



Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C

TRANSFORMACIÓN GÉNICA DE MUTANTES *clv2* DE
Arabidopsis thaliana CON EL GEN ORTÓLOGO *CLV2* DE
MANGO

POR:

LUCIA TERESA ANGULO SANCHEZ

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

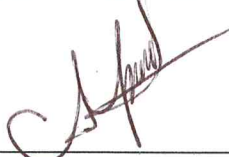
Enero del 2016

APROBACIÓN

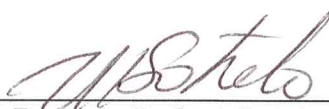
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lucia Teresa Angulo Sanchez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Director de Tesis



Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Asesor



Dr. Rogério Rafael Sotelo Mundo
Asesor



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado (566244), además por la beca mixta de movilidad nacional otorgada (290841).

Al personal de CIAD, A.C. por haberme aceptado e instruido durante todo este proceso en el conocimiento y en el arte de hacer ciencia.

Al proyecto CONACYT CB2012-01-178296 por otorgar a la Dra. María Islas, el financiamiento para la realización de este proyecto.

A Dra. María Auxiliadora Islas Osuna por adoptarme como parte de su equipo de trabajo, por todas las oportunidades y experiencias que me dio para crecer, por creer en mí, Muchas gracias.

A Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara por apoyarme en todo momento, académicamente, laboralmente. Por el apoyo dentro y fuera de CIAD. Gracias por responder siempre a mis SOS y por creer en mí.

A Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por apoyarme durante todo este periodo, tanto académicamente como laboral. Gracias.

A Dr. Rogerio Sotelo por apoyarme y otorgarme oportunidades para crecer como profesionista. Gracias.

A mis profesores de la Maestría por acercarme más al mundo del conocimiento y la ciencia.

Al personal de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, por apoyarme en todo momento tanto con equipos, reactivos, como con sus palabras de aliento.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas: al Dr. Martin Tiznado por el apoyo y enseñanzas que apoyaron este trabajo, a Javier Ojeda por su apoyo técnico y por sus porras.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal: Dr. Miguel Angel Martínez, a Emmanuel Hernández y Francisco “Panchito” Soto por el apoyo técnico, conocimientos compartidos, y las instalaciones prestadas.

Al Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas: Dra. Marisela Rivera D., Karen R. Astorga C. por su apoyo técnico y a Mafer, por su apoyo técnico incondicional en todo momento.

Al Dr. Frans Tax (Depto. MCB, Universidad de Arizona), por su apoyo y asesoría desde el inicio de este proyecto y por su donación de semillas, cepas y vectores utilizados en este proyecto.

Al Dr. Sergio Casas (IPICYT, SLP), por recibirme en la estancia académica y por adoptarme como alumna en su laboratorio, por su asesoría y apoyo en todo momento. Además a los Tricho's boys (May, Magnolia, Oscar, Macario, Noemí) por aceptar a esta muchacha, y hacerme sentir como parte de su familia.

A Nicolás y Angelique, por estar ahí siempre que los necesité, Gracias por todo, y por soportar a esta muchachita. Un abrazo de oso.

Al Dr. Francisco Quiroz, por su contribución con los análisis y obtención de las imágenes de microscopía confocal, así como su apoyo para interpretarlas.

A mis compañeros de la maestría por crear un ambiente de compañerismo aun en los últimos momentos, por no dejarnos vencer.

A mis compañeros de laboratorio: Mitzuko, Magda, Chema, Eliezer, Deyanira, Fox, Chavira, Ángel, David, por crear un ambiente divertido e interesante de trabajo, además por aguantar mis llamadas de atención o bromas. Gracias por aceptarme tal y como soy. A Magda y Mitzuko por ser mis hermanas mayores académicamente y enseñarme a como trabajar en el laboratorio, Gracias por todo su cariño y apoyo.

A Elena, Lalo, Idaly, Daniela, Tavo, Aracely, Armida por su apoyo en todo momento y hora del día, literal. Gracias por escuchar mis quejas y aceptar mis bromas.

