se colocó una fina capa de callo de forma circular de aproximadamente 1 cm² en cajas Petri con el medio de cultivo Gamborg 5 modificado con una concentración del gelificante de 8.3 g/L.

Los 50 µl (3mg) de microbalas de tungsteno de ~0.7 µm de diámetro (M-10 de Bio-Rad™) se recubrieron con 5 µl (1 µg/µl) de los plásmidos de interés para la transformación (*35S::ncbp-GFP* y *pncbp::GUS*), y se añadieron 50 µl de CaCl₂ 2.5M y 20 µl de espermidina 0.1M. Para cada muestra de callo se realizaron 2 disparos a una distancia de 9 cm, con una presión de vacío a 22 mmHg y la presión para el disparo a 1100 psi.

6.18 Análisis de muestras transformadas por microscopía confocal

Las muestras de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* transformadas con el vector *35S::nCBP::GFP* fueron observadas en el microscopio confocal Olympus FluoView™ 1000, equipado con el software FV10-ASW 3.0 a una longitud de onda de excitación de 488 nm y detectado entre 500-525 nm. Debido a que los callos de *A. thaliana* presentaron autofluorescencia por la presencia de la clorofila, esta fue identificada a una longitud de excitación de 488 nm y un rango de detección de 630-690 nm. Las señales de la autofluorescencia fueron tomadas como fondo para asegurar que las longitudes emitidas en los callos fueran debidas a la excitación de la proteína reportera GFP y no a la excitación de la clorofila. Todas las imágenes tomadas se realizaron con el objetivo 40X.

6.19 Ensayo para la detección de la enzima β-glucuronidasa (GUS)

Una vez obtenidas las muestras transformadas con el gen reportero GUS, los callos se incubaron por 48 horas en oscuridad. Se agregaron a los callos 1 ml de solución de X-GlcA a una concentración de 1 mg/ml, y en seguida se incubaron las muestras a 37°C en oscuridad de 12 a 16. Después, la solución se desechó y se hicieron dos lavados con amortiguador Z (Anexo 3) pH 7. Dado que las muestras de callos carecen de clorofila finalmente se agregó glicerol al 50% y se almacenaron a 4°C.

7 Resultados

7.1 Germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*

El porcentaje de germinación de las semillas de *A. thaliana* Col-0 WT en medio MS y en medio Gamborg B5 fue similar (Tabla 3). La germinación de las semillas mutantes *ncbp-1* tampoco mostró diferencias significativas en ambos medios de cultivo utilizados. Aparentemente la germinación del ecotipo Columbia-0 WT y el mutante de nCBP fue diferente; sin embargo, el análisis de ANOVA no mostró diferencias significativas pues el valor $F = 0.196$ no supo el valor crítico para F que es de 3.49.

Medio de cultivo	Ecotipo	%
MS mod.	Col-0 WT	94.56
	<i>ncbp-1</i>	93
B5 mod.	Col-0 WT	96.44
	<i>ncbp-1</i>	93.14

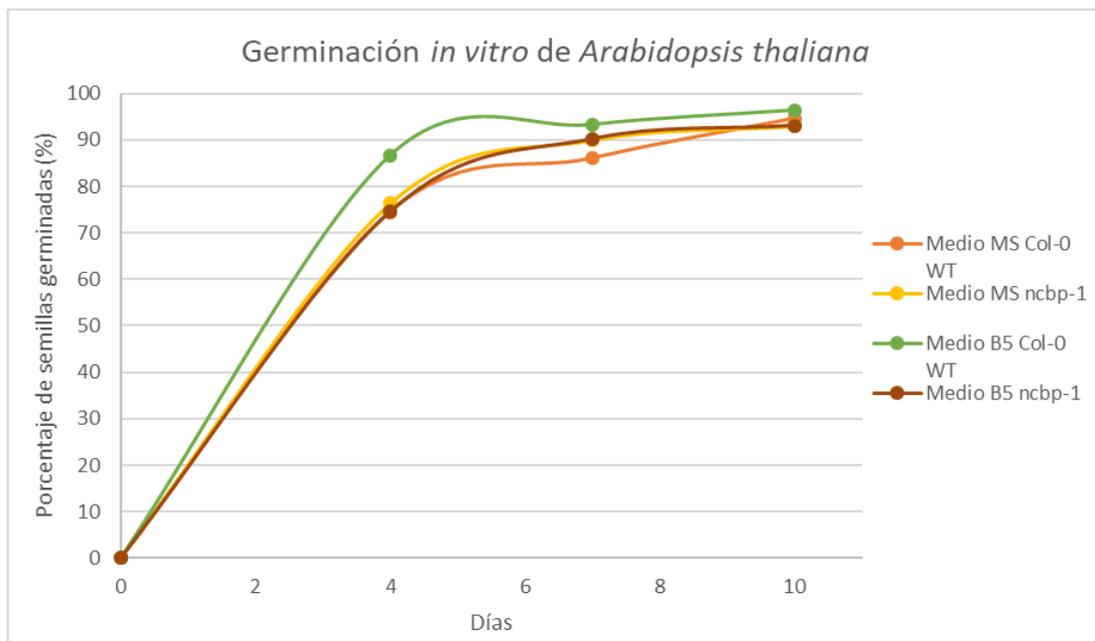


Figura 12. Porcentaje de germinación de semillas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia-0 WT y *ncbp-1* en los medios de cultivo MS y B5 modificados en un periodo de 10 días.

En la Fig. 12 se observa la tasa de germinación *in vitro* de las semillas de *A. thaliana* a 3 años de su cosecha. Es posible apreciar una germinación dentro de los primeros 4 días que representa más de un 70% en los dos medios de cultivo que se utilizaron, MS y B5 modificados, en las semillas WT como en las de las semillas *ncbp-1*, mientras que, en los días posteriores las semillas continuaron germinando aproximadamente un 20% más a partir del día 4. Dado que los porcentajes de germinación de las semillas almacenadas de hasta 3 años oscilaron entre el 93% y el 96.5% es posible decir que la tasa de germinación es considerablemente alta.

7.2 Formación de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*

El seguimiento de la germinación y formación del callo de *A. thaliana* WT comenzó con la emergencia de la radícula de la plántula, concretando así la germinación en el día 4 (Fig. 13A), en el día 5 se observó el crecimiento de la plántula y principalmente en el hipocótilo y los cotiledones (Fig. 13B). Posteriormente, en el día 7, se logró apreciar un ligero crecimiento de las plántulas en cuanto a la extensión de los cotiledones y un ensanchamiento en la zona transversal del hipocótilo, así como un ligero cambio en la coloración de la plántula de blanco a verde claro (Fig. 13C). En el día 11 hubo un ligero engrosamiento de aspecto híperhidratado en la zona del meristemo apical de la plántula, en el hipocótilo y en la radícula (Fig. 13D). Dos días después (día 13) se logró apreciar la proliferación celular en las zonas antes mencionadas y además en la zona distal de los cotiledones (proliferación diferencial respecto a *ncbp-1*). Dichas zonas presentan un aspecto vidrioso o híperhidratado a comparación del tejido original (Fig. 13E). En el día 18, la proliferación de las células se expandió de la zona del meristemo apical a la parte proximal de los cotiledones (Fig. 13G). Del día 15 al 20 únicamente hubo proliferación de los tejidos disgregados mencionados con anterioridad, la única estructura original que permaneció fue el tejido de la zona media de los cotiledones (Fig. 13F-H). En subcultivos posteriores se disgregó por completo hasta que quedaron únicamente masas celulares, es decir, callos pro-embriogénicos con una coloración clara entre amarillenta a café claro dependiendo del grado de oxidación.

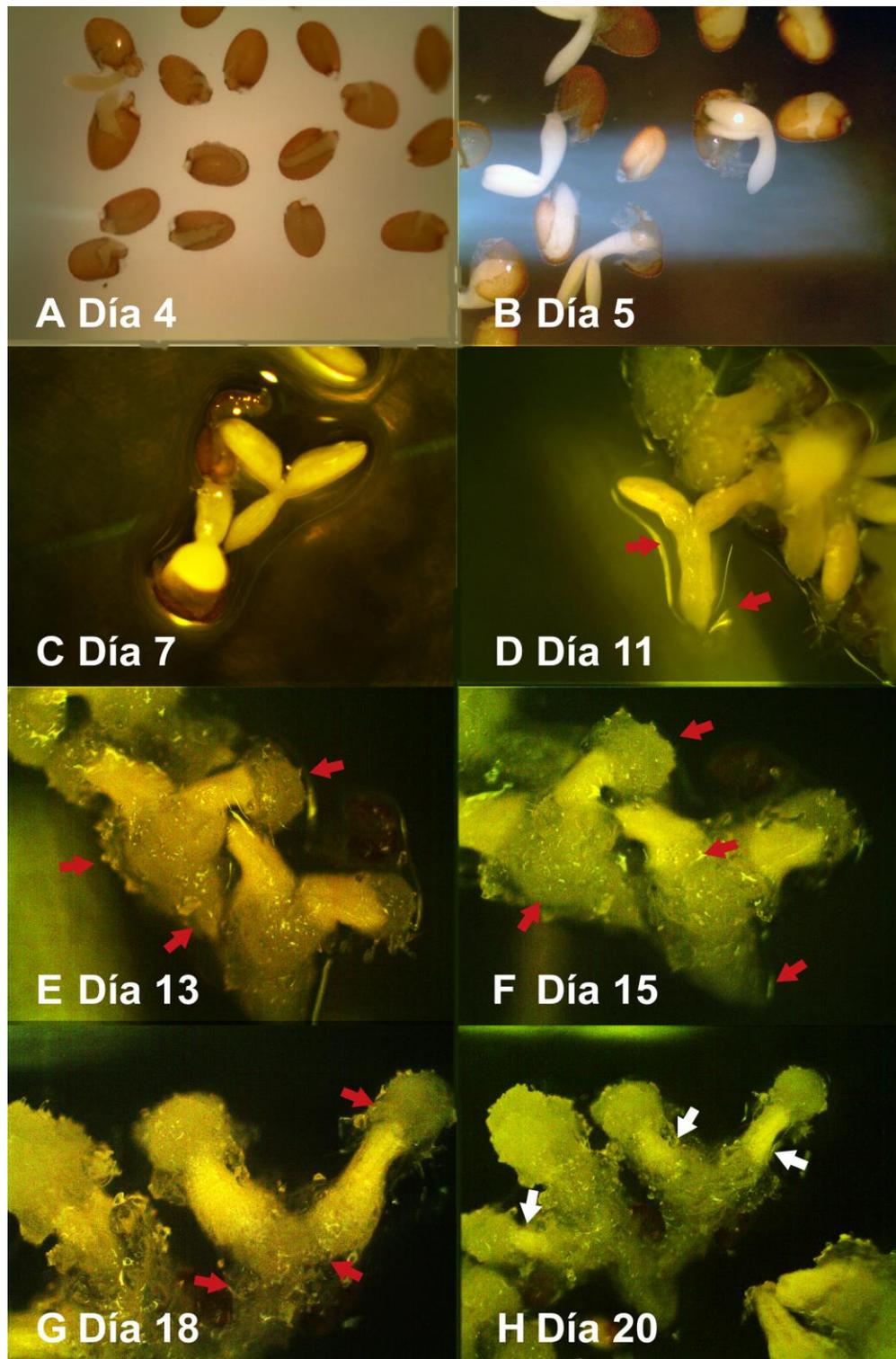


Figura 13. Formación de callo pro-embriogénico en medio B5 de *A. thaliana*, ecotipo Col-0 WT A) en el día 4 se observa la emergencia de la radícula (germinación); B) a los 5 días se lograron ver los cotiledones de las plántulas; C) al día 7 hubo un ligero crecimiento de las plántulas; D) en el día 11 comenzó la proliferación celular en la zona radicular; E) en el día 13 hubo mayor proliferación celular en la zona radicular y en la zona distal de los cotiledones, asimismo una expansión de la proliferación celular en los días F) 15, G) 18 y H) 20. Las flechas blancas indican sitios de dediferenciación y proliferación celular; las flechas azules indican zonas de mantenimiento del tejido madre.

En cuanto a la formación del callo pro-embriogénico a partir de las plántulas mutantes *ncbp-1*, se observó la germinación de dichas semillas en el día 4 con el característico rompimiento de la testa y la emergencia de la radícula (Fig. 14A); al día siguiente se apreció el crecimiento de la plántula, así como la presencia de los cotiledones fuera de la testa (Fig. 14B). En el día 7 en la plántula se observó un ligero crecimiento y expansión total de los cotiledones (Fig.14C). Posteriormente, en el día 11 se presentó un evidente engrosamiento de aspecto vidrioso de proliferación en el área proximal de los cotiledones en la zona del meristemo apical hasta la parte proximal del hipocótilo (Fig. 14D). A partir del día 13 la dediferenciación del tejido avanzó ligeramente hacia la parte media de los cotiledones (proliferación diferencial respecto a Col-0 WT), y abarcó completamente el hipocótilo hasta la radícula (Fig. 14E). Del día 15 al 20 las masas dediferenciadas proliferaron gradualmente, únicamente quedó la parte distal de los cotiledones con el tejido original (Fig. 14F-H) que, en posteriores subcultivos, se dediferenció totalmente.

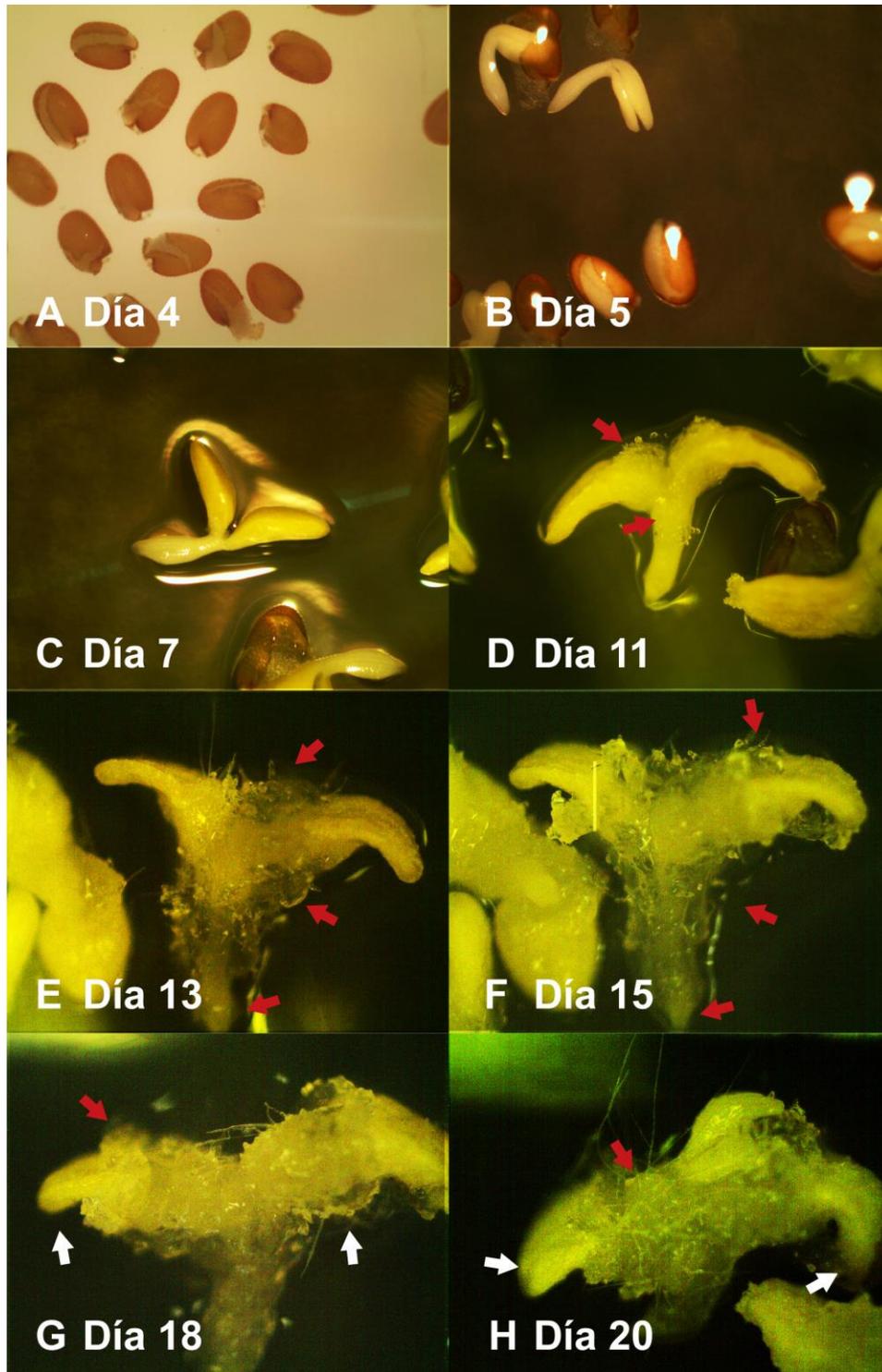


Figura 14. Formación de callo pro-embriogénico en medio B5 de *A. thaliana ncbp-1* A) en el día 4 se observa la emergencia de la radícula (germinación); B) a los 5 días se lograron ver los cotiledones de las plántulas; C) al día 7 día hubo crecimiento de las plántulas; D) en el día 11 comenzó la proliferación celular en zonas proximales a los cotiledones; E) en el día 13 hubo mayor proliferación celular en la zona radicular y en la zona proximal de los cotiledones, asimismo en los días F) 15, G) 18 y H) 20 siguió la expansión de la proliferación celular. Las flechas rojas indican sitios de dediferenciación y proliferación celular; las flechas blancas indican zonas de mantenimiento del tejido madre.

Las diferencias de la formación del callo pro-embriogénico entre las plántulas de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* fueron evidentes a partir del día 11, donde hubo una respuesta diferencial de las zonas que generan el callo y consecuentemente el progreso de éste (Fig. 13D y 14D). Además, hubo una notable distinción en el mantenimiento del tejido madre que mantuvo un estado diferenciado, donde en el caso de WT se presentó en la zona media de los cotiledones, mientras que para *ncbp-1* se dio en la zona distal de los cotiledones (Fig. 13H y 14H).

7.3 Caracterización morfológica de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* mediante microscopía electrónica de barrido

La germinación e inducción de callos pro-embriogénicos se hizo con semillas de *Arabidopsis* de 11 meses de cosecha.

En el día 4 de haber sido sembradas las semillas, se observaron plántulas germinadas de *A. thaliana*, tanto de semillas WT como de las mutantes *ncbp-1*, se logró apreciar zonas con células de mayor tamaño en el hipocótilo y en la parte abaxial de los cotiledones, diferentes a las células organizadas del tejido original (Fig. 15A y E). Sin embargo, esta respuesta no se logró ver en todas las muestras analizadas por MEB. En los días 5 y 7 las plántulas continuaron su crecimiento regular con un aumento de tamaño, ligero ensanchamiento en el límite entre la zona radicular y el hipocótilo y posteriormente la expansión de los cotiledones y el avistamiento de las primeras hojas verdaderas (Fig. 15B, C y F, G). Para ambos casos, en el día 11 se observó la formación del callo pro-embriogénico, así como las diferencias entre las plántulas WT y las *ncbp-1*. En las plántulas WT se logró ver un ensanchamiento en la zona próxima al meristemo apical, así como en el hipocótilo, además del inicio de la dediferenciación de la zona distal y proximal de los cotiledones, la zona radicular y del meristemo apical con la presencia de células alargadas y laxas entre ellas (Fig. 15D), por otra parte, las plántulas de la mutante *ncbp-1* mostraron de forma general un ensanchamiento en la zona limítrofe entre el hipocótilo y la radícula, además de la zona de hipocótilo cercana al meristemo, la dediferenciación se presentó inicialmente en los primeros primordios de hojas próximas a la zona meristemática (Fig. 15H).

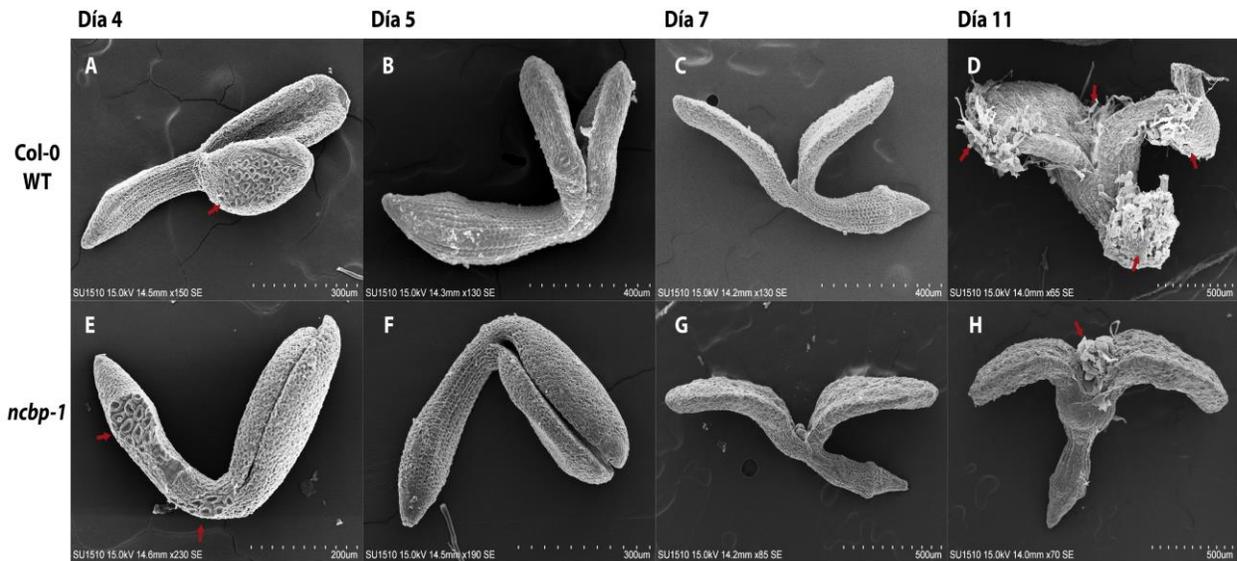


Figura 15. **Formación de callo pro-embriogénico en medio B5 para *A. thaliana* visto por MEB, día 4 al día 11** A-C) Secuencia del crecimiento de la plántula de Col-0 WT en los días 4, 5 y 7, D) formación del callo pro-embriogénico a partir de la parte distal de los cotiledones, radícula y zona del meristemo apical en Col-0 WT en el día 11. E-G) Crecimiento de las plántulas mutantes *ncbp-1* en los días 4, 5 y 7, H) Día 11, ensanchamiento de la parte del hipocótilo proximal al meristemo apical e inicio de la formación del callo a partir de primordios foliares próximos a la zona meristemática apical. Las flechas rojas indican zonas de respuesta de dediferenciación y proliferación celular.