A Héctor, gracias por todo tu apoyo y seguir luchando a mi lado, aun en las adversidades. Gracias por todo.

A mi Madre y Padre, por incursionarme en el mundo de la ciencia, por abrirme los ojos a un mundo increíble. A mis Hermanos, por estar apoyándome en todo momento. Gracias familia por no perder la fe en mí y ayudarme a creer en mí

A Dios, Gracias, por los conocimientos y sabiduría liberados.

DEDICATORIA

*A las personas que más creen en mí a pesar de mis locuras.
Mis Padres, Hermanos, Sobrinas y Héctor*

*El pensar que uno puede sin nadie más a su lado es la ilusión más absurda,
eres la huella que dejas en ellos y la que ellos dejan en ti.*

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	7
II.1 Los Meristemas Apicales como Puntos Clave en el Desarrollo de la Planta.....	7
II.2. Los Receptores CLAVATA y su Función en el Desarrollo de las Plantas	8
II.3 Vectores Binarios para la Transformación de Plantas Mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
II.4. Estudios de Complementación Genética para Conocer Funcionalidad la Proteínas.....	14
III.HIPÓTESIS.....	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1. Objetivo General.....	19
IV.2. Objetivos Específicos	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
V.1. Cultivo de Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
V.2. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> con la Región Codificante de <i>CLV2</i> de Mango (<i>MiCLV2</i>).....	21
V.2.1. Clonación de <i>CLV2</i> de Mango y Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
V.2.1.1 Clonación de la región codificante de <i>CLV2</i> de mango.	22

V.2.1.2 Construcción del vector binario pBIB:KAN::pAtCLV2: <i>MiCLV2</i> :GFP: GWR.	23
V.2.2. Transfección de mutantes <i>-clv2</i> de <i>Arabidopsis</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Transformado los Constructos Obtenidos.	26
V.3 Selección de Semillas Transformadas para los Dos Vectores Binarios	28
V.3.1 Selección de Semillas Transformadas con el Vector Binario pBIB:KAN::pAtCLV2: <i>MiCLV2</i> ::GFP:GWR.	28
V.3.2 Selección de Semillas Transformadas con el Vector Binario pBIB:BASTA:35S:: <i>MiCLV2</i> ::GWR.	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI.1. Construcción de los Vectores Binarios para la Transformación de Silvestres y Mutantes <i>-clv2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
VI.1.1. Obtención del Vector Binario pBIB:KAN::pAtCLV2: <i>MiCLV2</i> :: GFP:GWR con la Secuencia <i>MiCLV2</i>	31
VI.1.2. Clonación de <i>MiCLV2</i> en el Vector Binario pBIB:BASTA:35S:GWR	37
VI.2. Transformación de los dos vectores Binarios TDNA en de <i>A. tumefaciens</i> (GV3103).	40
VI.3. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Transformado con los Vectores Binarios.	43
VI.4. Crecimiento y Análisis de Semillas Transformadas con el pBIB:KAN:: pAtCLV2: <i>MiCLV2</i> :GFP:GWR.	46
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. PERSPECTIVAS	53
IX. ANEXOS	54
X. REFERENCIAS CITADAS	56

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Estructura y divisiones de los meristemos de inflorescencia de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
2	Mecanismo de acción de la familia CLAVATA en la zona central de los meristemos apicales.	11
3	Diagrama de las inserciones y mutaciones de las mutantes <i>clv2-2</i> , <i>clv2-7</i> y <i>clv2-8</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	16
4	Diagrama de la distribución de iniciadores internos específicos para la verificación de la orientación de <i>MiCLV2</i> en el vector binario PBIB:KAN:GFP:GWR.	24
5	Diagrama de los vectores binarios.	30
6	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificaciones de <i>CLV2</i> de mango, obtenidos por PCR, a partir de cDNA de pulpa de mango.	31
7	Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de los vectores pBIB:KAN:GWR:GFP y pGEM: <i>MiCLV2</i> con la enzima de restricción <i>XhoI</i> .	32
8	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR de colonia para la detección de clonas recombinantes que contengan <i>MiCLV2</i> en el vector binario pBIB:KAN:GFP:GWR.	32
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA plasmídico obtenido de tres colonias recombinantes y digerido con <i>XhoI</i> .	33

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

<i>Figura</i>		Página
10	Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de verificación de la orientación de la secuencia de <i>MiCLV2</i> en el vector binario pBIB:KAN: GFP:GWR.	34
11	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones dobles con <i>EcoRV</i> y <i>Sall</i> .	35
12	Diagrama pBIB:KAN:: <i>MiCLV2</i> :GWR:GFP producto de la ligación de <i>MiCLV2</i> en el vector binario pBIB:KAN:GWR:GFP.	36
13	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión de pBIB:KAN:: <i>pAtCLV2</i> : <i>MiCLV2</i> ::GFP:GWR con la enzima <i>XhoI</i> .	37
14	Diagrama de pBIB:KAN:: <i>pAtCLV2</i> : <i>MiCLV2</i> ::GFP:GWR obtenido mediante recombinación para insertar el promotor nativo de <i>CLV2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , en el vector binario pBIB:KAN:: <i>MiCLV2</i> :GFP:GWR.	37
15	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de colonia para identificar clones recombinantes de <i>MiCLV2</i> en pCR8/TOPO/GWR.	38
16	Análisis electroforético de PCR de colonia para el constructo pBIB: BASTA::35S:: <i>MiCLV2</i> ::GWR.	39
17	Análisis electroforético del ensayo de digestión con las enzimas <i>EcoRI</i> .	39
18	Diagrama de pBIB:BASTA::35S:: <i>MiCLV2</i> ::GWR la recombinación de <i>MiCLV2</i> en el vector binario PBIB:BASTA:35S:GWR	40
19	Análisis electroforético de los amplicones de las colonias transformadas de <i>Agrobacterium</i> GV3103 con los vectores	

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

<i>Figura</i>		Página
	A) pBIB:KAN:: <i>pATCLV2:MiCLV2:GFP:GWR</i> y B) pBIB:BASTA:35S:: <i>MiCLV2::GWR</i>	42
20	Análisis de ensayo de restricción de dos muestras posibles del vector pBIB:KAN:: <i>pAtCLV2:MiCLV2:GFP:GWR</i> con las enzimas <i>PstI</i> y <i>XhoI</i> .	42
21	Análisis del ensayo de restricción con la enzima <i>EcoRI</i> , de la cepa transformada de <i>Agrobacterium</i> con el vector pBIB:BASTA:35S:: <i>MiCLV2:GWR</i> .	43
22	Mutante <i>-clv2-8</i> , Se observa el número elevado de frutos a través del tallo y en el ápice.	44
23	Método de gota por gota con el medio de infiltración 5% de sacarosa y 0.025% de Silwet L-77® para transfectar mutantes <i>-clv2</i> de <i>Arabidopsis</i> .	46
24	Porcentaje de germinación de dos líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> : línea silvestre WS y línea mutante <i>-clv2-8</i> transformada.	48
25	Germinación de semillas silvestres y mutantes transformadas.	49
26	Pase de germinados al periodo de aclimatación.	50
27	Localización de la proteína verde fluorescente fusionada a <i>CLV2</i> de mango en germinados por microscopía confocal.	51

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		Página
1	Iniciadores específicos utilizados en la amplificación y detección de orientación de la secuencia de <i>CLV2</i> de mango (<i>MiCLV2</i>)	18