En el día 13 se lograron apreciar más diferencias entre las plántulas WT y las *ncbp-1*. En las plántulas WT comenzó la proliferación del callo en las zonas próximas al meristemo apical, es decir, en la parte proximal del hipocótilo y de los cotiledones donde las células eran de mayor tamaño que las que aún se encontraban organizadas, algunas con formas alargadas; de igual manera que en el día 11 se ve la dediferenciación en la parte distal de los cotiledones (Fig. 16A). También en la mutante *ncbp-1* hubo proliferación del callo en los mismos sitios de alrededor de la zona proximal al meristemo apical con la presencia de células alargadas y desorganizadas. Sin embargo, en el día 13 aún no se observó dediferenciación en las partes distales de los cotiledones (Fig. 16E). En los días posteriores (15 y 18) hubo un incremento en la proliferación de los callos, así como nuevas zonas de dediferenciación del tejido madre que abarcaron el resto del hipocótilo, radícula y cotiledones (Fig. 16B, C y F, G), donde de forma general la última parte en dediferenciarse para el caso de las plántulas WT fue la zona media de los cotiledones en el día 20 (Fig. 16D). En cambio, la última parte en producir callo para las plántulas de la mutante *ncbp-1* fue la zona distal de los cotiledones (Fig. 16H). Sin embargo, las puntas de los cotiledones comenzaron antes dicha dediferenciación, quedando así sólo algunas reminiscencias de tejido madre que ya no se lograron ver en posteriores subcultivos.

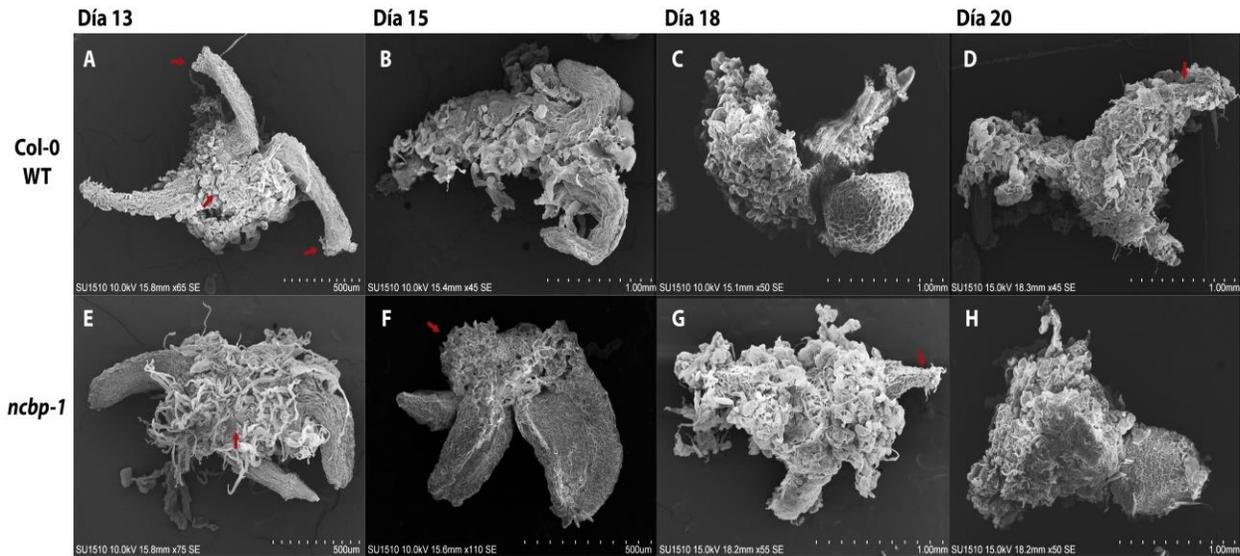


Figura 16. **Formación de callo pro-embriogénico en medio B5 para *A. thaliana* visto por MEB, día 13 al día 20** A) Día 13, desdiferenciación y proliferación celular de plántula de Col-0 WT de la zona de meristemo apical, parte del hipocótilo proximal al meristemo apical y de los cotiledones, así como de la parte distal de los cotiledones, B-C) día 15 y 18, desdiferenciación celular del hipocótilo, radícula y cotiledones, D) en el día 20 aún se pueden observar reminiscencia del tejido madre de la zona media de los cotiledones en las plántulas WT. E) Día 13, desdiferenciación y proliferación celular de plántula *ncbp-1* de la zona de meristemo apical, parte del hipocótilo proximal al meristemo apical y parte basal de los cotiledones; F-H) se dio la progresión de la proliferación celular en los días posteriores (15, 18 y 20). Las flechas rojas indican zonas de respuesta de desdiferenciación y proliferación celular.

Cabe mencionar que la velocidad de germinación y proliferación del callo varió entre las plántulas del mismo lote de semillas. Los procesos fueron más acelerados para las semillas más recientes (11 meses) que para las más viejas (3 años).

7.4 Fenotipo en la testa de las semillas de la mutante *ncbp-1* de *A. thaliana*

A nivel ultraestructural, se encontraron ciertas diferencias entre las semillas de *A. thaliana* WT y *ncbp-1*. El 87.5% de las semillas del ecotipo Col-0 WT presentaron una ornamentación en la testa con protuberancias de formas cónicas truncas; estas estructuras son llamadas columelas (Fig. 17A y B), mientras que las semillas de las plantas mutantes de *ncbp-1* presentaron una ornamentación diferente en la testa, compuesta por células con rebordes con una ligera elevación deprimida en la parte central, sitio que corresponde a la formación de la columela en semillas WT (Fig. 17C y D), la proporción de este fenotipo en las semillas fue del 87.5%. El 12.5% restante de las semillas WT presentaron una ornamentación similar a las de *ncbp-1* y viceversa.

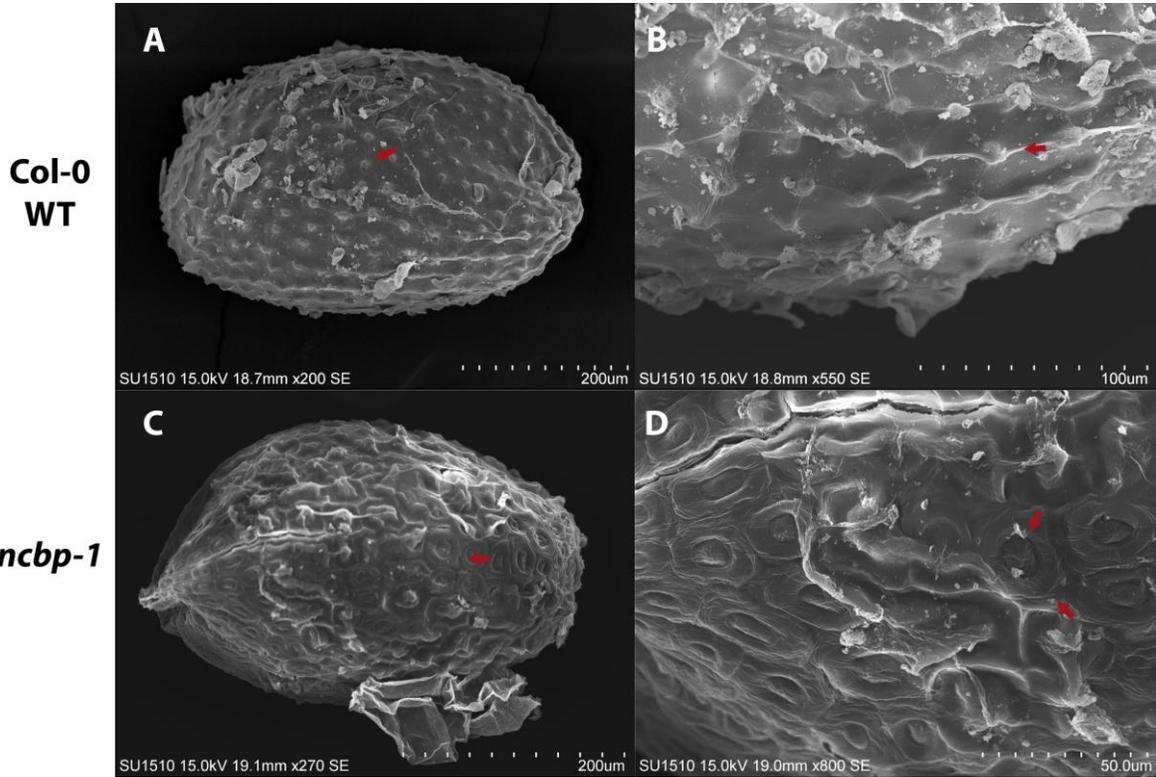


Figura 17. Semillas de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1*. En las semillas WT se resaltan con flechas la formación de las columelas en la testa, mientras que en las semillas mutantes *ncbp-1* se resalta con flechas la ausencia de las columelas generando células con rebordes.

7.5 Cinéticas de crecimiento de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1*

7.5.1 Comparación del crecimiento en los medios de cultivo MS y Gamborg 5 modificados

Inicialmente se hizo la comparación del crecimiento del callo pro-embriogénico de *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* en dos medios diferentes, MS (Murashige & Skoog) y B5 (Gamborg B5). En ambos casos se presentó una mayor tendencia de proliferación celular con el medio B5 que en el medio MS. Sin embargo, dicha tendencia no fue significativa debido al gran error estándar presentado durante las mediciones. En ambos medios de cultivo los callos pro-embriogénicos presentaron crecimiento partir del día 0, el cual probablemente inicialmente fue debido a la entrada de agua a las células, ya que el medio era nuevo y tenía inicialmente mayor cantidad de agua disponible y, por lo tanto, el peso de los callos aumentó. Posteriormente hubo un ligero decaimiento aparentemente por la salida del agua inicialmente introducida a las células. Se observó un aumento de crecimiento respecto al peso inicial (0.5 g de callo fresco) en el día 0, de 0.02 g en medio MS y 0.06 g en medio B5 en el día 10 para los callos WT (Fig. 18) mientras que el

crecimiento para los callos mutantes fue aproximadamente de 0.05 g en medio MS y 0.09 g en medio B5 (Fig. 19).

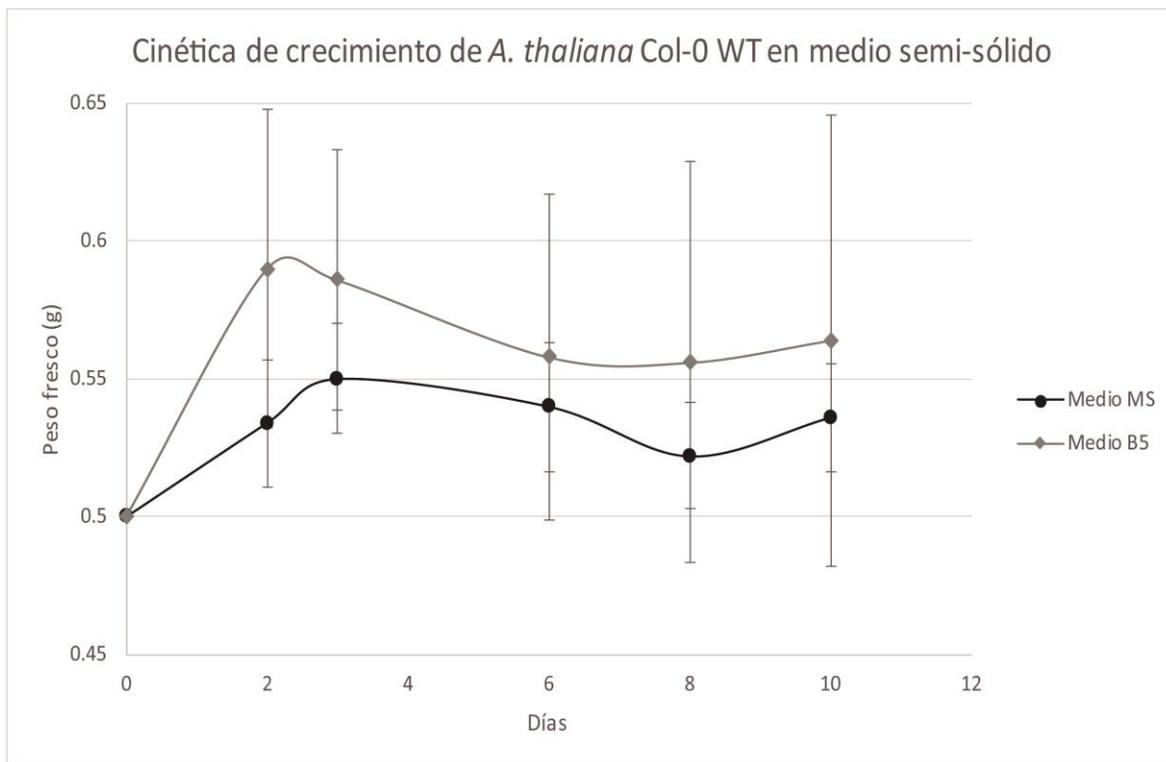


Figura 18. Cinética de crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*, ecotipo Columbia-0 WT. La cinética fue realizada en medios de cultivo semi-sólidos MS y B5 modificados. El peso fresco obtenido fue a partir de callos cultivados durante 10 días. Las barras muestran la desviación estándar.

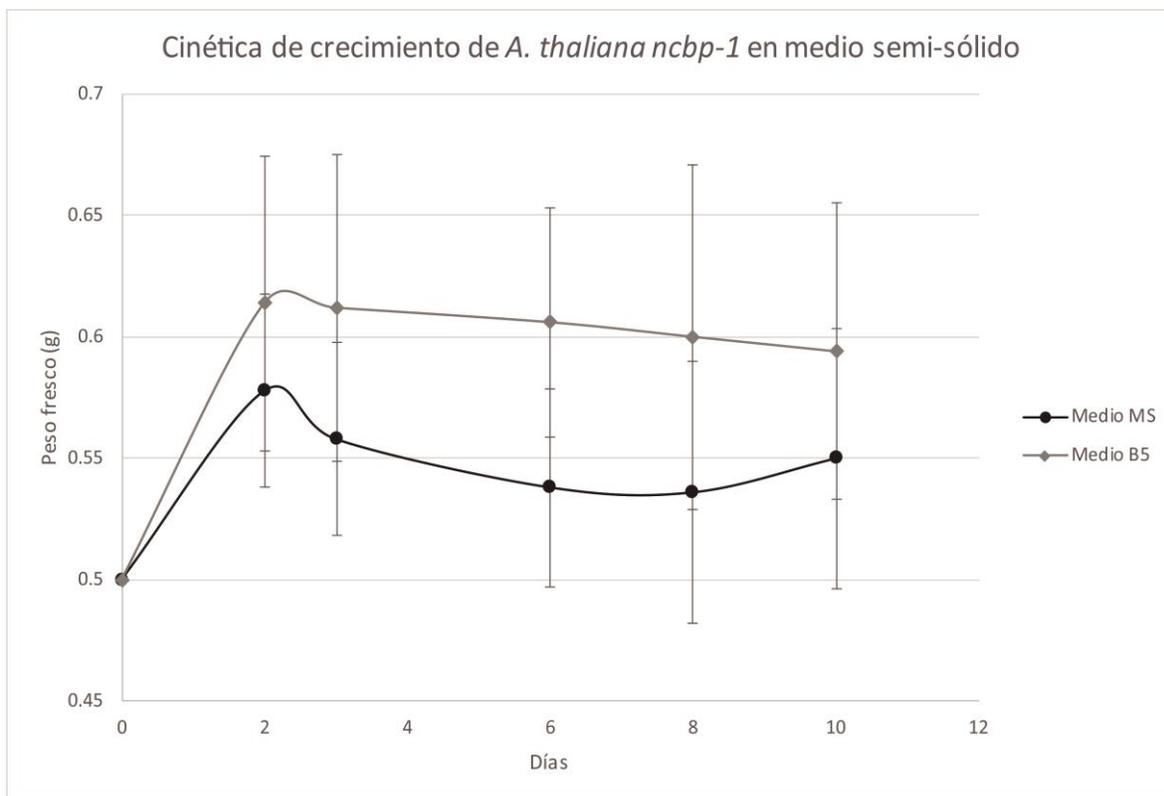


Figura 19. **Cinética de crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana, ncbp-1*.** La cinética fue realizada en medios de cultivo semi-sólidos MS y B5 modificados. El peso fresco obtenido fue a partir de callos cultivados durante 10 días. Las barras muestran la desviación estándar. N=5

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió utilizar únicamente el medio de cultivo Gamborg B5 para posteriores experimentos debido al mayor crecimiento en peso fresco de los callos pro-embriogénicos. Además, este medio se presentó menor porcentaje de oxidación en las masas celulares a comparación del medio de cultivo MS.

7.5.2 Cinéticas de crecimiento de callos pro-embriogénicos en medio de cultivo Gamborg B5 semi-sólido

La réplica 1 de la cinética de Col-0 WT y *ncbp-1* en medio semisólido mostró una tendencia de mayor crecimiento en el callo silvestre en comparación con la mutante *ncbp-1* (Fig.20). El crecimiento fue ser similar hasta el día 13; posteriormente se retrasó el crecimiento en la mutante *ncbp-1*. Sin embargo, dicha diferencia no fue significativa en este caso entre los grupos. No se logró observar una evidente etapa exponencial de crecimiento, pues hubo ligeros incrementos de peso debido al inicio constante de proliferación celular en los callos de ambas líneas de plantas.

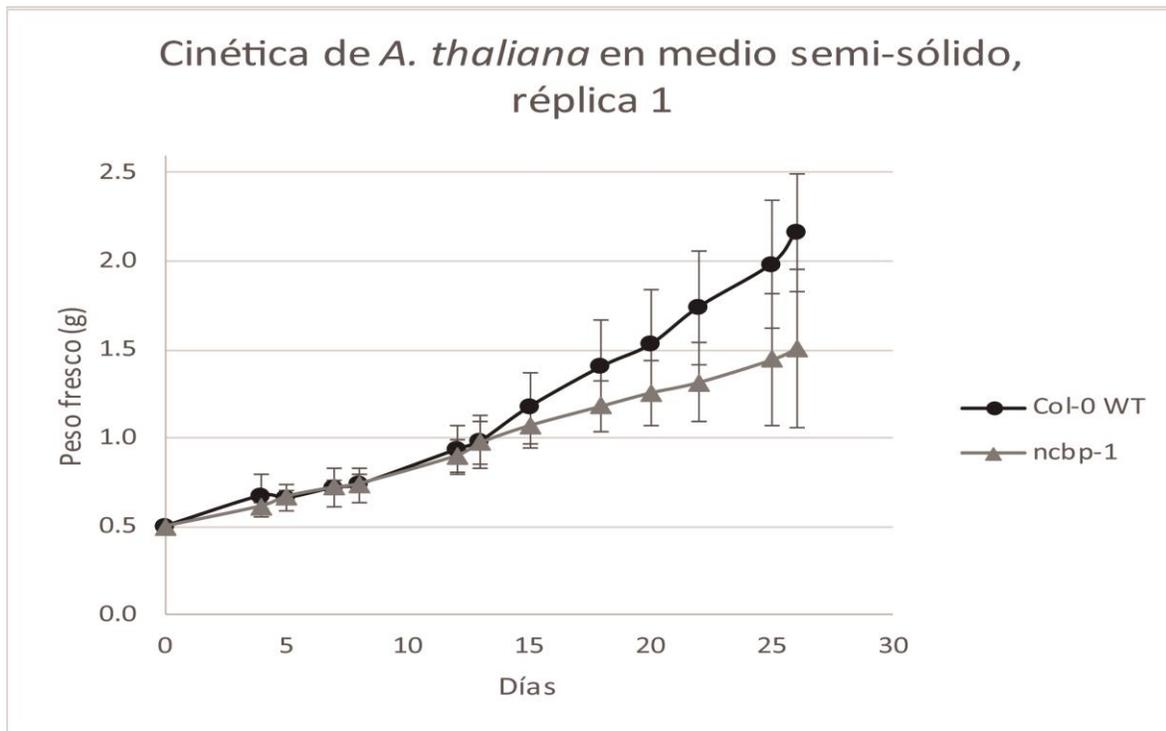


Figura 20. **Réplica 1 de la cinética de crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*, Col-0 WT y *ncbp-1*.** La cinética fue realizada en medio de cultivo semi-sólido Gamborg B5. El peso fresco obtenido fue a partir de callos cultivados durante 26 días. No hubo diferencias significativas entre grupos: $p < 0.01$, analizado con U de Mann-Whitney; $n=5$. Las barras muestran la desviación estándar.

Por otra parte, en la réplica 2 se apreció una diferencia inicial en la proliferación del callo pro-embriogénico de ambos tipos de plantas, WT y mutantes *ncbp-1*. Las plantas silvestres desde el día 5 hasta el 26 acumularon más peso fresco que las mutantes *ncbp-1*, siendo las diferencias significativas. El crecimiento de las plantas silvestres fue de tipo exponencial desde el décimo tercer hasta el último día en que los datos fueron recabados; en el caso de la mutante, aproximadamente comenzó a partir del día 23 una etapa exponencial más evidente que se prolongó al día 26 (Fig. 21). Cabe destacar que las cinéticas de crecimiento se realizaron con el mismo lote de callos inducidos a partir de semillas de 3 años, la única diferencia entre las réplicas radicó principalmente en el tiempo de subcultivo de los callos.

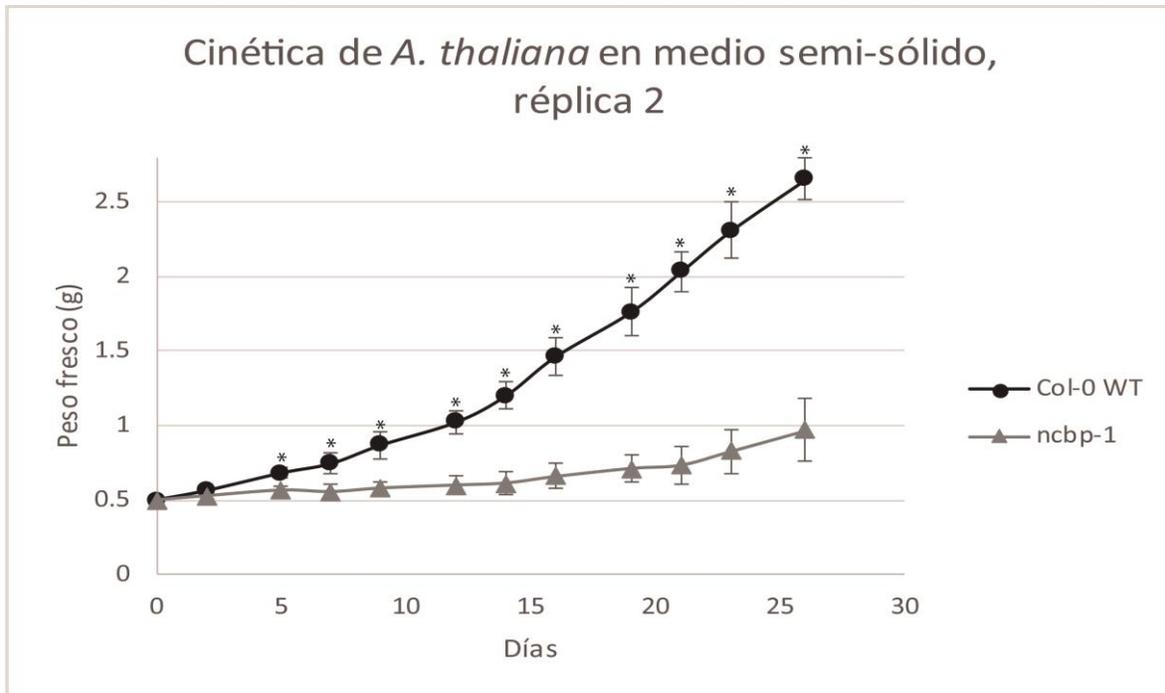


Figura 21. Réplica 2 de la cinética de crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*, Col-0 WT y *ncbp-1*. La cinética fue realizada en medio de cultivo semi-sólido Gamborg B5. El peso fresco obtenido fue a partir de callos cultivados durante 26 días. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre grupos: * $p < 0.01$, analizado con U de Mann-Whitney; $n=5$. Las barras muestran la desviación estándar.