RESUMEN

Los frutos se desarrollan a partir de los meristemas apicales de los órganos florales los cuales albergan células pluripotentes poco diferenciadas. El tamaño y la actividad de los meristemas es clave para el desarrollo de las diferentes estructuras u órganos de la planta. La ruta de señalización de la familia CLAVATA (CLV) está formada por tres componentes proteicos: CLV1, CLV2 y CLV3, los cuáles regulan negativamente la proliferación celular en los meristemas. El gen *CLAVATA2* (*CLV2*) codifica para un receptor rico en leucinas y su importancia en la diferenciación celular durante la formación de flores y frutos se ha investigado en *Arabidopsis thaliana*. La región codificante de *CLV2* de mango se obtuvo, su tamaño es de 2175 pares de bases y codifica para una proteína de 724 aminoácidos, que es 65% idéntica y 77% similar a *CLV2* de *A. thaliana*. El objetivo de este estudio fue clonar *CLV2* de mango y obtener vectores binarios para realizar la complementación génica de mutantes *clv2* de *A. thaliana*. El cDNA *CLV2* de mango se clonó en pGEM y pCR8/topo/GWR, posteriormente se subclonó en pBIB:KAN:GWR:GFP. El vector pBIB:KAN:MiCLV2::GWR:GFP se recombinó para incorporarle el promotor nativo de *CLV2* de *A. thaliana*. También se recombinó *MiCLV2* en el vector pBIB:BASTA:35S:GWR y se obtuvo pBIB:BASTA:35S::MiCLV2::GWR. Posteriormente, los dos vectores binarios fueron transformados en *Agrobacterium tumefaciens* GV3103, el cual se utilizó para infectar *Arabidopsis* mutantes *clv2* para transformarlas con el gen ortólogo de mango. Se seleccionaron germinados de *A. thaliana* resistentes a kanamicina, y se detectó la proteína verde fluorescente en los cotiledones y en la raíz por microscopía confocal lo que confirma que se transformaron las plantas de *Arabidopsis*. Se

continuará para obtener plantas transformadas adultas y semillas de la siguiente generación. Por otra parte, se seleccionó una planta resistente al herbicida glufosinato (BASTA) de la cuál se obtuvieron semillas para sembrarlas y obtener plantas de la siguiente generación. En ambas plantas F1 se evaluará la complementación genética y el fenotipo resultante.

Palabras clave: CLAVATA 2, *Arabidopsis thaliana*, Vector binario, transformación, *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

The fruit develops from floral organs through stem cells located in the apical meristems, which harbor poorly differentiated pluripotent cells. The size and activity of the meristems is key to the development of different structures or organs of the plant. The signaling route CLAVATA (CLV) is a family of three protein components CLV1, CLV2 and CLV3 whose negatively regulate cell proliferation in the meristems. The *CLAVATA2* (*CLV2*) gene encodes a leucine-rich receptor and it is important for cell differentiation in the formation of flowers and fruits in *Arabidopsis thaliana*. The nucleotide sequence of *CLV2* of mango was obtained, its size is 2175 bp and encode a 724 aa protein. Mango *CLV2* amino acid sequence is 65% identical and 77% similar to *CLV2* of *A. thaliana*. The objective of this study is to clone the coding sequence of mango *CLV2* in binary vectors to complement *clv2 A. thaliana* mutants. Mango *CLV2* (*MiCLV2*) was cloned into pGEM and pCR8 /topo/GWR and subsequently subcloned into pBIB:KAN: GWR:GFP.KAN: This vector was recombined to the native promoter of *CLV2* of *A. thaliana*. On the other hand, *MiCLV2* was recombined to the vector pBIB:BASTA:35S:GWR to obtain pBIB:BASTA:35S::*MiCLV2*::GWR. Subsequently, the two binary vectors were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3103. Transformed *A. tumefaciens* were used to infect *clv2 A. thaliana* mutants for transformation. Seedlings resistant to kanamycin were obtained and the green fluorescent protein was detected in cotyledons and roots from seedlings by confocal microscopy thus confirming that *Arabidopsis* were transformed. Adult plants will be obtained to verify the genetic complementation and study the resultant phenotype. On the other hand, one BASTA resistant plant was obtained and seeds are going to be collected and sow to obtain the F1 generation in order to evaluate complementation and the resultant phenotype.

Keywords: CLAVATA 2 meristems, cell differentiation, *Arabidopsis thaliana*, binary vector, transformation of *Agrobacterium tumefaciens*.