En la réplica 3 de la cinética de crecimiento de callos pro-embriogénicos en medio B5 semi-sólido se pudo observar una diferencia en la proliferación celular entre los callos WT y mutantes *ncbp-1*. Los callos de las plantas WT mantuvieron un crecimiento por encima del de los callos mutantes *ncbp-1* con diferencias significativas a partir del día 5. La fase exponencial comenzó a partir del día 7 para los callos silvestres, y siguió hasta el día 26, que fue el último dato registrado; mientras que para *ncbp-1*, dicha fase se presentó de forma tardía hasta el día 14 (Fig. 22).

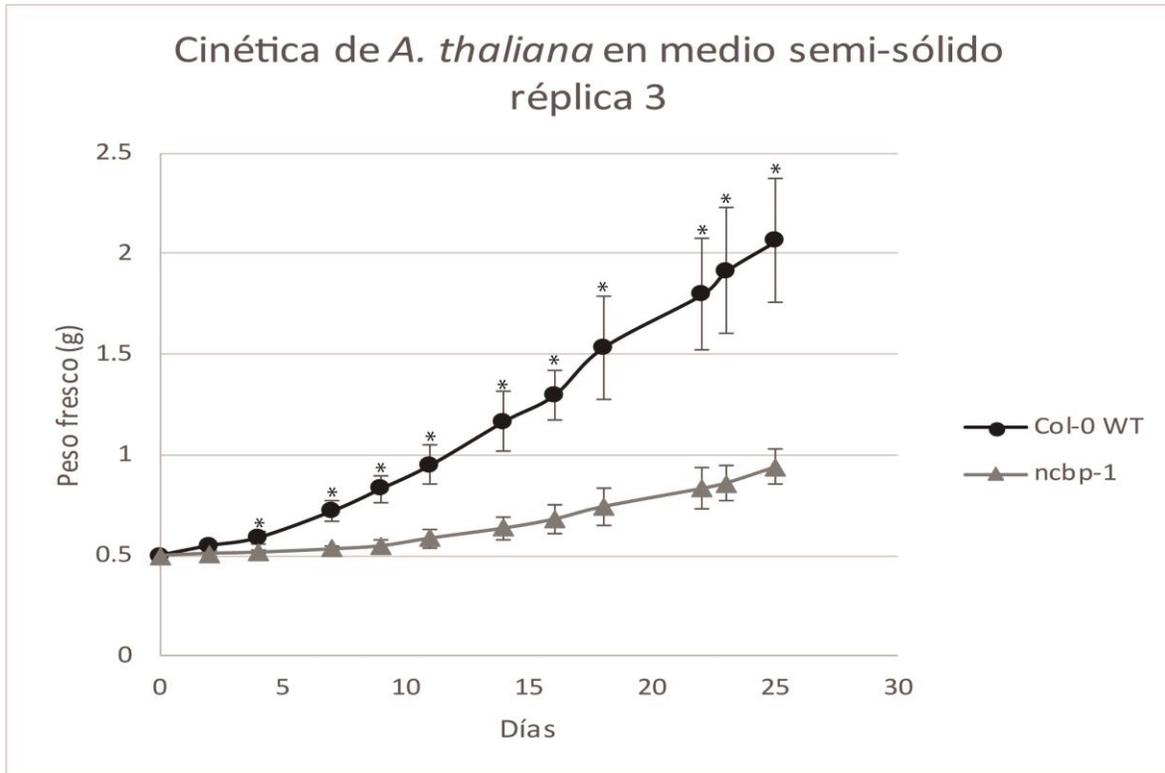


Figura 22. Réplica 3 de la cinética de crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*, Col-0 WT y *ncbp-1*. La cinética fue realizada en medio de cultivo semi-sólido Gamborg B5. El peso fresco obtenido fue a partir de callos cultivados durante 26 días. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre grupos: * $p < 0.01$, analizado con U de Mann-Whitney; $n=5$. Las barras muestran la desviación estándar.

El promedio de las réplicas de las cinéticas de crecimiento de los callos pro-embriogénicos de WT y *ncbp-1* mostró un mayor crecimiento de WT en relación a la mutante con una diferencia significativa en el día 2, y del día 5 hasta el 26. En este último día registró una diferencia de casi 1.2 g entre los grupos (Fig. 23).

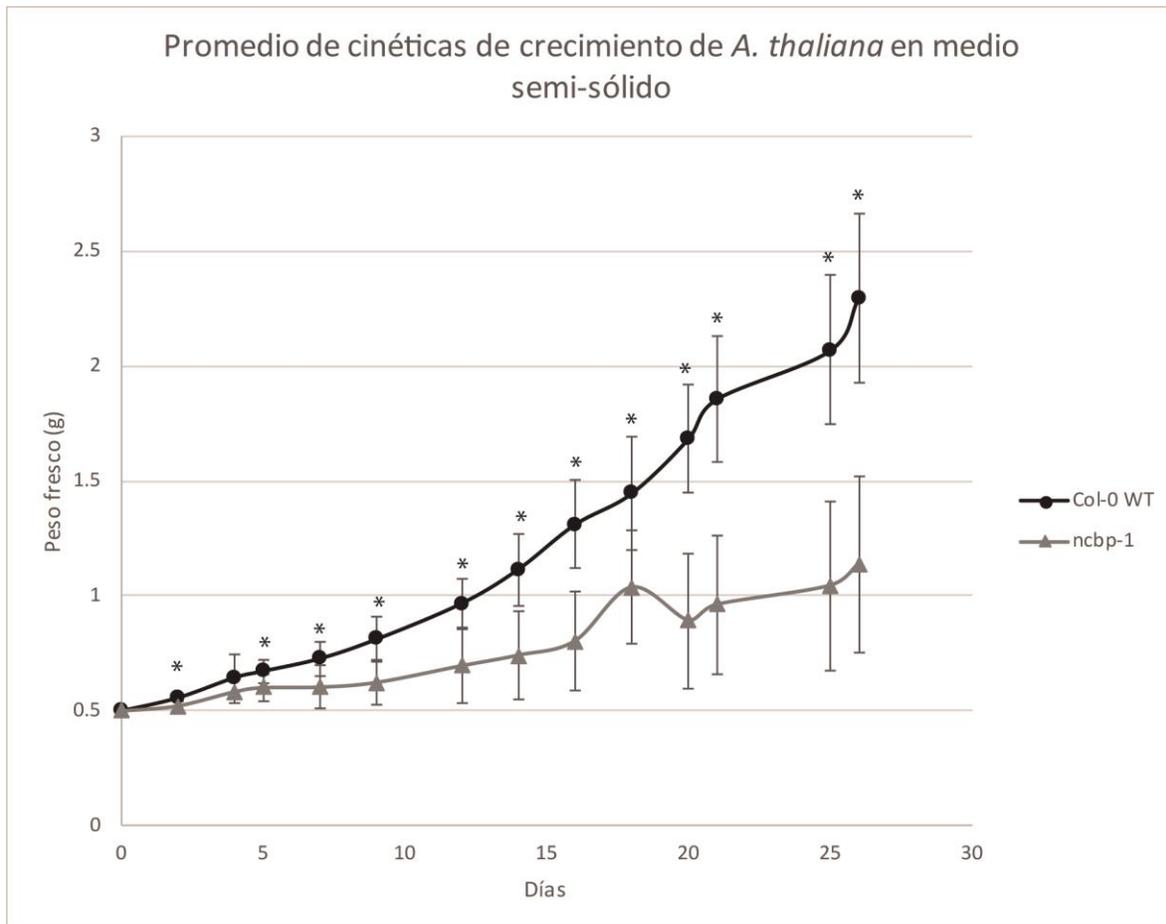


Figura 23. Promedio de las cinéticas de crecimiento de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana*, Col-0 WT y *ncbp-1*. La cinética fue realizada en medio de cultivo semi-sólido Gamborg B5. El peso fresco obtenido fue a partir de callos cultivados durante 26 días. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre grupos: * $p < 0.01$, analizado con U de Mann-Whitney; $n=5$. Evaluación de 3 réplicas biológicas. Las barras muestran la desviación estándar.

7.5.3 Cinéticas de crecimiento de callos pro-embriogénicos en medio de cultivo Gamborg B5 líquido

Se muestran las cinéticas de crecimiento por triplicado realizadas a partir de cultivos en suspensión en medio Gamborg B5 de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1* representadas en peso fresco y seco. Los datos de las cinéticas se normalizaron con respecto al día 0. La cinética de crecimiento en peso fresco de las células del callo de la mutante *ncbp-1* presentó una tendencia ligeramente por encima de los callos silvestres, de una forma similar a la tendencia que se observó en las suspensiones celulares para peso seco (Fig. 24 y 25). Es de enfatizar que los datos del peso fresco de los callos únicamente nos dan información del aumento/disminución de la masa evaluada, teniendo en cuenta el agua que puedan incorporar las células, independientemente del aumento

en su proliferación; una vez obtenido el peso seco es posible hacer referencia sobre proliferación celular. Sin embargo, en ninguna de las evaluaciones se detectaron diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento de WT y *ncbp-1*. Por otra parte, el perfil de la dinámica de la gráfica en la cinética de peso fresco mostró al menos dos etapas exponenciales. Es decir, dos ciclos de crecimiento aproximadamente entre los días 5 al 7 y del día 15 al 16 para cultivos *ncbp-1*, los cuales concordaron con la cinética de Col-0 WT en peso fresco donde se observaron dos fases exponenciales entre los días 5 al 7 y del 19 al 21. Esta última fase exponencial se desfasó por un par de días con respecto a la mutante *ncbp-1*(Fig. 24).

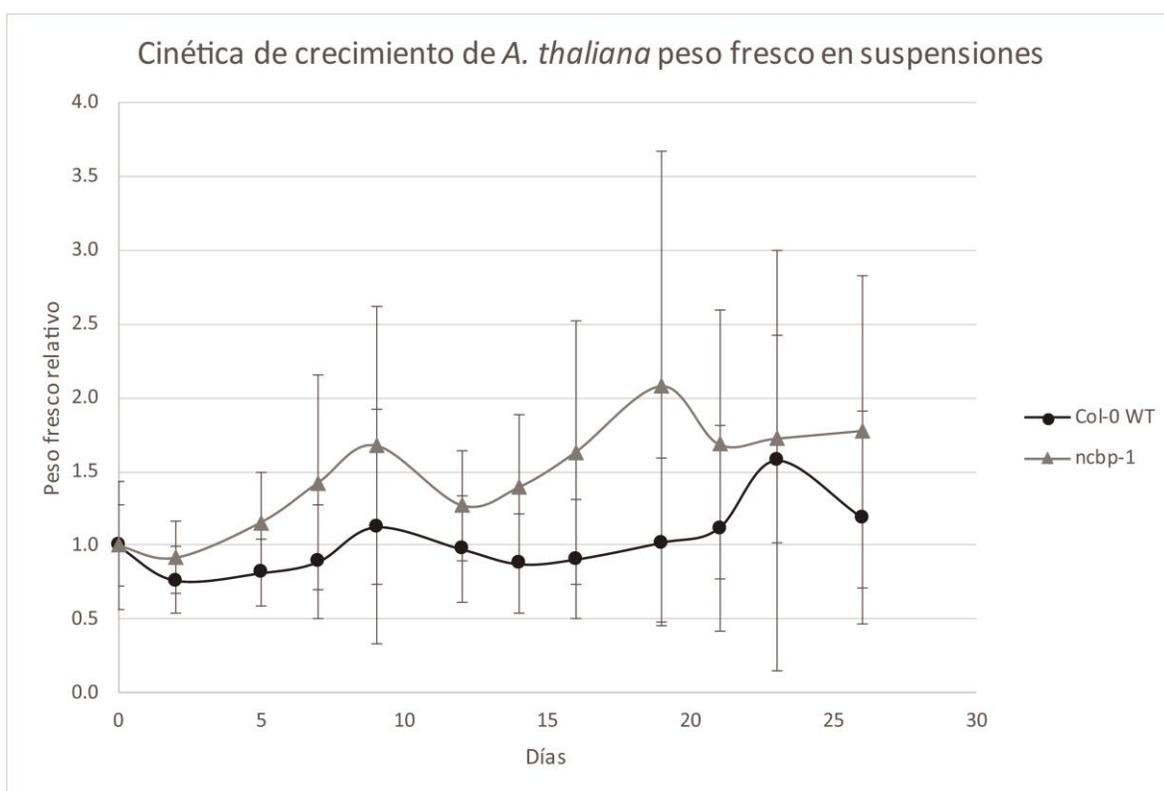


Figura 24. Cinética de crecimiento de cultivos en suspensión de *A. thaliana*, Col-0 WT y *ncbp-1*, peso fresco. La cinética fue realizada en medio de cultivo líquido Gamborg B5. El peso fresco obtenido fue a partir cultivos de células en suspensión cultivadas durante 26 días. Evaluación de 3 réplicas biológicas (n=5) normalizadas con respecto al día 0 de la cinética. Las barras muestran la desviación estándar.

En la cinética de peso seco se apreciaron dos fases exponenciales para los cultivos *ncbp-1* alrededor de los días 8 y 16. De manera similar, en WT se observaron en el día 8 y aparentemente en el 23 (Fig. 25)

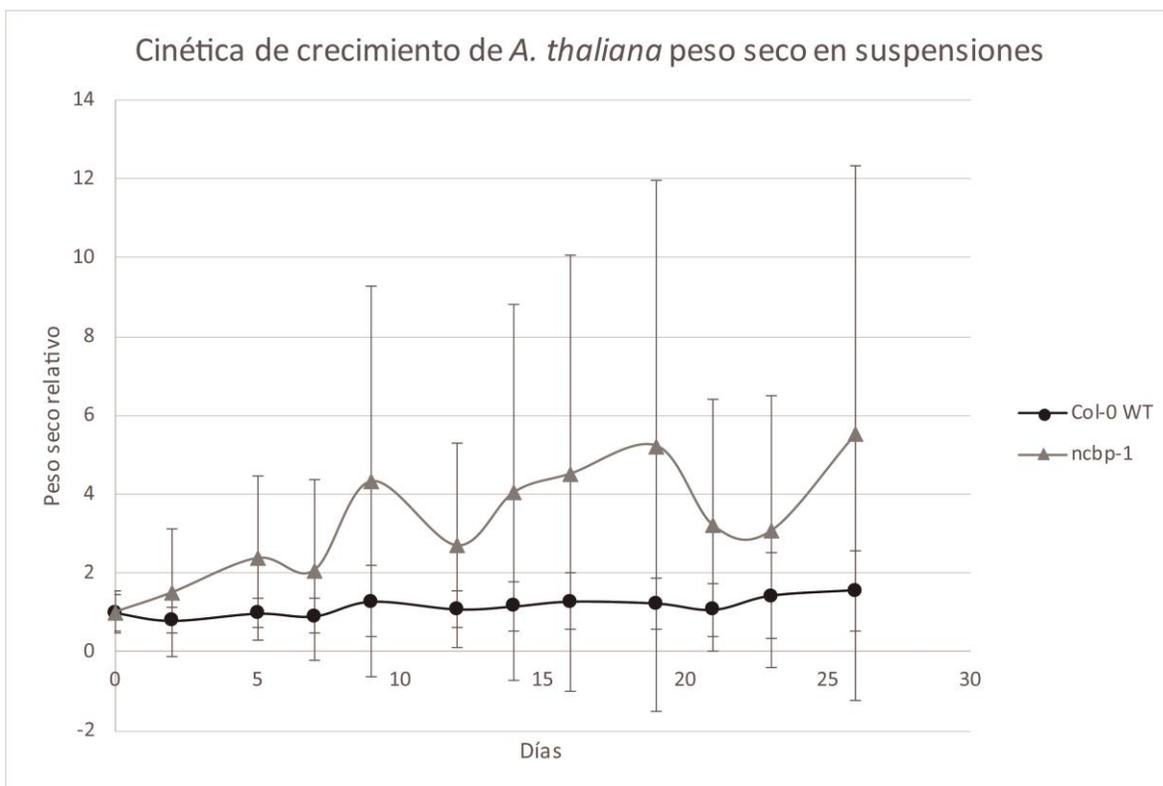


Figura 25. Cinética de crecimiento de cultivos en suspensión de *A. thaliana*, Col-0 WT y *ncbp-1*, peso seco. La cinética fue realizada en medio de cultivo líquido Gamborg B5. El peso seco obtenido fue a partir cultivos de células en suspensión cultivadas durante 26 días. Evaluación de 3 réplicas biológicas (n=5) normalizadas con respecto al día 0 de la cinética. Las barras muestran la desviación estándar.

7.6 Viabilidad celular de cultivos en suspensión de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1*

Los días evaluados para la viabilidad celular corresponden a las etapas exponenciales de la primera réplica de la cinética de crecimiento de peso seco de las células en suspensión de *A. thaliana*. Se evaluaron los cultivos de WT y de *ncbp-1* en los días 0, 5, 11 y 18. Las suspensiones de los callos silvestres tuvieron un alto porcentaje de viabilidad que osciló entre el 91% hasta el 97%, mientras que las suspensiones de los callos mutantes *ncbp-1* tuvieron un intervalo del 97% al 98%, pero con un mayor número de células vivas por mililitro de (Tabla 4). Dados los altos porcentajes de

viabilidad en los cultivos fue posible realizar posteriormente las pruebas de transformación genética de manera eficiente.

Tabla 4. Viabilidad de cultivos celulares de *A. thaliana*

Día	Viabilidad de cultivos Col-0 WT		Viabilidad de cultivos <i>nbcp-1</i>	
	Cel/ml	Porcentaje	Cel/ml	Porcentaje
0	5,350,000	94.58	20,567,500	97.43
5	1,700,000	94.37	16,570,833	98.08
11	4,424,286	91.12	14,791,667	97.36
18	6,792,500	96.86	31,741,667	97.74

La viabilidad de las suspensiones celulares de *nbcp-1* estaban por encima de los valores de las células de WT, pero las diferencias no fueron significativas. Por otra parte, es importante señalar que el porcentaje de viabilidad en los dos casos no bajó del 90%. La forma de crecimiento celular en los cultivos en suspensión puede ser variable (Fig. 26). En general, las células se encontraron en formas agregadas, pero en algunos casos se encontraron células grandes de forma solitaria; además las células mostraron formas circulares o alargadas, variando su tamaño de 2.5 μm a 34.1 μm con un promedio de 17.4 μm .

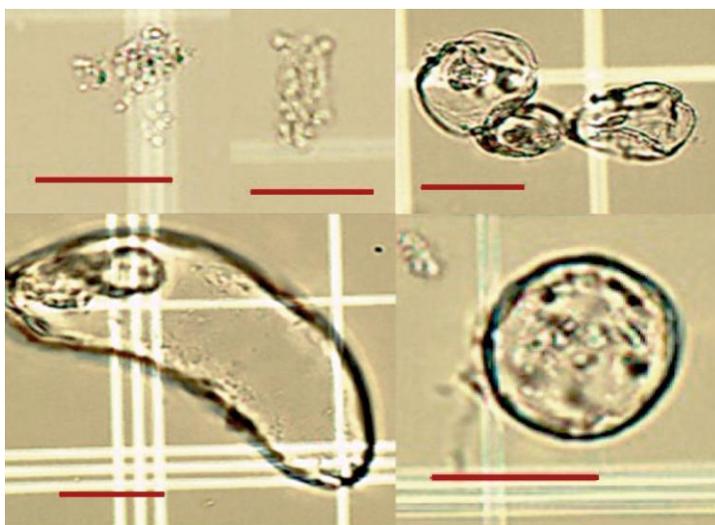


Figura 26. Heterogeneidad en cuanto a la morfología celular de los cultivos en suspensión de *A. thaliana*. Se muestran diferentes formas y tamaños de las células de *Arabidopsis*. Las fotografías se tomaron con el objetivo 40X. Escala= 20 μm .

7.7 Generación de construcciones reporteras

Se lograron amplificar las secuencias correspondientes al promotor *nCBP* (783 pb) y al promotor junto con el gen *nCBP* (2264 pb) a partir de DNA genómico de *A. thaliana* (Fig. 27A).

Los productos de la amplificación se purificaron a partir de un gel de agarosa y se clonaron en el vector de entrada pENTR/D-TOPO transformando células de *E. coli* DH5 α , generando así las construcciones pENTR:*pncbp* y pENTR:*pcbp-ncbp*.

Las construcciones de los vectores de interés que se generaron fueron verificadas por reacciones de digestión para distinguir si la posición de inserción de los fragmentos fue la correcta. Para el plásmido de pENTR:*pncbp-ncbp* se muestra el gel de electroforesis (Fig. 27B) donde aparece en el primer carril el plásmido sin digerir y en el segundo el plásmido digerido con la enzima *EcoRI*, donde se pueden observar las dos bandas esperadas con pesos de 1363 pb y 3491 pb que indican que la inserción del fragmento de *pnCPB:ncbp* al vector de pENTR fue correcta. Para los plásmidos de *pnCBP* las reacciones de doble digestión se realizaron con las enzimas *NdeI* y *NotI*, esperando dos bandas, una de 644 pb y otra de 2719 pb, tal y como se muestra en la Fig. 27C lo que indica que el fragmento que corresponde al *pnCBP* se insertó correctamente en el vector de entrada.

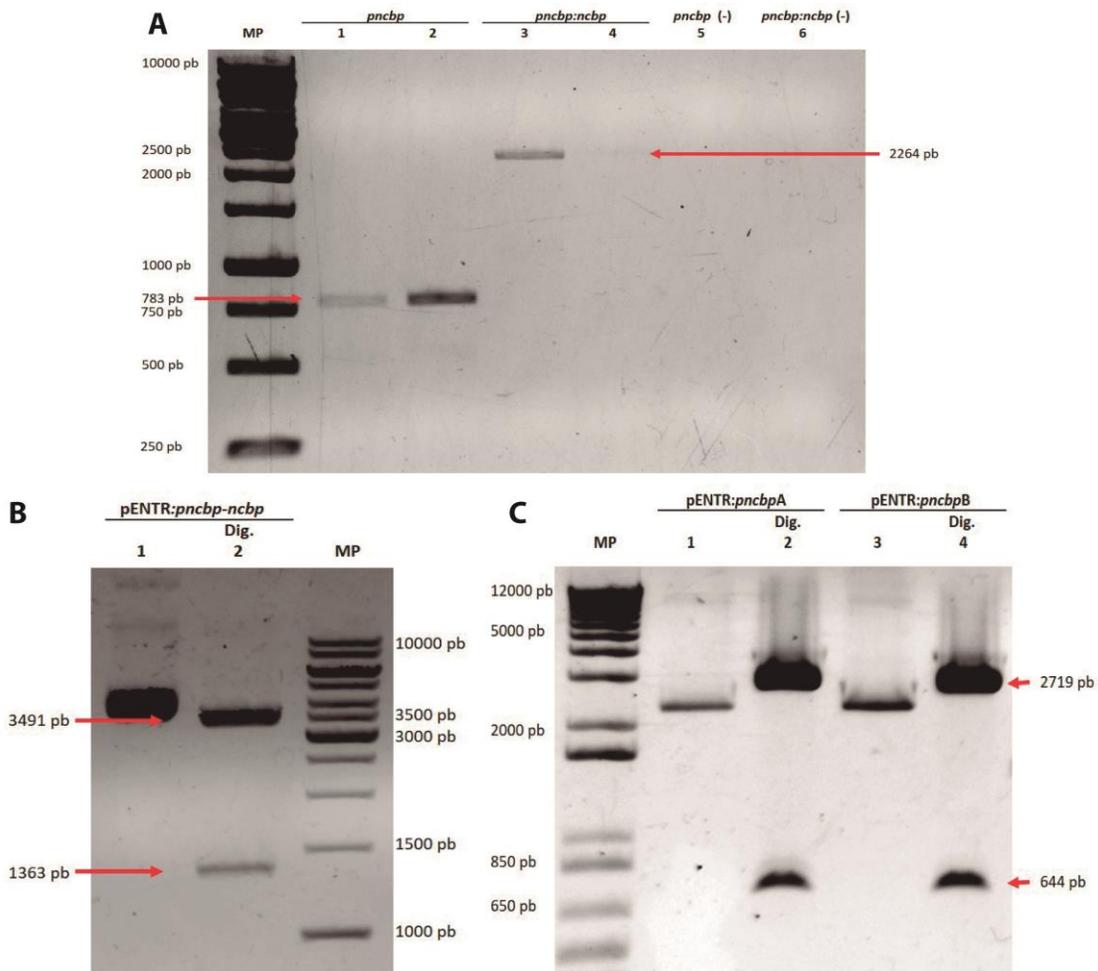


Figura 27. Construcciones de *pncBP* y *pncPB:ncbp* en pENTR. A) En los carriles 1 y 2 se muestran las amplificaciones para el promotor *nCBP* de 783 pb; en los carriles 3 y 4 están se observan los fragmentos amplificados del promotor más el gen *nCBP* con un tamaño de 2264 pb. En los carriles 5 y 6 se muestran los respectivos controles negativos. B) Digestión de los plásmidos *pncPB:ncbp*. En el carril 1 se muestra el plásmido sin digerir, mientras que en el carril 2 se encuentra el plásmido digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. C) Digestión de los plásmidos *pncBP*. En el carril 1 y 3 se muestra el plásmido sin digerir de dos diferentes muestras y en seguida se muestran sus respectivas digestiones con las enzimas de restricción *NdeI* y *NotI*.

Para la obtención de los plásmidos con las secuencias correspondientes al *pncBP* y *pncPB:ncbp* fusionadas al gen reportero *GUS*, que codifica la β -glucoronidasa, primero se digirieron con la enzima *PvuII*. Después los fragmentos de interés, con los sitios *attL* (sitios de recombinación) fueron purificados a partir de geles de agarosa, obteniendo así los fragmentos de 1421 pb y de 2902 pb que corresponden a *pncBP* para *pncPB:ncbp* respectivamente.

Una vez purificados, los fragmentos de interés, estos se utilizaron para la reacción de recombinación *LR* con el vector pGWB3, el cual tiene la característica de no tener un promotor,

contiene el gen reportero que codifica a *GUS* y los genes de resistencia a kanamicina para bacterias e higromicina para plantas.

Tabla 5. Fragmentos de los plásmidos esperados con enzimas de digestión

	PGWB3	<i>pncbp:GUS</i>	<i>pncbp:ncbp-GUS</i>
<i>EcoRI</i>	12923 pb		13927 pb
	5352 pb	17601 pb	5155 pb
<i>PvuII</i>	6250 pb	6146 pb	7627 pb
	5081 pb	5081 pb	5081 pb
	4218 pb	4218 pb	4218 pb
	1699 pb	1699 pb	1699 pb
	570 pb	457 pb	457 pb
	457 pb		
<i>HindIII</i>	18275 pb		19082 pb

De las transformaciones de células de *E. coli* con las construcciones resultantes de la recombinación (*i.e.* las construcciones en el vector destino), se probaron dos colonias de cada una de las mismas por análisis de restricción con diferentes enzimas. El patrón de bandas del plásmido pGWB3 generado con las enzimas fue el esperado. pGWB3 fue linearizado con la enzima *HindII* dejando un fragmento de 18,275 pb, mientras que con la enzima *EcoRI* se obtuvieron fragmentos de 12,923 pb y 5,352 pb, y para *PvuII* se lograron ver aproximadamente 5 de los 6 fragmentos esperados de casi 6,250 pb, 5,081 pb, 4,218 pb, 1,699 pb y 570 pb (Fig. 28).

Los fragmentos obtenidos de las dos colonias aisladas de *pncbp:GUS* con las enzima *PvuII* fueron de 6,146 pb, 5,081 pb, 4,218 pb y 1,699 pb, por lo que fue posible discernir si el vector generado era candidato para ser secuenciado.

Los vectores de las colonias aisladas para *pncbp:ncbp-GUS* se presentan en el carril 11 y 15 con una muestra sin digerir, luego se pueden observar las muestras de las reacciones de digestión con las enzimas *HindIII*, *EcoRI* y *PvuII*, que en ninguno de los casos muestran las bandas esperadas que se muestran en la tabla 5.

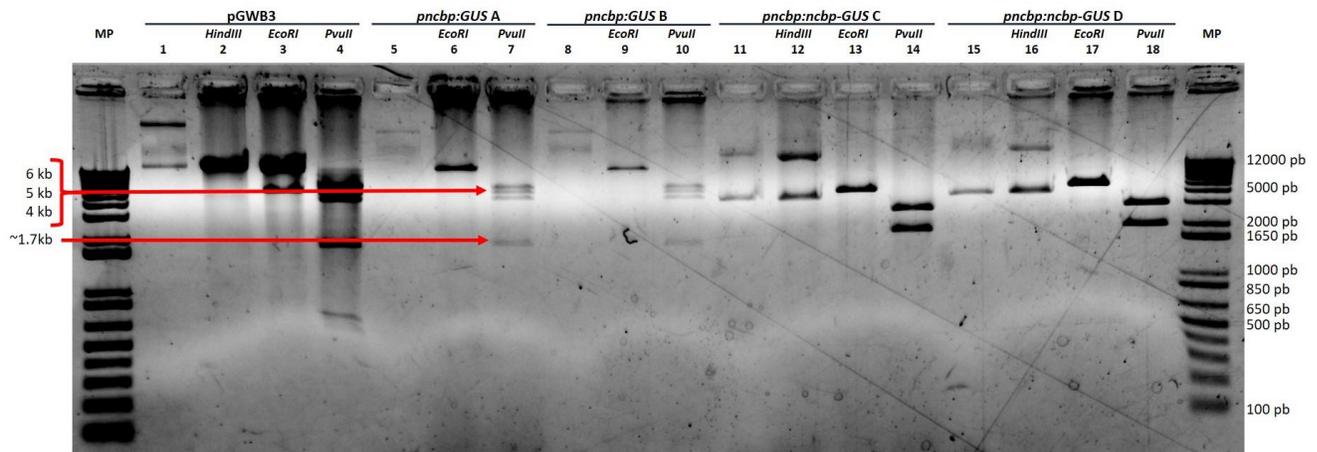


Figura 28. Digestión de los plásmidos promotor y promotor+gen *ncbp* fusionados con *GUS*. En los carriles del 1 al 4 se muestran las pruebas realizadas para el vector destino PGWB3 donde se presenta el plásmido sin digerir, linearizado y posteriormente cortado. En los carriles 5 a 10 se muestran dos muestras distintas de los vectores *pncbp:GUS* se presenta el plásmido sin digerir, linearizado y cortado con *PvuII*. Finalmente, en los carriles del 11 al 18 se hay dos muestras diferentes de. Vector *pncbp:ncbp-GUS* que de la misma forma se presentan si digerir, linearizados y cortados con diferentes enzimas de restricción.

Por otra parte, los vectores del promotor y el promotor más gen fusionados a *GUS* también fueron verificados por PCR. En el análisis por electroforesis (Fig. 29) se observa el producto de la amplificación de *GUS* (584 pb) a partir del vector destino pGWB3 con el cual se hizo la reacción LR (carriles 1 y 10; Fig. 29). En seguida se muestra la amplificación del gen *GUS* de manera independiente para los plásmidos generados *pncbp:GUS* y *pncbp:ncbp-GUS* de tres colonias aisladas, que de igual manera presentan la banda esperada de 584 pb. En los carriles 3, 5 y 7 se muestran las amplificaciones con los oligonucleótidos forward para el inicio del promotor *nCBP* y reverse para *GUS* produciendo una banda de 1,875 pb para las 3 colonias aisladas, tal como se esperaba. Sin embargo, la combinación de los oligonucleótidos para el promotor más el gen *nCBP* y *GUS* no amplificaron la banda esperada de 3,356 pb en ninguno de los casos, indicando que la recombinación LR entre los fragmentos purificados a partir de pENTR:*pncbp-ncbp* y el vector destino pGWB3 no se llevó a cabo de manera exitosa.

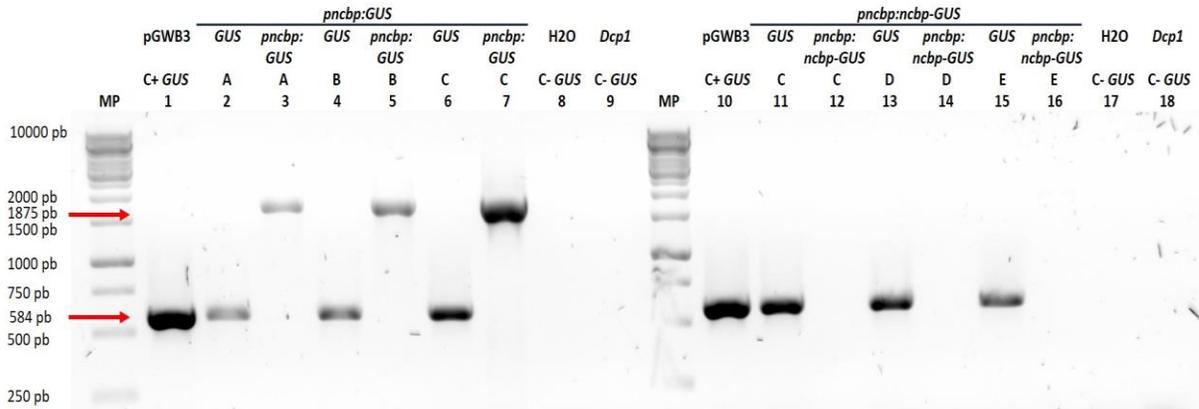


Figura 29. Comprobación por PCR de los plásmidos promotor y promotor+gen *ncbp* fusionados con GUS. En los carriles 1 y 10 se observan los controles positivos para GUS. En los carriles 2, 4 y 6 se observan los fragmentos de GUS para distintas muestras de plásmido *pncbp:GUS* y en los carriles 2, 5 y 7 los fragmentos promotor *nCBP* y GUS. En los carriles 11, 13 y 15 se observan los fragmentos de GUS para distintas muestras de plásmido *pncbp:ncbp-GUS* y en los carriles 12, 14 y 16 los fragmentos promotor+gen *ncbp* y GUS, sin embargo éstos últimos no se lograron observar. Se muestran los controles negativos para el fragmento de GUS.

Una vez comprobada la construcción generada *pncbp:GUS* se procedió a realizar la transformación por biobalística en los callos pro-embriogénicos de *Arabidopsis* inducidos a partir de las plántulas. Se lograron obtener callos transformados utilizando dos distancias diferentes (6 y 9 cm). Las transformaciones de los callos se evaluaron con ensayos de GUS, lo que permitió identificar visualmente mediante el cambio de coloración a azul los sitios transformados de forma localizada (Fig. 30A). Además, se utilizaron como control positivo para el bombardeo y para la prueba histoquímica callos pro-embriogénicos de maíz (*Zea mays*), los cuales en condiciones naturales presentan expresión endógena de la β -glucoronidasa. A nivel subcelular la proteína GUS se expresó bajo en promotor *nCBP* de manera difusa en el citoplasma y el núcleo de algunas células que conforman los callos de *A. thaliana* WT, además dicha expresión fue diferencial en los cúmulos de células transformadas de los callos ya que se observaron diferentes intensidades de coloración después del ensayo histoquímico de GUS (Fig. 30B).

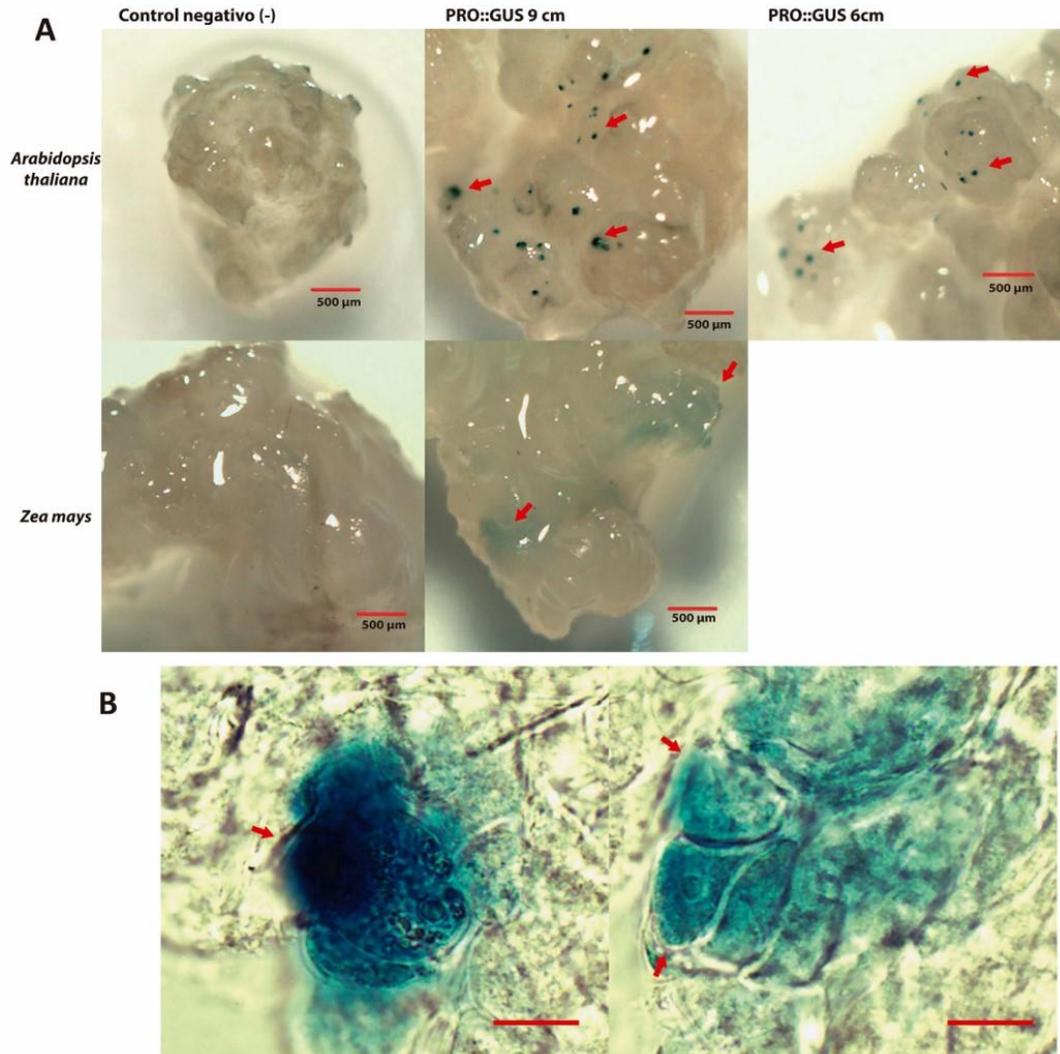


Figura 30. **Comprobación de la transformación de callos de *A. thaliana* mediante ensayo de β -glucuronidasa.** A) Se observan los callos de *A. thaliana* Col-0 WT transformados por biobalística; el control negativo no mostró cambio en la coloración mientras que en los callos donde se bombardeó con el vector *pncbp::GUS* presenta cambios de coloración localizados en distancia de 6 cm y 9cm. Como control positivo se utilizaron callos pro-embriogénicos de *Zea mays* donde se observa una expresión difusa de GUS. Escala= 500 μ m. B) Localización subcelular de GUS bajo el promotor *nCBP* en callos transformados de *A. thaliana* WT. Obetivo 100X; escala= 10 μ m

7.8 Expresión de *35S::ncbp-GFP* en callos pro-embriogénicos de *Arabidopsis thaliana*

Ya que no se logró generar el plásmido *pncbp::ncbp-GUS* se utilizó el plásmido *35S::ncbp-GFP* (Anexo 1) generado por de la Torre (2009), fue verificado mediante una reacción de digestión con la enzima *EcoRI*, la cual realiza dos cortes dentro del plásmido. En el carril 1 se muestra el plásmido sin digerir el cual está íntegro, y en los carriles del 2 al 4 se muestran 3 diferentes muestras de

extracción de dicho vector digerido con la enzima en cuestión; al menos en dos muestras se corroboró la presencia del fragmento esperado por el corte de 1500 pb (Fig. 31), lo cual indica que el plásmido es correcto y es posible utilizarlo para posteriores experimentos.

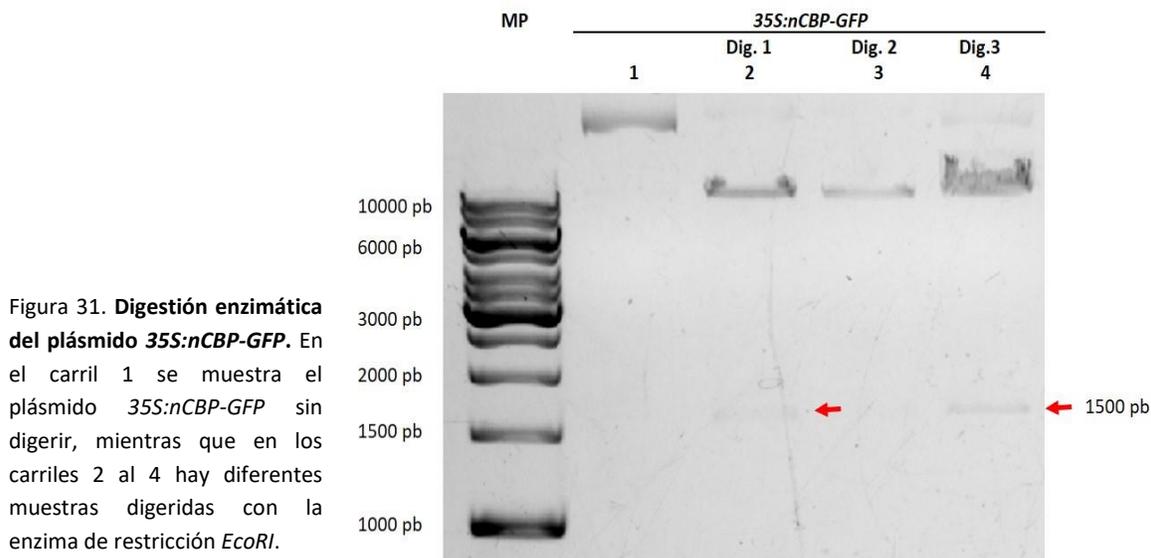


Figura 31. Digestión enzimática del plásmido *35S:nCBP-GFP*. En el carril 1 se muestra el plásmido *35S:nCBP-GFP* sin digerir, mientras que en los carriles 2 al 4 hay diferentes muestras digeridas con la enzima de restricción *EcoRI*.

Posterior a la comprobación de la construcción con GFP, se transformó por biobalística a los callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* WT y *ncbp-1* a una distancia de 9 cm. En ambos casos se obtuvieron explantes transformantes con el vector de interés, y mediante las observaciones a partir de microscopía confocal se detectó la presencia de la proteína de fusión nCBP-GFP con una expresión localizada en citoplasma en los callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* (Fig. 32 y 33).