I. INTRODUCCIÓN

En las plantas el sistema de proliferación celular se da en cierta región denominada meristemas, éstos son un cumulo de células pluripotentes, poco diferenciadas. En los meristemas apicales se presenta un control equilibrado de esta proliferación, esto se debe a que a pesar de generar células nuevas en la zona central, existen células que se van diferenciando hacia los diferentes órganos o tejidos necesarios (Long y Barton, 2000). Para el mantenimiento y control de los meristemas existen diferentes métodos de control de expresión del factor de transcripción WUSHEL (WUS), el cual regula de manera positiva la proliferación celular. Uno de los principales reguladores de WUS, es la familia CLAVATA que son proteínas tipo cinasas que al interaccionar entre ellas dan la señalización de mantenimiento en los meristemas apicales (Mandel et al., 2014).

La familia CLAVATA (CLV), está compuesta por dos proteínas CLV1 y CLV2, y por un péptido señal, CLV3. Estas proteínas, que funcionan como receptores, están involucradas en la señalización de los meristemas durante la diferenciación u organogénesis celular (Clark et al., 1997; McSteen y Haeke, 1998). Además, la familia CLAVATA forma parte de un complejo proteico de 450 kDa, el cual incluye otras proteínas como WUSHEL, KAPP y CORYNE entre otras (Jeong et al., 1999; Shiu y Bleecker, 2001). El estudio de estos receptores determina cómo es la señalización del desarrollo de la planta bajo diferentes condiciones ambientales. Para determinar la función de los productos

de los genes (proteínas codificadas) en ocasiones es necesario utilizar organismos modelo de estudio.

La planta modelo, *Arabidopsis thaliana* posee ciertas ventajas como: un genoma completamente secuenciado, su ciclo de vida es de cuatro semanas, y se cuenta con una amplia colección de mutantes en la mayoría de sus genes (Meyerowitz, 2001). Esto ha permitido que se utilice en estudios de complementación genética mediante la cual se busca restablecer un fenotipo en la planta mutante con la incorporación de genes exógenos que cumplan o sustituyan la función del gen faltante. Esta manera de evaluar la función de proteínas mediante complementación se ha aplicado bastante en *A. thaliana* y se puede utilizar para investigar la función de proteínas de especies que no pueden ser transformadas fácilmente y que tienen ciclos de vida más largos.

Este trabajo tiene como objetivo obtener vectores binarios con el gen de *CLV2* de mango (*MiCLV2*) por medio de técnicas de biología molecular, y estandarizar los métodos para la obtención de al menos una mutante *clv2* de *Arabidopsis thaliana* complementada con dicho gen.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

II.1 Los Meristemos Apicales como Puntos Clave en el Desarrollo de la Planta

Durante el crecimiento de las plantas es necesario el desarrollo de las hojas primordias o cotiledóneas, el cual es dirigido por un conjunto de células madre. A este conjunto de células se les llama meristemos y se localizan en la punta del inicio del crecimiento del tallo de las plantas. Estas células son pequeñas, pluripotentes, isodiamétricas, poco diferenciadas y poseen una pared primaria delgada. Además, tienen proplastidios, abundantes vacuolas de menor tamaño y un núcleo grande (Long y Barton, 2000). A pesar de que son un grupo de células, tienen un nivel de organización que varía dependiendo de su localización. Esta organización empieza desde la zona central en donde surge el nacimiento celular y se van especializando cuando se dirigen hacia la zona periférica, zona de costilla o a la zona de órganos primordios (Figura 1). Además los meristemos cuentan con un centro de organización y mantenimiento de células para el mantenimiento del meristemo (Gailochet et al., 2015).

El control de la proliferación celular en los meristemos apicales es un proceso regulado, ya que además de suministrar células, debe de mantener el tamaño ideal en su estructura meristemática. La progenie de células meristemáticas diferenciadas va formando los meristemos especializados en el desarrollo de las hojas, flores y la formación de tallos de la planta (Yadav et al., 2014). Es por ello que existen mecanismos de mantenimiento del tamaño

del meristemo el cual se da entre la zona central (CZ) y el centro de organización (OC). La proliferación de los meristemos se puede regular mediante la acción antagónica del factor de transcripción WUSHEL (WUS), y otros tres mecanismos: receptor ERECTA, el miRNA166 y péptido CLV3 (Mandel et al., 2014). Este último es parte de la familia CLAVATA que pertenece a los receptores tipo cinasas (RLK, por sus siglas en inglés), los miembros de esta familia son parte importante en el mecanismo de control de los meristemos apicales (Gailochet et al., 2015).