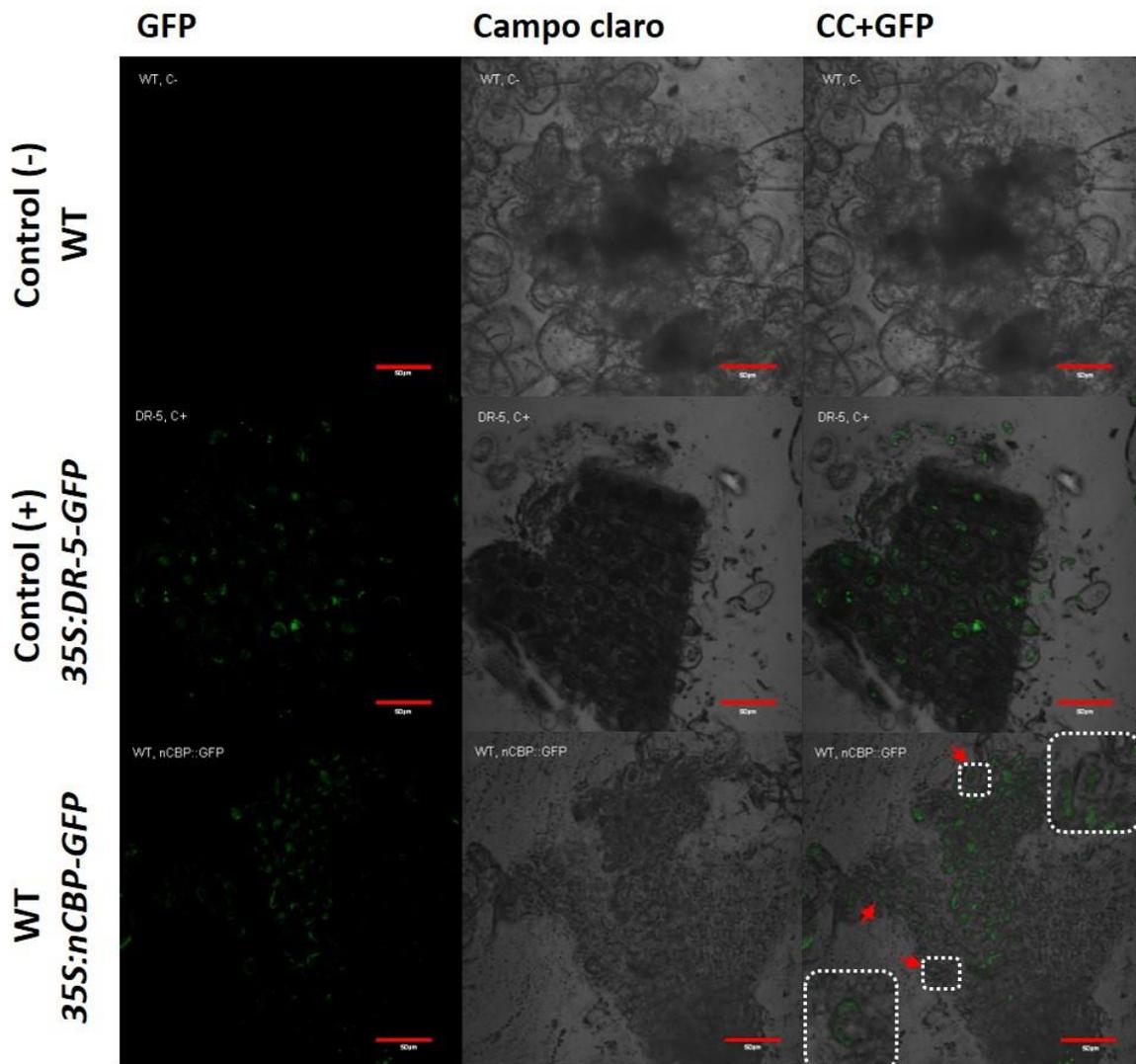


Figura 32. Localización de la proteína nCBP fusionada a GFP en callos de *Arabidopsis* Col-0 WT. Se observan los callos de *A. thaliana* Col-0 WT transformados. Los callos del control negativo con agua no presentan fluorescencia. 35S:DR-5-GFP se utilizó como control positivo para identificación del fluoróforo GFP. En los callos transformados con el vector 35S:nCBP-GFP se encuentra expresada la proteína fusionada de forma localizada en el citoplasma. Las flechas rojas indican células con expresión de la fusión de proteínas nCBP-GFP. Escala= 50 μ m

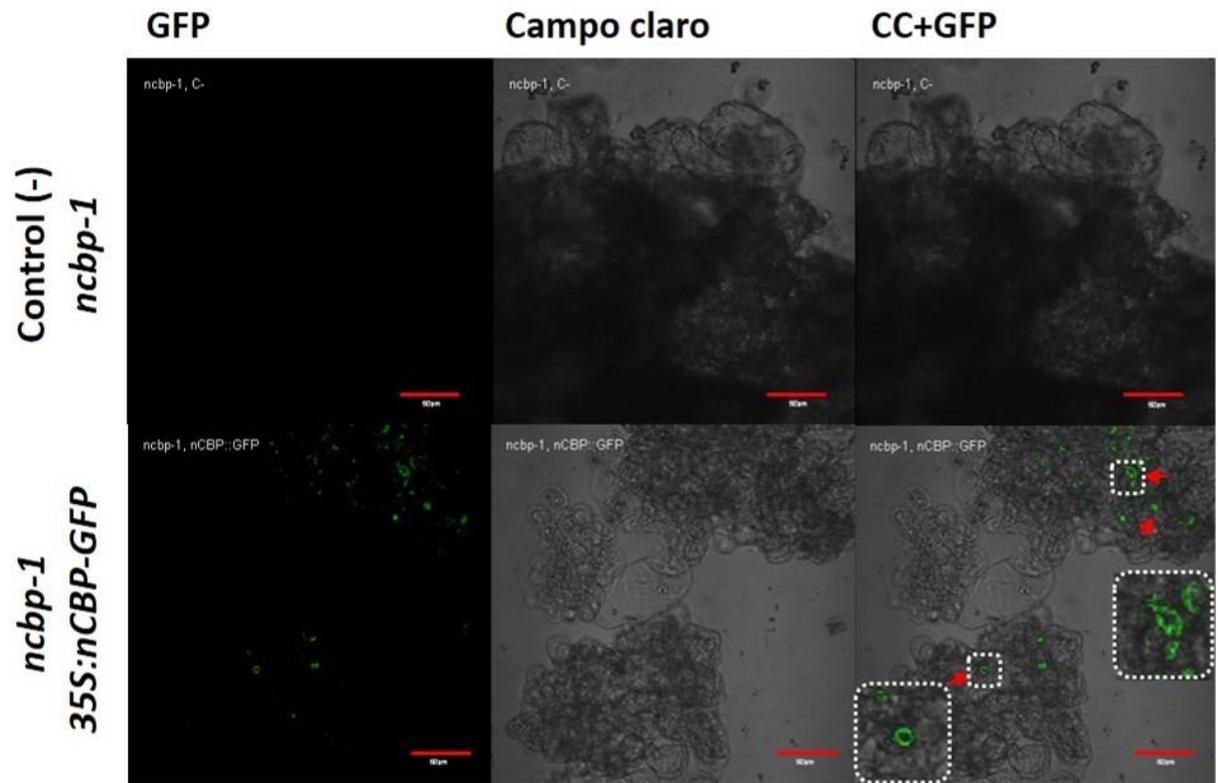


Figura 33. Localización de la proteína nCBP fusionada a GFP en callos de *Arabidopsis ncbp-1*. Se observan los callos *ncbp-1* del control negativo con agua y no presentan fluorescencia. Los callos transformados con el vector 35S:nCBP-GFP presentan una expresión de la proteína localizada en el citoplasma. Las flechas rojas indican células con expresión de la fusión de proteínas nCBP-GFP. Escala= 50 μ m

8 Discusión

Poco se sabe acerca de la función que nCBP lleva a cabo en las plantas. No obstante, existen algunos indicios sobre la presencia de la proteína en estadios del desarrollo específicos en los que puede estar involucrada, por ejemplo, durante la embriogénesis temprana. Además, la expresión de nCBP en las plantas es ubicua y diferencial de forma temporo-espacial. Se ha propuesto que nCBP tiene una importante participación durante la reproducción de las plantas, dejando a la fase vegetativa sin un fenotipo aparente en condiciones regulares de crecimiento cuando la proteína está ausente. Sin embargo, las silicuas mutantes *ncbp-1* tienen un 13% de aborción de las semillas, hecho que se ha ligado con la vía autónoma de la floración mediante otros ensayos realizados sobre las mismas. Además, se reportan efectos letalidad embriogénica similares a las de *ncbp-1* en mutantes de *Arabidopsis* con depleción de FPA y FY (de la Torre, 2009; Hidalgo, 2007). Se ha demostrado que proteínas ortólogas de nCBP en *C. elegans* (Dinkova *et al.*, 2005), en *D. melanogaster* (Cho *et al.*, 2005) o *M. musculus* (Joshi *et al.* 2004) también participan durante el estadio reproductivo de los organismos provocando defectos durante la embriogénesis sin afectar su viabilidad. En el caso de *A. thaliana* se observó que tampoco afecta el tiempo de germinación de las semillas, ya que como se evidenció en este trabajo, las semillas WT y las mutantes *ncbp-1* muestran una alta tasa de germinación para semillas de 3 años de haber sido cosechadas, sin diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, en la evaluación de los cultivos en suspensión se encontró una viabilidad celular por encima del 90%, lo cual muestra otra evidencia en relación a la viabilidad a nivel celular en los cultivos evaluados.

8.1 Implicaciones de nCBP en la inducción de callos pro-embriogénicos

nCBP se expresa mucho más que otros miembros de la familia eIF4E en cultivos celulares de *Arabidopsis* durante los primeros 4 días post-subcultivo donde existen condiciones de crecimiento y proliferación celular activos. Esa observación permitió plantear el uso de callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* como modelo de estudio para la exploración de la expresión de nCBP, aunado a la propuesta de la posible participación de la proteína durante la embriogénesis somática (Bush *et al.*, 2009).

Los resultados del presente trabajo revelaron que la proteína nCBP no parece tener un papel relevante en el establecimiento *in vitro* de las plántulas de *A. thaliana*, pero sí participa en la formación del callo pro-embriogénico a partir de las plántulas, ya que en ausencia de la proteína

nCBP la formación del callo inicia en el meristemo apical de la plántula e inicios de proliferación celular en el hipocótilo y radícula a comparación de las plántulas WT que formaron callos en el hipocótilo, zona radicular y parte distal de los cotiledones (Fig. 13D y Fig 14D). Se ha reportado que la formación del callo en *Arabidopsis* se da como consecuencia de la respuesta de la pluripotencialidad localizada en las células del periciclo de las plantas (Parizot *et al.*, 2008). En muchas espermatofitas, las células del periciclo de la raíz se encuentran en contacto con los polos del xilema y muestran características meristemáticas por su potencial constitutivo para dividirse, por sus características morfológicas (como la presencia de un núcleo grande, pequeñas vacuolas y citoplasma denso), así como su capacidad de formar brotes debido a la cercanía a sitios blanco como los meristemos laterales de raíz inducidos por auxinas que se forman a través de divisiones celulares periclinales y anticlinales (Beeckman *et al.*, 2001; Dubrovski *et al.*, 2000; Parizot *et al.*, 2008; de Smet *et al.*, 2006). El proceso de la formación del callo tiene características similares a la punta de un meristemo radicular, incluso si este es derivado de órganos aéreos tales como los pétalos o cotiledones. La formación del callo de múltiples órganos es un proceso de diferenciación de las células del periciclo presentes en el órgano hacia un tejido similar al meristemo radicular, independientemente del tejido de origen y de la variación de las concentraciones hormonales en el medio de cultivo (Sugimoto *et al.*, 2010), proceso que concuerda con la respuesta de formación y proliferación de callos pro-embriogénicos a partir de diversos tipos de tejidos de las plántulas inducidas (Fig. 13 y 14).

Puesto que tanto la mutante *ncbp-1* como las plántulas WT mostraron capacidad para la formación de callos pro-embriogénicos, por lo que se sugiere que la proteína nCBP favorece la expresión espacio-temporal para dar lugar a la activación de algún mecanismo implicado, ya que se ha visto que hay una expresión diferencial en los tejidos de la planta de *A. thaliana* (Hidalgo, 2007). Aunque los mecanismos de funcionamiento de nCBP no han sido dilucidados, se ha sugerido que los efectos indirectos de la proteína podrían llevarse a cabo mediante la selección traduccional de genes específicos o la represión de la maquinaria traduccional (Martínez-Silva *et al.*, 2009) que desembocan, en este caso, en una sincronización determinada de los tejidos para dar lugar a la respuesta pluripotencial del periciclo en las diferentes estructuras de las plántulas. Dicha sincronización en la respuesta de formación de callos podría ser llevada por la maquinaria involucrada en la proliferación celular, dado que se reporta que las células del periciclo son capaces de retener la expresión de genes del ciclo celular tales como *CDC2a* y *CYCA2*, propiedades que probablemente son responsables de la capacidad de las células del periciclo para reactivar

rápidamente el ciclo celular sin experimentar una verdadera dediferenciación (BursSENS *et al.*, 2000; Atta *et al.*, 2009).

8.2 Diferencias en la velocidad de proliferación celular causadas por nCBP

Se determinó utilizar el medio de cultivo B5 con la adición de PVP y MES para la inducción y proliferación de callos, ya que en dicha condición se observa una tendencia de mayor proliferación de los callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* WT y *ncbp-1* comparada con el medio MS, aunque las diferencias no mostraron ser significativas.

Existen diferencias significativas en la cinética de crecimiento de los callos pro-embriogénicos WT y los mutantes *ncbp-1*, más evidentes del día 5 hasta el 26. En el día 26 se observó una diferencia promedio de 1.2 g en peso fresco en los callos WT por encima de los que carecen de la proteína nCBP. Los resultados obtenidos a partir de peso fresco no necesariamente indicaron un aumento en la proliferación celular, más bien, sugieren la internalización de agua circundante en el medio de cultivo hacia las células de los callos de *A. thaliana*, por lo que posiblemente estén involucrados mecanismos de osmorregulación diferentes en las células del callo *ncbp-1* respecto a las WT. Hay evidencia que apoya a que nCBP esté implicada en contender contra el estrés osmótico, pues se han mostrado diferencias fenotípicas en el crecimiento de la raíz primaria con manitol a 200 mM (León, 2016), ya que como se mostró en la cinética de crecimiento, la ausencia de nCBP en callos pro-embriogénicos provocó una disminución de peso fresco respecto a los callos silvestres. Por otra parte, se presentaron condiciones de hiperhidratación en los callos de *Arabidopsis*; por lo que resulta indispensable para las células contender contra esta condición para posteriormente dar lugar a otras respuestas morfogenéticas, ya que las plantas pueden mostrar anomalías morfológicas, anatómicas, fisiológicas y metabólicas (Ziv 1991; Kharrazi *et al.* 2011). Para determinar si las diferencias de peso que fueron encontradas se tratan de proliferación, es necesario realizar evaluaciones del peso seco de los callos. Hipotéticamente, en caso de tratarse de diferencias en la masa de los callos entonces podrían estar involucrados diversos factores en relación con los ciclos de proliferación celular. Un grupo de proteínas aunado a este tipo de procesos son las ciclinas dependientes de kinasas (CDKs) quienes forman parte del control de la progresión del ciclo celular, que además se han visto involucradas en diferentes niveles con la maquinaria de inicio de la traducción en eucariontes, para el control de la traducción de transcritos (Pyronnet *et al.*, 2001). En animales se han encontrado asociaciones entre los factores

eIF4E con componentes del ciclo celular, como la traducción mediada por eIF4 que se reduce durante la mitosis en células de mamíferos; mientras que en células HeLa, se ha observado que la CDK1 es capaz de fosforilar 4E-BP en Thr-70 mientras se encuentra unida a eIF-4E, lo que produce la disociación del complejo durante el ciclo celular (Pyronnet *et al.*, 2001; Heesom *et al.*, 2001) En plantas, se demostró la existencia de un complejo eIF4A-CDKA presente en células de *Arabidopsis* que se están dividiendo y creciendo rápidamente, por lo que se ha sugerido que eIF4A puede ser parte de un complejo que tiene como blanco a CDKA para la maquinaria de traducción (Hutchins *et al.*, 2004). Es posible que nCBP regule transcritos correspondientes a genes de ciclo celular, aunque no se sabe si tal regulación sería a nivel de localización. Por otra parte, es posible que nCBP sea relevante para contender con el estrés que representa un crecimiento y división celular sostenidos en el estado de callo, puesto que la proteína se ha visto altamente expresada respecto a otros miembros de la misma familia en cultivos en suspensión de *Arabidopsis* (Bush *et al.*, 2009). Curiosamente, en medio líquido, la cinética de crecimiento celular en ausencia de nCBP no pareció afectarse. Incluso se observaron mayores incrementos en el peso fresco y seco para la mutante, aunque la diferencia no fue significativa. Esto sugiere que el entorno celular y la temporalidad de crecimiento analizados posiblemente influyan en la participación de nCBP durante el proceso de cultivo de tejidos *in vitro* de *A. thaliana*.

8.3 Expresión de nCBP en callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1*

Para tener un mejor entendimiento del papel de nCBP en los cultivos pro-embriogénicos generados, una aproximación sería evaluar sus cambios en la expresión y localización durante el proceso de subcultivo, regeneración de plántulas y en respuesta a estímulos de estrés. Es por ello que en este trabajo se utilizaron las construcciones de *ncbp:GUS* la cual nos puede revelar información acerca de la transcripción del gen *nCBP* en los callos, y *35S::nCBP::GFP* que provee información sobre la localización de la proteína fusionada en las células de callos de *A. thaliana* tanto en Col-0 WT como en *ncbp-1*, sin embargo, es importante considerar de que esta última construcción se encuentra bajo un promotor constitutivo.

Los callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* WT se transformaron con la construcción *ncbp:GUS*. El ensayo de GUS se mostró la presencia de zonas azules en los callos WT, marcas que evidencian la exitosa transformación y expresión mediada por el promotor *nCBP*. A nivel subcelular se observó la expresión de GUS bajo el promotor *nCBP* de forma difusa en el citoplasma y en el

núcleo, a diferencia de la localización en cúmulos citoplasmáticos de la proteína nCBP. Es posible que el promotor *nCBP* actúe en zonas específicas de los callos con una distribución homogénea en las células para dar lugar a diversas respuestas como la proliferación celular.

Por otra parte, uno de los aspectos clave para la exitosa transformación de callos de *Arabidopsis* es la condición fisiológica en la que se encuentre el explante, es decir, es necesario que los callos pasen por un proceso de deshidratación para incrementar su nivel de compactación mediante el aumento en la concentración del gelificante utilizado, ya que en condiciones regulares de proliferación este tiende a hiperhidratarse las primeras dos semanas después del subcultivo; dicha característica deshidratada de los callos es observable en otros trabajos donde se obtienen porcentajes de transformación exitosa de hasta el 82% en *A. thaliana* (Um *et al.*, 2007).

En seguida se evaluó la localización de la GFP a partir de la expresión de la construcción *35S:nCBP-GFP* en ambos callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* WT y *ncbp-1*. Se vio una expresión de nCBP ampliamente distribuida en citoplasma dentro de cúmulos. Algunos estudios relacionados con la familia de proteínas 4E muestran que eIF4E también presenta acumulación nuclear en células quiescentes (Bush *et al.*, 2009). Por otra parte, León (2018) sugiere que nCBP se expresa probablemente en el núcleo, debido a su distribución localizada en el centro de protoplastos de *A. thaliana* en condiciones de estrés por calor. Dado que en animales se ha visto al factor eIF4E canónico está presente en el núcleo (Culjkovic *et al.*, 2007; Iborra *et al.* 2001) donde desempeña una función de exporte de mensajeros hacia el citoplasma, la variante eIF4E2 está localizada principalmente en citoplasma, pero se relocaliza en el núcleo por una vía independiente al transportador 4E-T (proteína encargada del transporte de eIF4E desde citoplasma a núcleo) (Kubacka *et al.*, 2013). Interesantemente en protoplastos de *A. thaliana*, se ha observado que la proteína nCBP tiene una distribución citoplasmática diferencial de acuerdo al tipo de estrés al que son sometidos, lo que ha llevado a sugerir que dicha proteína puede desempeñar funciones específicas de acuerdo a los mecanismos de adaptación que requiera la célula (León, 2018). La localización de nCBP es contrastante con respecto a la de eIF4E, una proteína canónica, la cual tiene una expresión difusa en el citoplasma (de la Torre, 2009).

8.4 Función de nCBP en la formación temprana de la testa de las semillas de *A. thaliana*

La testa del 87.5% de las semillas *ncbp-1* de *Arabidopsis* presentaron diferencias en la ornamentación de la testa, donde las células mostraron rebordes con una ligera elevación deprimida en la parte central a diferencia de las testas de semillas Col-0 WT, las cuales presentan una ornamentación con protuberancias cónicas truncadas conocidas como columelas; en algunos casos se presentan ligeras elevaciones circulares de contorno delgado alrededor de las columelas, similares a las observadas con anterioridad por MEB en semillas de Col-0 (Fig. 34A-C) (López-García *et al.*, 2016; Penfield *et al.*, 2001).

La diferenciación de la testa de las semillas de *Arabidopsis* es un proceso que se origina a partir de diversas capas de tipos celulares especializados (Haughn & Chaudhury, 2005); unas de esas células son las de la epidermis de la cara externa del tegumento interno, que secretan al apoplasto una gran cantidad de mucílago, el cual a su vez está compuesto de pectinas, formando así una pared secundaria de celulosa en forma de volcán conocida como columela. En la maduración, todas las células de la testa de la semilla están muertas y se encuentran aplastadas actuando como una barrera mecánica y protectora (Haughn & Chaudhury, 2005; Dekkers *et al.*, 2013). Aunque la testa no proviene del proceso de fecundación, su desarrollo se da inmediatamente después, lo que implica un mecanismo de señalización de tejidos cigóticos hacia los tejidos maternos circundantes (Roszak & Köhler, 2011).

Para un apropiado desarrollo embrionario es necesaria una adecuada provisión de sacarosa y nutrientes por parte del endospermo, así como el desarrollo *per se* del embrión; por lo tanto, si alguno de estos eventos falla en algún punto, la testa de la semilla se ve afectada, por lo que el desarrollo embrionario no procede normalmente (Hehenberger *et al.*, 2012; Lafon & Köhler, 2014; Chen *et al.*, 2015). Algunos análisis genéticos sugieren que el endospermo produce una señal que inicia la diferenciación de los integumentos para producir la testa de la semilla (Roszak & Köhler, 2011; Berger *et al.*, 2006; Ingouff *et al.*, 2006; Figueiredo & Köhler, 2014). Sin embargo, pocos loci implicados en el desarrollo de la testa en *Arabidopsis* han sido dilucidados, entre ellos se encuentran *APETALA2 (AP2)*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* y *MERISTEM PROGRAM1 (AMP1)*, que regulan la elongación de las células de la testa, síntesis de proantocianidina, y biosíntesis de mucílago (Debeaujon *et al.*, 2000; Orozco-Arroyo *et al.*, 2015; López-García *et al.*, 2016), mientras que los genes *GLABRA2 (GL2)*, *MUCILAGE-MODIFIED4 (MUM4)* Y *MUCILAGE-MODIFIED4 (MUM2)* han sido relacionados especialmente en la producción y modificación de mucílago en la testa en la capa epidérmica; *BANYULS (BAN)*, *LDOC/TDS4*, *TRANSPARENT TESTA2*

(*TT2*) Y *TRANSPARENT TESTA3 (TT3)/DFR* están implicados en la producción de proantocianidina en la capa endotelial de manera específica (Dean *et al.*, 2011). Otros genes, como los transportadores de sacarosa *SWEET11*, *SWEET12* Y *SWEET15* tienen un papel en la especificación de la testa y el transporte de azúcar en *Arabidopsis* (López-Bucio *et al.*, 2014).

De manera interesante, el fenotipo de la ornamentación de la testa observado en las mutantes *ncbp-1* es similar al reportado en las mutantes *ttg1-1* en *Arabidopsis*, donde está ausente la columela. Gracias a los estudios en mutantes las *ttg1-1* (Fig. 34D y E) se ha sugerido que la actividad de TTG1 no es requerida en estadios tempranos de la especificación de la epidermis de la testa, sino para el mantenimiento de estado diferenciado de las células epidermales antes de la secreción del mucílago de las células destino (Fig. 34F). Al comprometer el correcto desarrollo de la columela de la testa, la extrusión del mucílago se ve afectada. Dado que el mucílago de la semilla es eficiente en la absorción de agua, debido al incremento y estabilización del potencial hídrico circundante en la semilla que genera. Esta estabilización del potencial hídrico promueve la germinación y establecimiento de la plántula eficientemente. Las semillas mutantes *ttg1-1* germinan y crecen regularmente bajo condiciones estándares del laboratorio, pero en condiciones con el potencial hídrico disminuido, el establecimiento en las plántulas y la tasa de germinación de las mutantes se reduce fuertemente comparada con las silvestres. Se le ha dado un papel adaptativo a la producción del mucílago en las semillas ante condiciones de baja o variable disponibilidad de agua (Penfield *et al.*, 2001), sugiriendo una función importante para nCBP durante la formación de la testa de las semillas en *A. thaliana*. Es probable que las semillas mutantes *ncbp-1* tengan una disminución en la tasa de germinación en condiciones de estrés hídrico debido a la malformación de la columela en la testa.

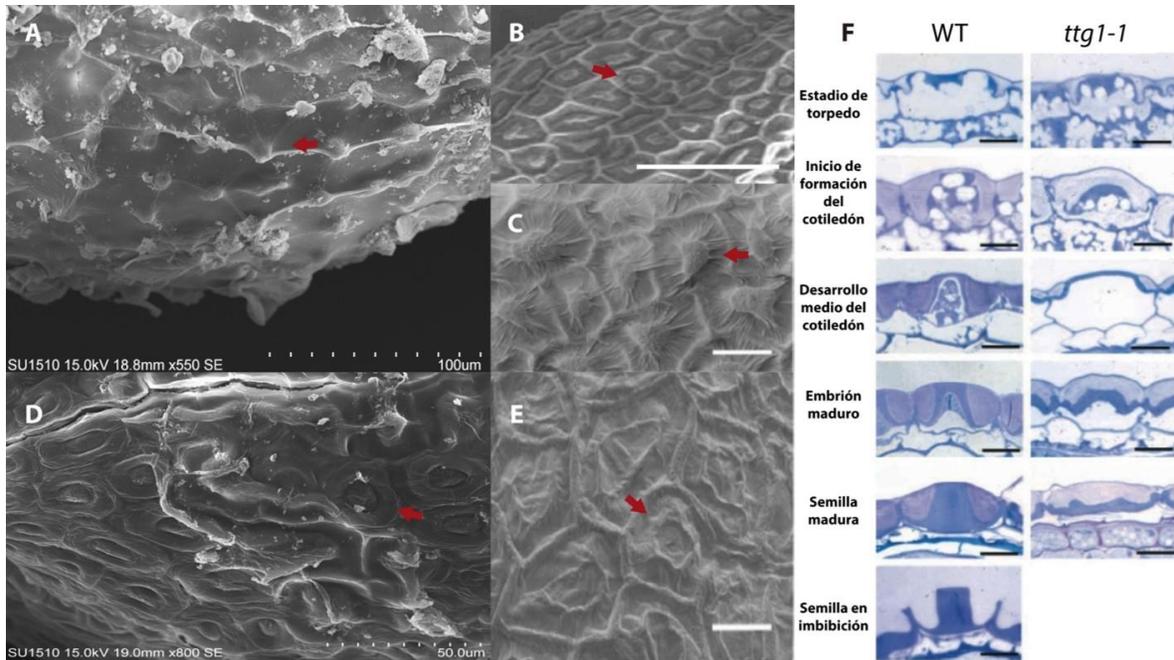


Figura 34. **Diferencias en las columelas de testas de *A. thaliana*.** A) Testa Col-0 WT la cual presenta columelas B) Fenotipo de la testa Col-0 WT, barra: 100 µm; tomado de López-García *et al.*,2016. C) Fenotipo de la testa Col-0 WT, barra: 20 µm; tomado de Penfield *et al.*,2001. D) Testa de la mutante *ncbp-1* carente de la columela E) Fenotipo de la testa *ttg1-1*, barra: 20 µm; tomado de Penfield *et al.*,2001. F) Comparación histológica de la formación de la columela en Col-0 WT y *ttg1-1* en diferentes estadios durante la formación de la semilla; tomado de Penfield *et al.*,2001.

El evidente fenotipo encontrado en las testas de las semillas mutantes *ncbp-1* nos ha llevado a pensar que la proteína nCBP tiene una importante participación en la etapa reproductiva en *A. thaliana*, como ya se ha sugerido con anterioridad su participación en la embriogénesis debido a la presencia de letalidad embriogénica, proceso donde algunos genes de la vía autónoma de floración se ven involucrados (de la Torre, 2009). Además, el ortólogo de nCBP, IFE-4 en *C. elegans* presenta cierto grado de letalidad embriogénica y defectos en la ovoposición (Dinkova *et al.*, 2005), efecto similar al observado en las mutantes de d4E-HP en *D. melanogaster* (Cho *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005) lo que podría indicar una función conservada para los miembros de clase II la familia eIF4E.

Se sugiere que la proteína nCBP no es indispensable para la formación de una testa funcional durante la germinación en condiciones estándares de laboratorio, ya que las semillas mutantes nulas *ncbp-1* de *Arabidopsis* no mostraron diferencias significativas con respecto a las WT como se discutió; sin embargo, la testa de las semillas *ncbp-1* muestra anomalías en el desarrollo de la columela, lo que desemboca de acuerdo a los estudios mencionados en cambios en la composición del mucílago, así como en su extrusión. Además, estudios en nuestro laboratorio han revelado que en las semillas existen mayores niveles de transcritos de nCBP, pero bajas

concentraciones relativas de la proteína (Hidalgo, 2007; de la Torre, 2009), lo que nos hace pensar que nCBP puede actuar en la traducción selectiva de genes relacionados tanto con el desarrollo embrionario como con la formación de la testa, llevando dicho proceso por una vía concreta para la correcta formación de una testa funcional. Por lo tanto, resulta primordial realizar pruebas de germinación sobre la mutante *ncbp-1* ante condiciones de estrés hídrico.

9 Conclusiones

- La ausencia de nCBP no afecta la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*, ni a las células en crecimiento en condiciones estándar de laboratorio.
- Se encontraron diferencias en los sitios iniciales de inducción de callos pro-embriogénicos en las plántulas mutantes de *A. thaliana ncbp-1* con respecto a las Col-0 WT; donde los callos *ncbp-1* presentan proliferación en el meristemo apical de la plántula y en baja proporción en el hipocótilo y radícula, mientras que en las plántulas silvestres la proliferación se presenta principalmente en el hipocótilo, zona radicular y parte distal de los cotiledones. Esto puede indicar diferencias espacio-temporales en el control del proceso de proliferación celular, así como su sincronización.
- La testa del 87.5% de las semillas de *ncbp-1* carecen de la formación adecuada de la columela.
- Existen diferencias significativas en el incremento de peso fresco de los callos pro-embriogénicos en medio semi-sólido, donde los callos de *ncbp-1* crecen lentamente respecto a los callos Col-0 WT, no así en suspensiones celulares (medio líquido). Es necesario determinar si el efecto observado se debe a la proliferación celular, al crecimiento celular, al estadio de hidratación, fisiología del callo y/o algún otro proceso.
- Se lograron obtener callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* WT con la construcción del vector *pncbp:GUS*, donde se expresó al gen reportero *GUS* de forma localizada en los callos, mientras que la localización subcelular de GUS se encontró difusa en el citoplasma y núcleo de forma diferencial entre los cúmulos de células transformadas.
- Se transformaron exitosamente los callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* WT y *ncbp-1* con la construcción *35S:nCBP-GFP*, los cuales mostraron una localización de la proteína de fusión en el citoplasma.

10 Perspectivas

- Explorar la función de nCBP en los fenotipos observados de inducción y proliferación de los callos *ncbp-1*. En el caso de los callos determinar si se trata de proliferación celular. En cuanto a la testa, explorar la expresión de genes candidatos relacionados con el fenotipo observado en la mutante.
- Probar las semillas de la mutante *ncbp-1* en condiciones de estrés hídrico para corroborar si existe una disminución en la tasa de germinación con respecto a las Col-0 WT y hacer pruebas de extrusión de mucílago.
- Corroborar la localización de nCBP en núcleo con la ayuda de un marcador adecuado sobre las líneas que expresan a la proteína de fusión nCBP-GFP en callos pro-embriogénicos de *A. thaliana* Col-0 WT y *ncbp-1*.
- Generar el vector *pncbp:ncbp-GUS* y transformar de manera eficiente los callos pro-embriogénicos *ncbp-1* y Col-0 WT para posteriormente seleccionar con el agente correspondiente y finalmente regenerar plantas a partir de embriogénesis somática. Los callos inducidos se pueden considerar un tejido adecuado para la regeneración, debido a que las células del periciclo de los cuales son formados dichos callos son capaces de retener la diploidía sobre varios ciclos de división celular, por lo tanto, mantienen la fidelidad clonal (Atta *et al.*, 2009).

11 Bibliografía

Atta R., Laurens L., Boucheron-Dubuisson E., Guivarc'h A., Carnero E., Giraudat-Pautot V., Rech P. and Chriqui D. (2009). Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant Journal*, 57: 626-644.

Beeckman, T., Burssens, S. and Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 52: 403–411.

Berger F., Grini P. E. & Schnittger A. (2006). Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Curr Opin Plant Biol* 9:664–670.

Browning K.S. (2004). Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions* 32:589-591.

Burssens, S., de Almeida Engler, J., Beeckman, T., Richard, C., Shaul, O., Ferreira, P., Van Montagu, M. and Inzé, D. (2000). Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2; 1* gene. *Planta*, 211: 623–631.

Bush M. S., Hutchins A. P., Jones A. M. E., Naldrett M. J., Jarmolowski A., Lloyd C. W., y Doonan J. H. (2009). Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*. *TPJ* 59: 400-412.

Chen L. Q., Lin W., Qu X.Q., Sosso D., McFarlane H. E., Londoño A., Samuels L. & Frommer W. (2015). A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* 27:607–619.

Cho P. F., Poulin F., Cho-Park Y. A., Cho-Park I. B., Chicoine J. D., Lasko P. and Sonenberg N. (2005). A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 121: 411-423.

Crick F. (1970). Central dogma of molecular Biology. *Nature* 224: 561-563.

Culjkovic B., Topisirovic I. and Borden K. (2007). Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle*, 6: 65-69.

de la Torre S. (2009). Papel de la proteína de unión a Cap, nCBP, en la floración de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. Pp. 72.

de Smet, I., Vanneste, S., Inzé, D. and Beeckman, T. (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol.* 60: 871–887.

Dean G., Cao Y., Xiang D., Provart N. J., Ramsay L., Ahad A., White R., Selvaraj G., Datta R. & Haughn G. (2011). Analysis of gene expression patterns during seed coat development in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 4 (6): 1074-1091.

Debeaujon I., León-Kloosterziel K. M., Koornneef M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122:403–414.

Dekkers B. J., Pearce S., van Bolderen-Veldkamp R. P., Marshall A., Widera P., Gilbert J., Drost H. G., Bassel G. W., Müller K., King J. R., Wood A. T. A., Grosse I., Quint M., Krasnogor N., Leubner-Metzger G., Holdsworth M. J. & Bentsink L. (2013). Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 163 (1): 205–215.

Dinkova D. T., Martínez C. L. and Cruz E. M. A. (2016). The diversification of eIF4E family members in plants and their role in the plant-virus interaction En: Hernández G. and Jagus R. 2016. Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation. Suiza, Springer. Pp. 187-205.

Dinokva T., Keiper B., Korneeva N., Aamodt E. and Rhoads R. (2005). Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol.*, 25: 100-113.

Dodeman V. L., Ducreux G. & Kreis M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493-1509.

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

Deutscher M.P. & Li Z. (2001). Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, 66: 67–105.

Encina C. L., Constantin M. & Botella J. (2001). An easy and reliable method for establishment and maintenance of leaf and root cell cultures of *Arabidopsis thaliana*. *ISPMB*, 119: 245-248.

Figueiredo D. D., Köhler C. (2014). Signalling events regulating seed coat development. *Biochem Soc Trans* 42: 358–363.

Fischer P.M. (2009). Cap in hand: targeting eIF4E. *Cell Cycle* 8:2535-2541.

Flores A. A. (2013). Análisis de complejos ribonucleoprotéicos formados por la proteína de unión a Cap, nCBP de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. Pp. 90.

Friml J. Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwars H., Hamann T., Offringa R. & Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147-153.

George E. F., Hall M. A. & De Klerk G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* 3rd edition. Volume 1. The background. Springer. Pp 501.

Goldberg R. B., de Paiva G. & Yadegari R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614.

Groppo R. and Richter J. D. (2009). Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol* 21: 444-451.

Gutiérrez-Escolano A. L. (2006). Inicio de la traducción dependiente de IRES: un mecanismo alternativo para la síntesis de proteínas. *REB*, 25 (1): 12-19.

Haughn, G.W., and Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 10, 472–477.

Heesom K. J., Gampel A., Mellor,ç H. and Denton, R. M. (2001). Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr. Biol.* 11: 1374-1379.

Hehenberger E., Kradolfer D. & Köhler C. (2012). Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development* 139:2031–2039.

Hernandez G., Altmann M., Sierra J.M., Urlaub H., Diez C. R., Schwartz P. and Rivera P. R. (2005). Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* 122:529-543.

Hernández G., Osnaya V. G., García A. and Velasco M. X. (2016). On the origin and early evolution of translation in Eucaryotes En: Hernández G. and Jagus R. 2016. Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation. Suiza, Springer. Pp. 81-107.

Hernández G. & Vazquez-Pianzola P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev.*, 122 (7-8): 865–76.

Hidalgo A. (2007). Obtención y caracterización de mutantes homocigotas de un miembro de la familia de eIF4E: nCBP (novel Cap-Binding Protein) en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. Pp 103.

Hutchins A. P., Roberts G. R., Lloyd C. W. and Doonan J. H. (2004). In vivo interaction between CDKA and eIF4A: a posible mechanism linking translation and cell proliferation. *FEBS Letters*, 556: 91-94.

Iborra F., Jackson D. and Cook P. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*, 293: 1139-1142.

Ingouff M., Jullien P. E. & Berger F. (2006). The female gametophyte and the endosperm control cell proliferation and differentiation of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3491–3501.

Joshi B., Cameron A. and Jagus R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J. Biochem*, 271: 2189-2203.

Joshi B., Lee K., Maeder D. L. y Jagus R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* 5:48.

Karp G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, 6ª edición. Mc Graw Hill. México. Pp.765.

Kaye N.M., Emmett K.J., Merrick W.C. and Jankowsky E. (2009). Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J Biol Chem.*, 284:17742-17750.

Keiper B. D., Lamphear B. J., Deshpande A. M., Jankowska-Anyszka M., Aamodt E. J., Blumenthal & Rhoads R. E. (2000). Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.*, 275: 10590-10596.

Kharrazi M., Nemati H., Tehranifar A., Bagheri A., Sharifi A. (2011). In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *J Biol Environ Sci.*, 5: 1–6.

Kropiwnicka A., Kutcha K., Lukaszewicz M., Kowalska J., Jemielity J., Ginalski K., Darzynkiewicz E. and Zuberek J. (2015). Five eIF4E Isoforms from *Arabidopsis thaliana* are characterized by distinct features of cap analogs binding. *BBRC*, 456: 47-52.

Kubacka D., Kamenska A., Broomhead H., Minshall N., Darzynkiewicz E. and Standart N. (2013). Investigating the Consequences of eIF4E2 (4EHP) Interaction with 4E-Transporter on Its Cellular Distribution in HeLa Cells. *Plos One*, 8: 1-14.

Lafon C. & Köhler C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Curr Opin Plant Biol* 17:64–69.

León D. A. (2016). Caracterización molecular y fenotípica de plantas de *Arabidopsis thaliana*, mutantes de la proteína nCBP, en condiciones de estrés. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. Pp. 78.

León D. A. (2018). Análisis de la expresión y localización de la proteína nCBP en respuesta a estrés. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. Pp. 101.

Li L. & Wang C. C. (2005). Identification in the ancient protist *Giardia lamblia* of two eukaryotic translation initiation factor 4E homologues with distinctive functions. *Eukaryot Cell*, 4 (5): 948–59.

López-Bucio J. S., Dubrovsky J. G., Raya-González J., Ugartechea-Chirino Y., López-Bucio J., de Luna-Valdez L. A., Ramos-Vega M., León P., Guevara-García A. A. (2014). *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot.*, 65:169–183.

López-García C. M., Raya-González J., López-Bucio J. S., Guevara-García A. A. & López-Bucio J. (2016). *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* Plays a role in seed coat development, root growth, and post-embryonic epidermal cell elongation in *Arabidopsis*. *J Plant Growth regul.*, 35: 1141-1158.

Martínez S. A. V., Aguirre M. C., Flores T. C. E., Alejandri R. N. D. y Dinkova D. T. (2012). Translation initiation factor AtelF(iso)4E is involved in selective mRNA translation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plos One* 7(2): e31606.

Martínez-Silva A. V. y Dinkova D. T. (2010). Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: Las dos caras de la moneda. *REB*, 29 (3): 82-91.

Mayberry L. K., Allen M. L., Dennis M. D. y Browning K. S. (2009). Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. *Plant Physiol* 150:1844-1854.

Meinke D. W., Cherry J. M., Caroline D., Rounsley S. D. y Koorneef M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282 (5389): 662-682.

Monzingo A. F., Dhaliwal S., Dutt-Chaudhuri A., Lyon A., Sadow J. H., Hoffman D. W., Robertus J. D. and Browning K. S. (2007). The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant Physiol* 143: 1504-1518.

Nakamura Y. & Tabata S. (2000). Large-scale sequence analyses in the *Arabidopsis thaliana* genome sequencing project: status 2000. *Genome informatics*, 11: 348-349.

Niedzwiecka A., Marcotrigiano J., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Wyslouch-Cieszynska A., Dadlez M., Gingras A. C., Mak P., Darzynkiewicz E. y Sonenberg N. (2002). Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* 319:615-635.

Orozco-Arroyo G., Paolo D., Ezquer I., Colombo L. (2015). Networks controlling seed size in *Arabidopsis*. *Plant Reprod* 28:17–32.

Pain V. M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236:747-771.

Parizot, B., Laplaze, L., Ricaud, Boucheron-Dubuisson E., Bayle V., Bonke M., de Smet I., Poething S. R., Helariutta Y., Haseloff J., Chriqui D., Beeckman T. and Nussaume L. (2008). Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiol*. 146: 140–148.

Patrick R. M. & Browning K. S. (2012). The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: an evolutionary perspective. *Comp Funct Genomics*. 2012: 1-12.

Penfield, S., Meissner, R. C., Shoue, D. A., Carpita, N. C. and Bevan, M. W. (2001). MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* 13, 2777–2791.

Pestova T. V., Lorsch J. R. & Hellen C. U. (2007). En Translational control in biology and medicine. Editor: Mathews M. B., Sonenberg N. & Hershey J. W. B., C. S. H. L. Press, Cold Spring Harbor, NY, 87-128 pp.

Ptushkina M., Malys N. y McCarthy J. E. (2004). Translation of a small subset of *Caenorhadditis elegans* mRNAs is dependet on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol. Cell Biol.* 25: 100-113.

Pyronnet S. and Sonenberg, N. (2001). Cell-cycle-dependent translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 13-18.

Pyronnet S., Dostie J. and Sonenberg, N. (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev.* 15: 2083-2093.

Rhoads R. E. (2009). eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J. Biol. Chem.* 284: 16711-16715.

Robalino J., Joshi B., Fahrenkrug S. C. and Jagus R. (2004). Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and func tionally divergent. *J Biol Chem* 279:10532-10541.

Rodríguez C. M., Freire M. A., Camilleri C., Robaglia C. (1998). The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are diferentially expressed during plant development. *Plant J.* 13: 465-473.

Robaglia C. & Caranta C. (2006). Translation initiation factors: a weak link un plant RNA virus infection.

Roszak P. & Köhler C. (2011). Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20826–20832.

Ruud K. A., Kuhlow C., Goss D. J. and Browning K. S. (1998). Identification and characterization of a Novel Cap-binding protein form *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 273 (24): 10325-10330.

Saran B. S. & Kumar D. P. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer. India. Pp. 318

Sowers, F. Christopher & Susan J., PhD Karcher. (2015). "*Arabidopsis thaliana*." *Salem Press Encyclopedia Of HealthResearch Starters*, EBSCO host (29/11/2015).

Sugimoto K., Jiao Y. and Meyerowitz E. M. (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell*, 18: 463-471.

Taiz L. & Zeiger E. (2006). *Fisiología vegetal* Erd ed. Volume II. Universitat Jaume I. U. S. A. Pp. 1338
Williams E. G. & Maheswaran G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinates behavior of cells as an embryogenic group. *Ann Bot.* 57: 443-462

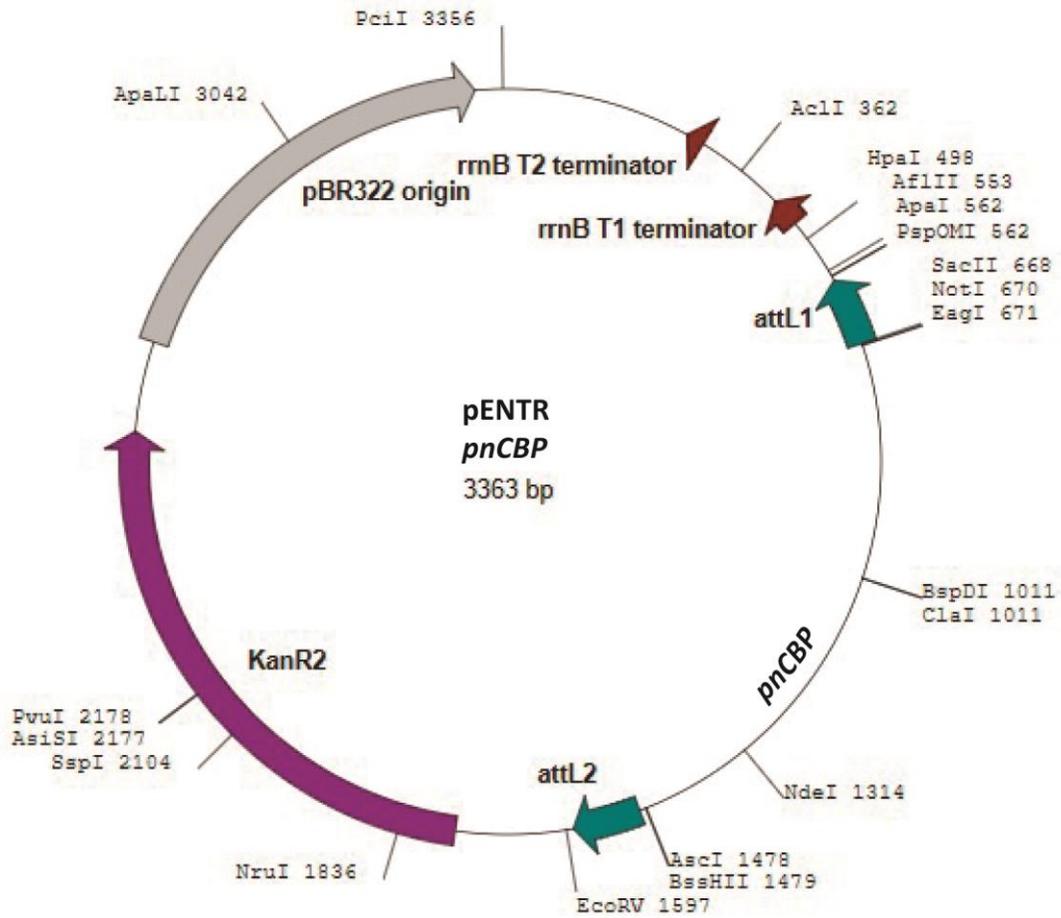
Um, M. O., Park, T. I., Kim, Y. J., Seo, H. Y., Kim, J. G., Kwon, Kwak S. S., Yun D. J. & Yun, S. J. (2007). Particle bombardment-mediated transformation of barley with an *Arabidopsis* NDPK2 cDNA. *Plant Biotechnology Reports*, 1(2), 71-77.

Ziv M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh PG, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation: technology and application*. Kluwer Academic Publications, Dordrecht.

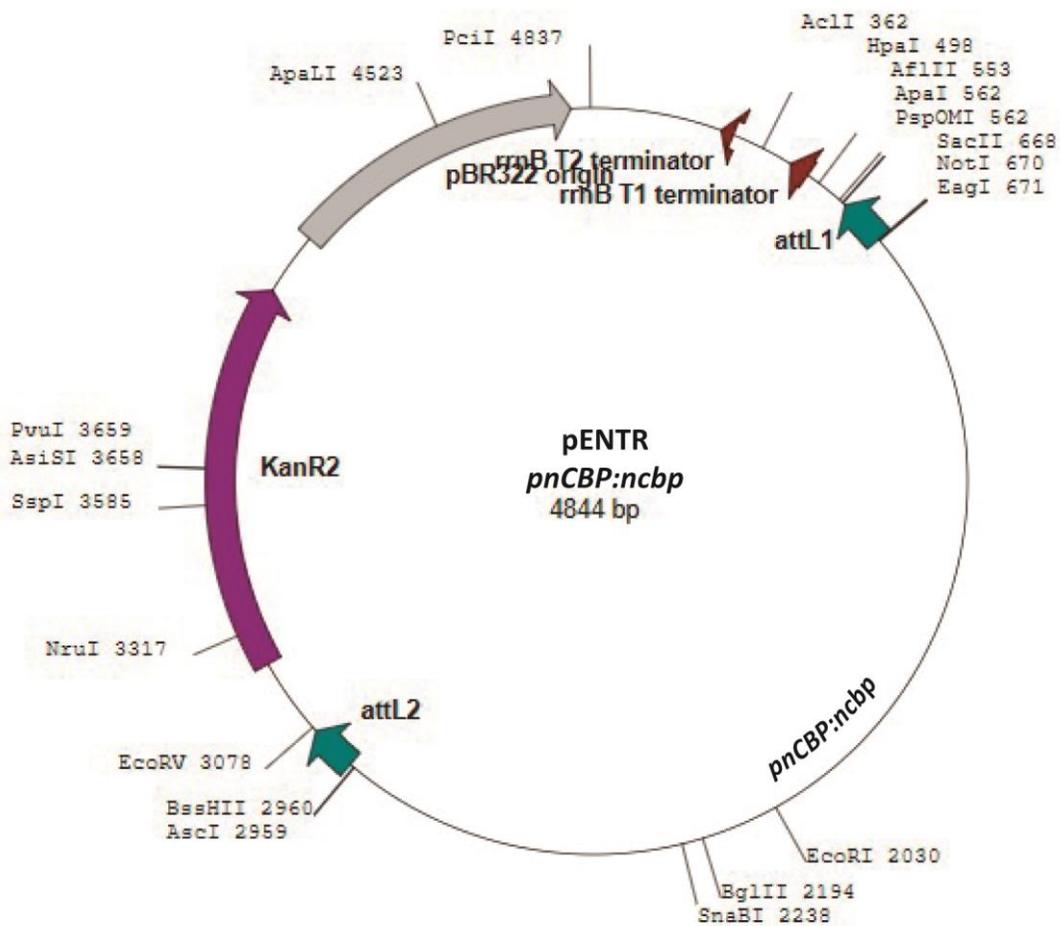
12 Anexos

12.1 Anexo 1. Mapas de los vectores empleados

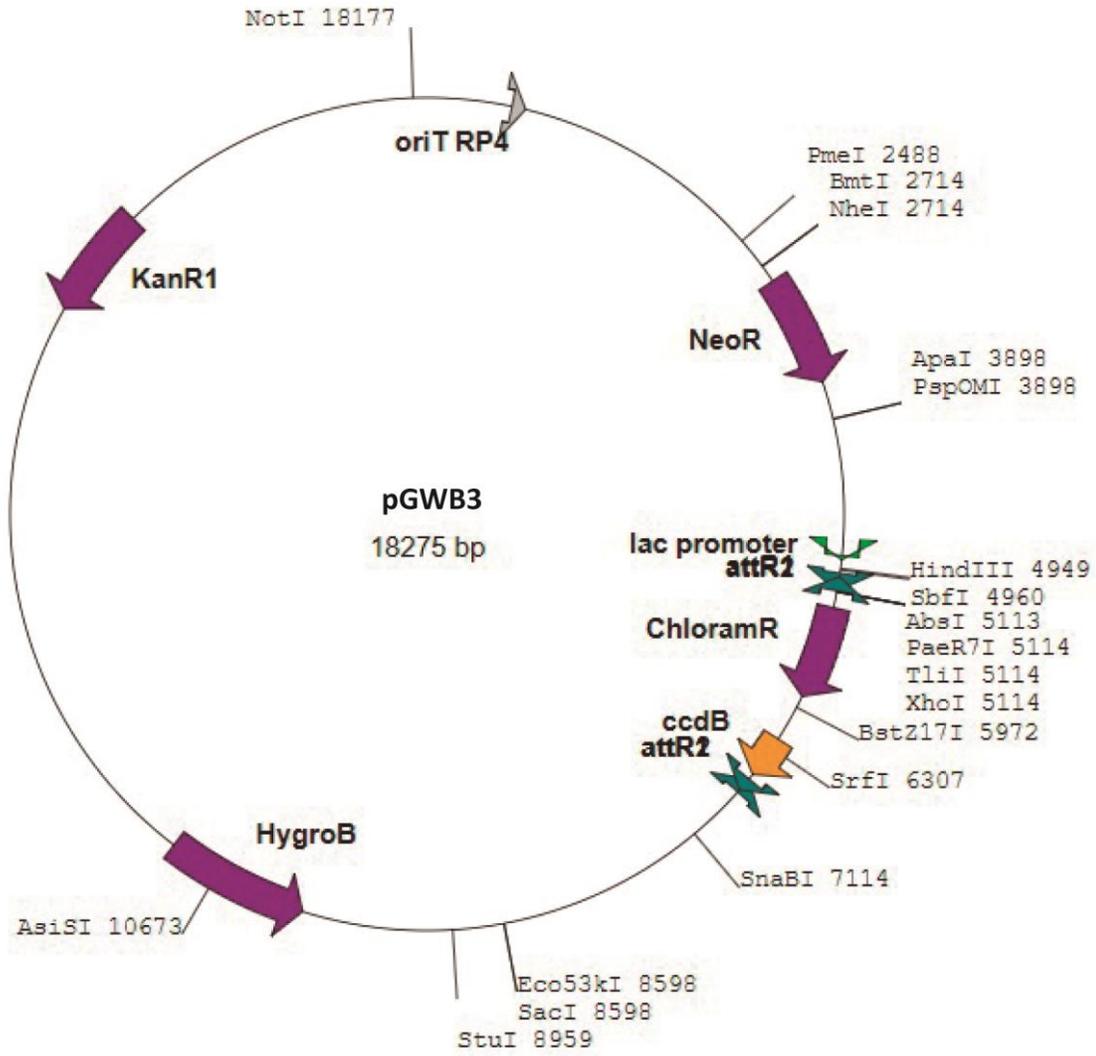
Vector pENTR/D/TOPO con secuencia del *pnCBP*



Vector pENTR/D/TOPO con secuencia del *pnCPB:ncbp*



Vector PGWB3



12.2 Anexo 2. Secuenciación de construcciones generadas; *pncbp*:GUS y *pncbp*:ncbp-GUS

Secuenciación de *pncbp*:GUS

```

1
PRoncBP::GUS  CAAATAATGA TTTTATTTTG ACTGATAGTG ACCTGTTGGT TGCACAAAT TGAATGCAA TGCTTTTAA
PROG1
PROG3
-----

71
PRoncBP::GUS  TAATGCCAAC TTTGTACAAA AAGCAAGGCT CCGCGGCCG CCCCCTCACC TAAATCTACG GCGAAACAGA
PROG1
PROG3
-----

141
PRoncBP::GUS  AAAATAACAG TAAAGTTTCG CAAATTCGCT AAGAGAAATC CCAGAAACTT TTACAATTT ACAAATCAA
PROG1
PROG3  -AAATTCGCT AAGAGAAATC CCAGAAACTT TTACAATTT ACAAATCAA
-----

211
PRoncBP::GUS  AACCAAGAGA TTAGATAAAA GTTAAAGGTG AATTCGAATA ACAAAAAACG GAAATCAAA CAAAGGGAAA
PROG1
PROG3  AACCAAGAGA TTAGATAAAA GTTAAAGGTG AATTCGAATA ACAAAAAACG GAAATCAAA CAAAGGGAAA
-----

281
PRoncBP::GUS  CGTAAGATTG AGCACGGAG AGCTTAAAGT ACACAACCTT AAGAGAAAAA CTACACGAAA CAATCACAAA
PROG1
PROG3  CGTAAGATTG AGCACGGAG AGCTTAAAGT ACACAACCTT AAGAGAAAAA CTACACGAAA CAATCACAAA
-----

351
PRoncBP::GUS  TATAGATTTG GAGAAATCT CAGATCCATG AAAAAGTTT TATTGTCAGT TGTTTTGA GAAACATTAC
PROG1
PROG3  TATAGATTTG GAGAAATCT CAGATCCATG AAAAAGTTT TATTGTCAGT TGTTTTGA GAAACATTAC
-----

421
PRoncBP::GUS  ATTACAGATG GAGAACGCCA AAAATCGAT CTTTTTTTA ATTTCTTTT TTGACAAATC GCATTCGTCA
PROG1
PROG3  ATTACAGATG GAGAACGCCA AAAATCGAT CTTTTTTTA ATTTCTTTT TTGACAAATC GCATTCGTCA
-----

491
PRoncBP::GUS  CACATTCCTT TTTTTTTAA TTTCTCCAC TACACCCTA ACTTGCCGT GATAGGTGA TGTGATGTG
PROG1
PROG3  CACATTCCTT TTTTTTTAA TTTCTCCAC TACACCCTA ACTTGCCGT GATAGGTGA TGTGATGTG
-----

561
PRoncBP::GUS  TTTAAGCAT ATCTCTTTG TTCGGTGG ATTAGTTAT GTAATAACCA ACAACTATC TTAATACATT
PROG1
PROG3  TTTAAGCAT ATCTCTTTG TTCGGTGG ATTAGTTAT GTAATAACCA ACAACTATC TTAATACATT
-----

631
PRoncBP::GUS  TTGTCCTT TTGAATTTG TGTTCCTAT TTTGTTACT GTAAAAAGA ATGAAATCA TTGAGTATT
PROG1
PROG3  TTGTCCTT TTGAATTTG TGTTCCTAT TTTGTTACT GTAAAAAGA ATGAAATCA TTGAGTATT
-----

701
PRoncBP::GUS  AAAACTAACT AATCACTAAG GCCCATTTAG TAGACCCAA AAGGCCATA TGTATTTTT TTTCTCCAGA
PROG1
PROG3  AAAACTAACT AATCACTAAG GCCCATTTAG TAGACCCAA AAGGCCATA TGTATTTTT TTTCTCCAGA
-----

771
PRoncBP::GUS  ATTTGACCTT TATGTATTTG ACCGAGTGG AAGTAATAC AGTTCCTTC TTCTCTCTC CTCTTCTTC
PROG1
PROG3  ATTTGACCTT TATGTATTTG ACCGAGTGG AAGTAATAC AGTTCCTTC TTCTCTCTC CTCTTCTTC
-----

841
PRoncBP::GUS  TTCCTGRTTG GAATTTTAGG GPTTTGAAA GCACGAACG GTGAAGCTCT AATCGAGAAA AAAAAAGGTTG
PROG1
PROG3  TTCCTGRTTG GAATTTTAGG GPTTTGAAA GCACGAACG GTGAAGCTCT AATCGAGAAA AAAAAAGGTTG
-----

911
PRoncBP::GUS  GGGGGCCGA CCCAGTTTC TTGTACAAAG TTGGCATTAT AAGAAAGCAT TGCTTATCAA TTTGTTGCAA
PROG1
PROG3  AGGGTGG----- -TGGAAPTTT AGGGCTTTG AAGCAAGAA -GGTG----- AAGTT
-----

981
PRoncBP::GUS  CGAACAGGTC ACTATCAGTC AAAATAAAAT CATTATTTT CAGCTTCTT GTACAAGTG GTTCGATCTA
PROG1
PROG3  CGAACAGGTC ACTATCAGTC AAAATAAAAT CATTATTTT CAGCTTCTT GTACAAGTG GTTCGATCTA
-----

1051
PRoncBP::GUS  CTAATCGAGA AAAAAAGATC CAAAGGTGG CGGCCGACC CAGCTTCTT GTACAAGTG GTTCGATCTA
PROG1
PROG3  CTAATCGAGA AAAAAAGATC CAAAGGTGG CGGCCGACC CAGCTTCTT GTACAAGTG GTTCGATCTA
-----

```

1051
PRONcBP: :GUS GAGGATCCCG GGGTGGTCAG TCCCTTATGT TAGGTCCCTGT AGAAACCCCA ACCCGTGAAA TCAAAAAACT
PROG1 GAGGATCCCG GGGTGGTCAG TCCCTTATGT TAGGTCCCTGT AGAAACCCCA ACCCGTGAAA TCAAAAAACT
PROG3 GAGGATCCCG GGGTGGTCAG TCCCTTATGT TAGGTCCCTGT AGAAACCCCA ACCCGTGAAA TCAAAAAACT

1121
PRONcBP: :GUS CGACGGCCCTG TGGGCATTCA GTCTGGATCG CGAAAACTGT GGAATTGATC AGCGTTGGTG GGAAAGCGCG
PROG1 CGACGGCCCTG TGGGCATTCA GTCTGGATCG CGAAAACTGT GGAATTGATC AGCGTTGGTG GGAAAGCGCG
PROG3 CGACGGCCCTG TGGGCATTCA GTCTGGATCG CGAAAACTGT GGAATTGATC AGCGTTGGTG GGAAAGCGCG

1191
PRONcBP: :GUS TTACAAAGAAA GCCGGCAAT TGCCTGATGCA GGCAAGTTTA ACCATCAGTT CGCCGATGCA GATATTCTGA
PROG1 TTACAAAGAAA GCCGGCAAT TGCCTGATGCA GGCAAGTTTA ACCATCAGTT CGCCGATGCA GATATTCTGA
PROG3 TTACAAAGAAA GCCGGCAAT TGCCTGATGCA GGCAAGTTTA ACCATCAGTT CGCCGATGCA GATATTCTGA

1261
PRONcBP: :GUS ATTATGCGGG CAACGTCCTGG TATCAGGCGG AAGTCTTTAT ACCGAAAAGGT TGGGCAAGCC AGCGTATCTG
PROG1 ATTATGCGGG CAACGTCCTGG TATCAGGCGG AAGTCTTTAT ACCGAAAAGGT TGGGCAAGCC AGCGTATCTG
PROG3 ATTATGCGGG CAACGTCCTGG TATCAGGCGG AAGTCTTTAT ACCGAAAAGGT TGGGCAAGCC AGCGTATCTG

1331
PRONcBP: :GUS GCTGGCTTTC GATGCGGTCA CTCATTACGG CAAAGTGTGG GTCATAATC AGGAAGTGAT GGAGCATCTG
PROG1 GCTGGCTTTC GATGCGGTCA CTCATTACGG CAAAGTGTGG GTCATAATC AGGAAGTGAT GGAGCATCTG
PROG3 GCTGGCTTTC GATGCGGTCA CTCATTACGG CAAAGTGTGG GTCATAATC AGGAAGTGAT GGAGCATCTG

1401
PRONcBP: :GUS GGGGGTATA EGCCATTGTA AGCCGATGTC ACGCCGATG TTATTGCCGG GAAAAGTATA GCTATCACCG
PROG1 GGGGGTATA EGCCATTGTA AGCCGATGTC ACGCCGATG TTATTGCCGG GAAAAGTATA GCTATCACCG
PROG3 GGGGGTATA EGCCATTGTA AGCCGATGTC ACGCCGATG TTATTGCCGG GAAAAGTATA GCTATCACCG

1471
PRONcBP: :GUS TTTGTGTGAA CAACGAACTG AACTGGCAGA CTATCCCGCC GGGAAATGGTG ATTAACCGAG AAAAGGCAA
PROG1 TTTGTGTGAA CAACGAACTG AACTGGCAGA CTATCCCGCC GGGAAATGGTG ATTAACCGAG AAAAGGCAA
PROG3 TTTGTGTGAA CAACGAACTG AACTGGCAGA CTATCCCGCC GGGAAATGGTG ATTAACCGAG AAAAGGCAA

1541
PRONcBP: :GUS GAAAAAGCAG TCTTACTTCC ATGATTTCCT TAACTATGCC GGAATCCATC GCAGCGTAAT GCTCTACACC
PROG1 GAAAAAGCAG TCTTACTTCC ATGATTTCCT TAACTATGCC GGAATCCATC GCAGCGTAAT GCTCTACACC
PROG3 GAAAAAGCAG TCTTACTTCC ATGATTTCCT TAACTATGCC GGAATCCATC GCAGCGTAAT GCTCTACACC

1611
PRONcBP: :GUS ACGCCGAACA CCTGGGTGGT CGATATCACG GTGGTGAAGC ATGTCGGGCA AGACTGTAA CACCGCTCTG
PROG1 ACGCCGAACA CCTGGGTGGT CGATATCACG GTGGTGAAGC ATGTCGGGCA AGACTGTAA CACCGCTCTG
PROG3 ACGCCGAACA CCTGGGTGGT CGATATCACG GTGGTGAAGC ATGTCGGGCA AGACTGTAA CACCGCTCTG

1681
PRONcBP: :GUS TTGACTGGCA GGTGGTGGCC AATGGTGAAT TCAGCGTTGA ACTGCCGAT GCGGATCAAC AGGTGGTTGC
PROG1 TTGACTGGCA GGTGGTGGCC AATGGTGAAT TCAGCGTTGA ACTGCCGAT GCGGATCAAC AGGTGGTTGC
PROG3 TTGACTGGCA GGTGGTGGCC AATGGTGAAT TCAGCGTTGA ACTGCCGAT GCGGATCAAC AGGTGGTTGC

1751
PRONcBP: :GUS AACTGGACAA GGCACTAGGG GGACTTTGCA AGTGGTGAAT CCGCACCTCT GGCAACCGGG TGAAAGTTAT
PROG1 AACTGGACAA GGCACTAGGG GGACTTTGCA AGTGGTGAAT CCGCACCTCT GGCAACCGGG TGAAAGTTAT
PROG3 AACTGGACAA GGCACTAGGG GGACTTTGCA AGTGGTGAAT CCGCACCTCT GGCAACCGGG TGAAAGTTAT

1821
PRONcBP: :GUS CTCTATGAAC TGTGCGTCA GCGCAAAAG CAGACAGAGT GTGATATCTA CCCGTTCTGC GTCCGCATCC
PROG1 CTCTATGAAC TGTGCGTCA GCGCAAAAG CAGACAGAGT GTGATATCTA CCCGTTCTGC GTCCGCATCC
PROG3 CTCTATGAAC TGTGCGTCA GCGCAAAAG CAGACAGAGT GTGATATCTA CCCGTTCTGC GTCCGCATCC

1891
PRONcBP: :GUS GGTCAAGTGGC AGTGAAGGGG GAACAGTTCG TGATTAACCA CAAACCGTTC TACTTTACTG GCTTGGTTCG
PROG1 GGTCAAGTGGC AGTGAAGGGG GAACAGTTCG TGATTAACCA CAAACCGTTC TACTTTACTG GCTTGGTTCG
PROG3 GGTCAAGTGGC AGTGAAGGGG GAACAGTTCG TGATTAACCA CAAACCGTTC TACTTTACTG GCTTGGTTCG

1961
PRONcBP: :GUS TCATGAAGAT GCGGACTTGC GTGGCAAAGG ATTTCC
PROG1 TCATGAAGAT GCGGACTTGC GTGGCAAAGG ATTTCC
PROG3 TCATGAAGAT GCGGACTTGC GTGGCAAAGG ATTTCC

Secuenciación de *pncbp:ncbp-GUS*

	1								
PRO+gennCBP : :GUS	C A A A T A A T G A	T T T T A T T T T G	A C T G A T A G T G	A C C T G T T C G T	T G C A A C A A A T	T G A T G A G C A A			
PGG1	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	61								
PRO+gennCBP : :GUS	T G C T T T T T A	T A A T G C C A A C	T T T G T A C A A A	A A A G C A G G C T	C C G C G G C C G C	C C C C T T C A C C			
PGG1	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	121								
PRO+gennCBP : :GUS	T A A A T C T A C G	G C G A A A C A G A	A A A A T A C A G A	T A A A G T T T C C	C A A A T T C G C T	A A G A G A A T C A			
PGG1	-----	-----	-----	-----	-----	A A A T T C G C T	A A G A G A A T C A		
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	181								
PRO+gennCBP : :GUS	C C A G A A A C T T	T T T A C A A T T T	A C A A A A T C A A	A A A C A A G A G A	T T A G A T A A A A	G T T A A A G G T G			
PGG1	C C A G A A A C T T	T T T A C A A T T T	A C A A A A T C A A	A A A C A A G A G A	T T A G A T A A A A	G T T A A A G G T G			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	241								
PRO+gennCBP : :GUS	A A A T C G A A T A	A C A A A A C A C	G A A A T C A A A C	C A A A G G G A A A	C G T A A G A T T G	A G C A C G A G A G			
PGG1	A A A T C G A A T A	A C A A A A C A C	G A A A T C A A A C	C A A A G G G A A A	C G T A A G A T T G	A G C A C G A G A G			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	301								
PRO+gennCBP : :GUS	T G C T T A A A G A	A C A C A A C T T T	A A G A G A A A A A	C T A C A C G A A A	C A A T C A C A A A	T A T A G A T T T G			
PGG1	T G C T T A A A G A	A C A C A A C T T T	A A G A G A A A A A	C T A C A C G A A A	C A A T C A C A A A	T A T A G A T T T G			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	361								
PRO+gennCBP : :GUS	G A G A A A A T C T	C A G A T C C A T G	A A A A A G T T T T	T A T T G T C A C T	T G T T T T T G C A	G A A A C A T T A C			
PGG1	G A G A A A A T C T	C A G A T C C A T G	A A A A A G T T T T	T A T T G K C A C T	T G T T T T T G C A	G A A A C A T T A C			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	421								
PRO+gennCBP : :GUS	A T T A C A G A T G	G A G A A C G C C A	A A A A T C G A T T	C T T T T T T T A	A T T T T C T T T T	T T G A C A A A T C			
PGG1	A T T A C A G A T G	G A G A A C G C C A	A A A A T C G A T T	C T T T T T T T A	A T T T T C T T T T	T T G A C A A A T C			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	481								
PRO+gennCBP : :GUS	G C A T T C G T C A	C A C A T T C C T T	T T T T T T T A A	T T T C T C C A C	T A C A C C A C T A	A T C T T G C C G T			
PGG1	G C A T T C G T C A	C A C A T T C C T T	T T T T T T T A A	T T T C T C C A C	T A C A C C A C T A	A T C T T G C C G T			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	541								
PRO+gennCBP : :GUS	G A T A G G T G C A	T G T G T A T G T G	T T T A A G A C A T	A T C T C T T T T G	T T C C G G T T G G	A T T A G T T T A T			
PGG1	G A T A G G T G C A	T G K G T A T G T G	T T T A A G A C A T	A T C T C T T T T G	T T C C G G T T G G	A T T A G T T T A T			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
	601								
PRO+gennCBP : :GUS	G T A A T A A C C A	A C A A C T A T A C	T T A A T A C A T T	T T C T C C A C T T	T T G A A T T T T C	T G T T T C T T A T			
PGG1	G T A A T A A C C A	A C A A C T A T A C	T T A A T A C A T T	T T C T C C A C T T	T T G A A T T T T C	T G T T T C T T A T			
PGG2	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
PGG4	-----	-----	-----	-----	-----	-----			

661
PRO+gennCBP : :GUS **TTTGTACT** **GTAAAAAGA** **ATGAAAATCA** **TTGAGATATT** **AAAACAACT** **AATCACTAAG**
PGG1 **TTTGTACT** **GTAAAAAGA** **ATGAAAATCA** **TTGAGATATT** **AAAACAACT** **AATCACTAAG**
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 -----

721
PRO+gennCBP : :GUS **GCCCATTAG** **TAGACCCAA** **AAGGCCCA** **TGCTATT** **TTTCTCCGA** **ATTTGACCT**
PGG1 **GCCCATTAG** **TAGACCCAA** **AAGGCCCA** **TGCTATT** **TTTCTCCGA** **ATTTGACCT**
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 -----

781
PRO+gennCBP : :GUS **TATGTATTG** **ACCGAGTGA** **AAAGTAATAC** **AGTCTTTTC** **TTCTCTCCTC** **CTCTTCTTC**
PGG1 **TATGTATTG** **ACCGAGTGA** **AAAGTAATAC** **AGTCTTTTC** **TTCTCTCCTC** **CTCTTCTTC**
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 -----

841
PRO+gennCBP : :GUS **TTCTGATTG** **GAATTTTAGG** **GCTTTTGAAA** **GCAAGGAAAGC** **GTGAAGCTCT** **AATCGAGAAA**
PGG1 **TTCTGATTG** **GAATTTTAGG** **GCTTTTGAAA** **GCAAGGAAAGC** **GTGAAGCTCT** **AATCGAGAAA**
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 -----

901
PRO+gennCBP : :GUS **AAAAAGGAGG** **TTTGGATAG** **GAGAGACGAT** **GAGATCAGGG** **ACTCGGGAAA** **CATGGACAGC**
PGG1 **AAAAAGGAGG** **TTTGGATAG** **GAGAGACGAT** **GAGATCAGGG** **ACTCGGGAAA** **CATGGACAGC**
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 -----

961
PRO+gennCBP : :GUS **ATCAAGTCA** **ACTAATGTTAC** **CGACTCTGTT** **TCCGAGGAAC** **GCCGCTCTCG** **TGAGCTCAAG**
PGG1 **ATCAAGTCA** **ACTAATGTTAC** **CGACTCTGTT** **TCCGAGGAAC** **GCCGCTCTCG** **TGAGCTCAAG**
PGG2 **ATCAAGTCA** **ACTAATGTTAC** **CGACTCTGTT** **TCCGAGGAAC** **GCCGCTCTCG** **TGAGCTCAAG**
PGG5 -----
PGG4 -----

1021
PRO+gennCBP : :GUS **GATGGAGACC** **ATCCTTTAGG** **GGTTTGTCTT** **TTATCCTTAG** **TATCGATTCA** **TTTGCAATTT**
PGG1 **GATGGAGACC** **ATCCTTTAGG** **GGTTTGTCTT** **TTATCCTTAG** **TATCGATTCA** **TTTGCAATTT**
PGG2 **GATGGAGACC** **ATCCTTTAGG** **GGTTTGTCTT** **TTATCCTTAG** **TATCGATTCA** **TTTGCAATTT**
PGG5 -----
PGG4 -----

1081
PRO+gennCBP : :GUS **GAATCTGATC** **TTAGCTGAAA** **ATTTGATTC** **CGTTCGTCAA** **AGATTTCTGA** **ACTTTGTATA**
PGG1 **GAATCTGATC** **TTAGCTGAAA** **ATTTGATTC** **CGTTCGTCAA** **AGATTTCTGA** **ACTTTGTATA**
PGG2 **GAATCTGATC** **TTAGCTGAAA** **ATTTGATTC** **CGTTCGTCAA** **AGATTTCTGA** **ACTTTGTATA**
PGG5 -----
PGG4 -----

1141
PRO+gennCBP : :GUS **TGACGGTTTA** **TAGCTAGAGT** **AGTGGAAGAT** **TGGATTCCTA** **AACTTTGTTT** **TGTTGGAGTT**
PGG1 **TGACGGTTTA** **TAGCTAGAGT** **AGTGGAAGAT** **TGGATTCCTA** **AACTTTGTTT** **TGTTGGAGTT**
PGG2 **TGACGGTTTA** **TAGCTAGAGT** **AGTGGAAGAT** **TGGATTCCTA** **AACTTTGTTT** **TGTTGGAGTT**
PGG5 -----
PGG4 -----

1201
PRO+gennCBP : :GUS **TTTGTPTTCA** **AADTAGGTTT** **TGGGAATTG** **TTTARAATGTA** **TCTGAGCTCM** **AATGTTATAG**
PGG1 **TTTGTPTTCA** **AADTAGGTTT** **TGGGAATTG** **TTTARAATGTA** **TCTGAGCTCM** **AATGTTATAG**
PGG2 **TTTGTPTTCA** **AADTAGGTTT** **TGGGAATTG** **TTTARAATGTA** **TCTGAGCTCM** **AATGTTATAG**
PGG5 -----
PGG4 -----

1261
PRO+gennCBP : :GUS **GATTTCTGTA** **TTGGTGGTAT** **TGATTTGATG** **TAGAACAAGG** **CAGATTGATT** **TAGAAGAACT**
PGG1 **GATTTCTGTA** **TTGGTGGTAT** **TGATTTGATG** **TAGAACAAGG** **CAGATTGATT** **TAGAAGAACT**
PGG2 **GATTTCTGTA** **TTGGTGGTAT** **TGATTTGATG** **TAGAACAAGG** **CAGATTGATT** **TAGAAGAACT**
PGG5 -----
PGG4 -----

1321
PRO+gennCBP : :GUS GATTTCAATG TTAAGAGTAA GTACTGGCTC AGTGACTCTA GGATTTTGG TAAAGATGCA
PGG1
PGG2 GATTTCAATG TTAAGAGTAA GTACTGGCTC AGTGACTCTA GGATTTTGG TAAAGATGCA
PGG5
PGG4 -----

1381
PRO+gennCBP : :GUS GTACAAGTTT TCGATATGGT ACACCTCGTCC CACACCAGGG GTTCGGAAC AGTCTTATGA
PGG1
PGG2 GTACAAGTTT TCGATATGGT ACACCTCGTCC CACACCAGGG GTTCGGAAC AGTCTTATGA
PGG5
PGG4 -----

1441
PRO+gennCBP : :GUS AGATAACATC AAGAAGATGG TAGAATTGAG CACGGTAAGT CTAAATATAC TACTGGAAGT
PGG1
PGG2 AGATAACATC AAGAAGATGG TAGAATTGAG CACGGTAAGT CTAAATATAC TACTGGAAGT
PGG5
PGG4 -----

1501
PRO+gennCBP : :GUS TCAATGTTGA AGCTGTTTGC GATACTATCT TGTTCGTTTC TGAGTTAAGG CTTTATATAA
PGG1
PGG2 TCAATGTTGA AGCTGTTTGC GATACTATCT TGTTCGTTTC TGAGTTAAGG CTTTATATAA
PGG5
PGG4 -----

1561
PRO+gennCBP : :GUS CTAGGTTGAA GGATTTTGGG CCTGCTACTG TCACCCTGCT CGTTCCTCTC TCTTGCCTAG
PGG1
PGG2 CTAGGTTGAA GGATTTTGGG CCTGCTACTG TCACCCTGCT CGTTCCTCTC TCTTGCCTAG
PGG5
PGG4 -----

1621
PRO+gennCBP : :GUS TCCAAACAGAT CTTCAATTCI TTAAGGATGG GATTCGTCCTA TTGTGGGAGG TCCGATATCC
PGG1
PGG2 TCCAAACAGAT CTTCAATTCI TTAAGGATGG GATTCGTCCTA TTGTGGGAGG TCCGATATCC
PGG5
PGG4 -----

1681
PRO+gennCBP : :GUS CCTGTGTTGA TTTTTCGTAT TGTCTTTTAA TCTGGATCAT CGATATAGAG GGAACCTTTT
PGG1
PGG2 CCTGTGTTGA TTTTTCGTAT TGTCTTTTAA TCTGGATCAT CGATATAGAG GGAACCTTTT
PGG5
PGG4 -----

1741
PRO+gennCBP : :GUS ATACAACAAA AGTTTCTCAA GAGTTGTATC TTCTTCAATA AACCAACTAA ACTAGCTAAA
PGG1
PGG2 ATACAACAAA AGTTTCTCAA GAGTTGTATC TTCTTCAATA AACCAACTAA ACTAGCTAAA
PGG5
PGG4 -----

1801
PRO+gennCBP : :GUS TTCATCACCT TTAGGATGG TGCCTACTGC AATGGAAGAA AGTGGATCAT ACGTTTCTCA
PGG1
PGG2 TTCATCACCT TTAGGATGG TGCCTACTGC AATGGAAGAA AGTGGATCAT ACGTTTCTCA
PGG5
PGG4 -----

1861
PRO+gennCBP : :GUS AAAGTTGTAT CTGCTCGCTT CTGGGAGGAT CTGGTGAAGT TTAATTTCTT GTGGGCACTA
PGG1
PGG2 AAAGTTGTAT CTGCTCGCTT CTGGGAGGAT CTGGTGAAGT TTAATTTCTT GTGGGCACTA
PGG5
PGG4 -----

1921
PRO+gennCBP : :GUS CTATGGAGT ATTGACACCT TCTACTTTA TTCAAAAGAA ACCCTTTTCT CAATGTTATG
PGG1
PGG2 CTATGGAGT ATTGACACCT TCTACTTTA TTCAAAAGAA ACCCTTTTCT CAATGTTATG
PGG5
PGG4 -----

1981
PRO+gennCBP::GUS **A**TAAAT**C**CA**T** **T**T**A**C**A**T**A**C**T** **T**AG**G**G**T**C**T**G**A** **G**AA**T**C**A**T**G**T**T** **A**AA**T**A**C**T**C**T**T** **C**CG**T**T**A**T**T**T
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **A**TAAAT**C**CA**T** **T**T**A**C**A**T**A**C**T** **T**AG**G**G**T**C**T**G**A** **G**AA**T**C**A**T**G**T**T** **A**AA**T**A**T**T**C**T**T** **C**CG**T**T**A**T**T**T
PGG4 -----

2041
PRO+gennCBP::GUS **G**TT**T**T**C**T**T**C**A** **G**C**T**T**C**T**T**G**G** **T**T**G**G**T**AG**G**C**G** **A**CC**A**G**C**T**T**G**A** **T**G**A**T**G**C**T**G**A**T **A**AC**A**T**A**T**G**T**G**
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **G**TT**T**T**C**T**T**C**A** **G**C**T**T**C**T**T**G**G** **T**T**G**G**T**AG**G**C**G** **M**CC**A**G**C**T**T**G**A** **T**G**A**T**G**C**T**G**A**T **A**AC**A**T**A**T**G**T**G**
PGG4 -----

2101
PRO+gennCBP::GUS **G**GG**C**A**G**T**A**C**T** **G**A**G**T**G**T**C**CG**T** **T**T**C**AA**C**G**A**GG **A**C**A**T**C**A**T**T**A**G **T**G**A**T**T**G**G**A**A**T **C**G**C**A**A**T**G**C**T**T
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **G**GS**C**A**G**T**A**C**T** **G**A**G**T**G**T**C**CG**T** **T**T**C**AA**C**G**A**GG **A**C**A**T**C**A**T**T**A**G **T**G**A**T**T**G**G**A**A**T **C**G**C**A**A**T**G**C**T**T
PGG4 -----

2161
PRO+gennCBP::GUS **C**T**G**A**C**CA**T**C**A** **G**C**T**G**A**G**A**AA **C**T**G**T**T**C**A**CA **G**A**A**G**A**A**C**T**G**T **C**T**C**T**C**T**C**CT **C**T**C**C**T**T**T**T**G**A
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **C**T**G**A**C**CA**T**C**A** **G**G**K**G**A**G**A**AA **C**T**K**T**T**C**A**CA **G**A**R**G**A**A**C**KK**T** **Y**T**T**Y**T**T**C**CT **C**T**C**C**T**T**T**T**G**A
PGG4 -----

2221
PRO+gennCBP::GUS **T**T**G**T**A**C**T**T**A** **C**A**C**A**G**T**G**CA **T**G**T**T**T**C**C**T **A**AA**C**A**G**G**C**A**G** **T**G**A**T**G**G**T**T**T** **G**A**G**A**G**A**C**T**C**A
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **T**T**G**T**A**C**T**T**A** **C**A**C**A**G**T**G**CA **T**G**T**T**T**C**C**T **A**AA**C**A**G**G**C**A**G** **T**G**A**T**G**G**T**T**T** **G**A**G**A**G**A**C**T**C**A
PGG4 -----

2281
PRO+gennCBP::GUS **A**T**C**AA**G**CG**G**C **A**T**T**T**G**A**A**G**T** **G**C**C**T**C**A**T**G**C**A **T**A**T**G**T**C**A**T**G**G **A**A**T**A**C**A**G**CC **A**C**A**C**G**A**T**G**C**T
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **A**T**C**AA**G**CG**G**C **A**T**T**T**G**A**A**G**T** **G**C**C**T**C**A**T**G**C**A **T**A**T**G**T**C**A**T**G**G **AA**-----
PGG4 -----

2341
PRO+gennCBP::GUS **T**C**T**C**T**CG**G**C **A**CA**A**C**T**C**T**T**C** **C**T**A**CA**G**AA**A**C **A**C**A**T**G**G**T**G**A** **G**AG**G**AA**A**GGG **T**GG**G**CG**G**CG**C**
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 -----**G**A**T**CC**A**GGG **T**GG**G**CG**G**CG**C**

2401
PRO+gennCBP::GUS **G**ACC**C**A**G**C**T**T **T**C**T**T**G**T**A**CA **A**G**T**T**G**CA**T** **A**T**A**AG**A**AA**G**C **A**T**T**G**C**T**A**T**C** **A**A**T**T**T**G**T**T**G**C
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **G**ACC**C**A**G**C**T**T **T**C**T**T**G**T**A**CA **A**G**T**T**G**CA**T** **A**T**A**AG**A**AA**G**C **A**T**T**G**C**T**A**T**C** **A**A**T**T**T**G**T**T**G**C
PGG4 -----

2461
PRO+gennCBP::GUS **A**AC**G**A**A**C**A**GG **T**C**A**C**T**A**T**C**A**G **T**C**A**AA**A**T**A**A **A**T**C**A**T**T**A**T**T** **T**T**C**A**G**C**T**T**C** **T**T**G**T**A**CA**A**GG
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 **A**AC**G**A**A**C**A**GG **T**C**A**C**T**A**T**C**A**G **T**C**A**AA**A**T**A**A **A**T**C**A**T**T**A**T**T** **G**CC**A**T**C**CG**C** **T**G**A**T**A**T**C**CC**C**
PGG4 -----

2521
PRO+gennCBP::GUS **T**GG**T**CG**A**T**C** **T**AG**A**GG**A**T**C**C **C**GGG**T**GG**T**C **A**G**T**CC**C**T**A**T **G**T**T**AG**G**T**C**CT **C**T**A**G**A**AA**C**CC
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 **T**A**T**AG**T**G**A**G**T** **T**C**A**T**A**T**A**CA **G**---**G**T**C**A**T**A **G**C**T**G**T**T**C**CT **G**G**C**A**G**C**T**CT**G** **G**CC**C**G**T**G**T**CT

2581
PRO+gennCBP::GUS **C**AA**C**CC**G**T**G**A **A**A**T**CA**A**AA**A**A **C**T**C**GA**C**GG**C**C **T**G**T**GG**G**CA**T**T **C**A**G**T**C**T**G**A**T** **C**GC**G**AA**A**A**C**T
PGG1 -----
PGG2 -----
PGG5 -----
PGG4 **C**AA**A**A**T**C**T**CT **G**A**T**G**T**T**A**C**A**- **T**T**G**CA**A**AG**A** **T**AAAA**A**T**A**T**A** **T**C**A**T**C**A**T**G**A**A **C**A**A**T**A**AA**A**C**T**

2641
PRO+gennCBP : :GUS G TGG AAT TGA T CAG C C T T G G T G G G A A A G C G G T T A C A A G A A A - - - - G C C G G G C A A T T G C
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 C T C T G C T T A C A T A A A C A G T A A T A C A A G G G G T G T T T G A G C C A T A T C A A C G G G A A A C G T C

2701
PRO+gennCBP : :GUS T G T G C C A G G C A G T T T T A A C G A T C A G T T C G C G A T G C A G A T A T T C G T A A T T A T G C G G G C A -
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 G A G G C C G C G A T T A A A T T C C A C A T G G A T T G C T G A T T T A T A T G G G T A T A A A T G G G C T C G C G A

2761
PRO+gennCBP : :GUS - - A C C T C T G - G T A T C A G C G C G A A G T C T T A T A C C G A A A G G T T G G C A G G C C A G C T A T C G
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 T A A T G T C G G G C A A T C A G G - - G G G A C A A T C T A T C G G T G T A T G G G A A G C C C G A T C G C G C A

2821
PRO+gennCBP : :GUS T G C T G C G T T T C G A T G C G G T C A C T C A T T A C G G C A A A G T G T G G T C A A T A A T C A G G A A G T G A
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 G A G T T - G T T T C - - - - T G A A A C A T G G C A A A G G T A G C G T T G C C A A T G A T G T T A C G A T G A G A

2881
PRO+gennCBP : :GUS T G G A G C A T C A G G G C G C T A T A C G C C A T T T G A A G C C G A T G T C A G C C C T A T G T T A T T G C C G
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 T G G T C A G A C T A A A C T G G C T G A C G G A A T T T A T G C C T C T T C C G A C C - - - - - A T C A

2941
PRO+gennCBP : :GUS G G A A A A G T G T A C G T A T C A C C G T T T G T G T G A A C A A C G A A C H G A A C T G G C A G A C T A T C C C G C
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 A G C A T T T A T C C G T A C T C C - - - - - T G A T G A T G C A T G G T T A C T C A C C A C T G T G A T C C C

3001
PRO+gennCBP : :GUS C G G G A A T G G T G A T T A C C G A C G A A A A C G G C A A G A A A A G C A G T C T A C T T C C A T - G A T T T C
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 C G G A A A A C A G C A T T C C A G G T A T - - - T A G A A G A A T A C C T G A T T C A G G T G A A A A T A T T G T

3061
PRO+gennCBP : :GUS T T T A A C T A T G C C G G A A T C C A T G C C A G C G T A A T G C T C T A C A C C A G C C G A A C A C C T G G G T G
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 T G A T G C G C T G G C A T G T T C C T G G C C G G T T G C A T T C G A T T C C T G T T T G T A - - - - - A T T

3121
PRO+gennCBP : :GUS G A C G A T A T C A C C G T G G T G A C G C A T G T C G - - - C G C A A G A C H G T A A C C A C G C G T C T G T T G A C
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 G T C C T T T A A C A G C G A T C G C G T A T T T C G T C T G C A A T C A G G C G C A A T C A C G A A T G A A T A - A C

3181
PRO+gennCBP : :GUS T G G C A G G T G G T G G C C A A T G G T G A T G T C A G C G T T G A A C T G C G T G A T G C G G A T C A A C A G G T G
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 G G T T T G G T T G A T G C G T G A T T - - - T - - - T G A T G A C G A G C G T A A T G G - - T G G C C T G T T G

3241
PRO+gennCBP : :GUS G T T G C A A C T G G A C A A G G C A C T A G C G G G A C T T T G C A A G T G G T G A A T C C G C - A C C T C T G G C A
P G G 1 - - - - -
P G G 2 - - - - -
P G G 5 - - - - -
P G G 4 A A C A A G T C T G - - G A A A G A A A T G C A T A A A C T T T T G C C A T T C T C A C C G G A T T C A G T C G T C A C

```

3301
PRO+genncBP : :GUS  ACCGGG TGA  GCTTATCTCT  ATGAACTGTG  GGTCACTGCC  AAAAGCCGA  CAGACTGTGA
PGG1  -----
PGG2  -----
PGG5  -----
PGG4  TCAATGGTGA  TTCTCTCTTG  ATTAACCTTA  TTT---TGAC  GAGGGGAAAT  TAAATATGTG

3361
PRO+genncBP : :GUS  TAATACCCG  TTTCGGTTCG  GCAATCCGGT  AGTGGCAGTG  AAGGGCGAAC  AGTACCAGAT
PGG1  -----
PGG2  -----
PGG5  -----
PGG4  T-----ATTC  ATGTTGGACG  AGT-----

3421
PRO+genncBP : :GUS  TAAACCAAAA  CCGTTCTACT  TTACTTGGCT  TGGTTCGTCA  GAAGATGCGG  ACTTTCGTGG
PGG1  -----
PGG2  -----
PGG5  -----
PGG4  -----

3481
PRO+genncBP : :GUS  CAAAAGGATTC  G
PGG1  -----
PGG2  -----
PGG5  -----
PGG4  -----

```

12.3 Anexo 3. Soluciones para ensayo de GUS

Amortiguador de fosfato de sodio pH 7	Concentración (mM)
EDTA	10
Ferricianuro de potasio	0.5
Ferrocianuro de potasio	0.5
Tritón X-100	0.5
X-GlcA	1 mg/ml

Amortiguador Z pH 7	Concentración (mM)
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	40
Na ₂ HPO ₄	60
KCl	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	1