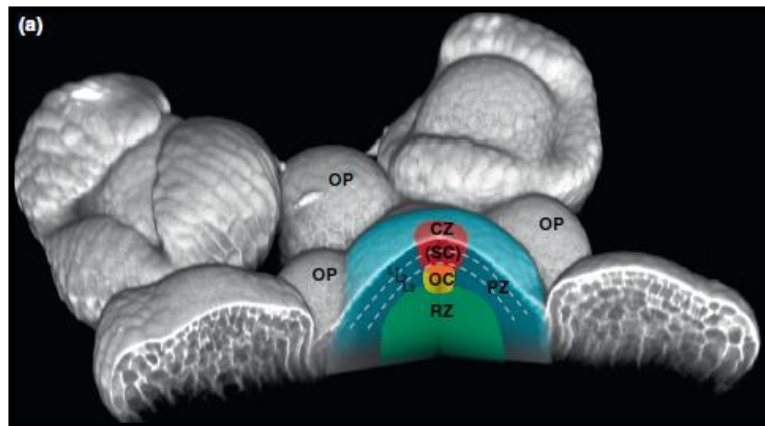


Figura 1: Estructura y divisiones de los meristemos de inflorescencia de *Arabidopsis thaliana*. CZ: zona central, OC: centro organizador, SC: proliferación celular y PZ: zona periférica. Tomado de Gailochet et al., 2015.

II.2. Los Receptores CLAVATA y su Función en el Desarrollo de las Plantas

Las poblaciones de células no diferenciadas en las yemas meristemáticas apicales se mantienen por la ruta de señalización CLAVATA, la cual consiste de un péptido señal secretado, CLV3, y los receptores CLV1, CORYNE (CRN), y CLV2 (Clark et al., 1996; Clark et al., 1997; Kayes y Clark, 1998). El receptor CLV1, se caracterizó mediante mutantes de *clv1* en *A. thaliana*, en donde las plantas mutantes presentaban un alargamiento de brotes

y de meristemos foliares, además de proliferación celular excesiva en los diferentes órganos. Éste receptor actúa como mediador en la diferenciación y como represor en la división de las células meristemáticas. La proteína CLV1 posee un dominio receptor rico en leucinas (Leucine-rich repeat) y se encuentra en la familia LRR I (Clark et al., 1997). Además, se conoce que interacciona con varios receptores, los cuales participan en la ruta de señalización.

Los receptores CLV2, CLV1, y el péptido señal CLV3, conforman la ruta de señalización CLAVATA. Se ha encontrado que CLV2 posee dominios de receptor tipo proteína (RLP) y LRR los cuales se encuentran regulando la diferenciación de las células en los meristemos apicales de la planta (Wang et al., 2010). Este receptor forma heterodímeros con CLV1, y detecta las señales extracelulares; además, participa junto con otros RLK en el desarrollo de órganos como pedúnculos y gineceos. La formación del heterodímero está dada por un enlace disulfuro entre cisteínas conservadas dentro del dominio LRR, que se encuentran en las regiones LRR5–LRR17 de los receptores CLAVATA (Jeong et al., 1999; Wang et al., 2010). El receptor CLV2 al interactuar con CLV1 y CLV3 participa en la regulación del desarrollo de meristemos, mientras que por sí solo tiene función en la diferenciación celular (Kayes y Clark, 1998). Por otra parte CLV3, además de unirse a CLV2 y CLV1, presenta otras funciones como regulador durante el desarrollo de los meristemos.

La proteína CLV3 es una glicoproteína de 13 aminoácidos que es secretada y actúa como péptido señal, modulando el equilibrio en la proliferación de células de tallo, junto con CLV1 (Ogawa et al., 2008; Shiu y Bleecker, 2001; Brand et al., 2000). Evidencia de la interacción entre CLV1 y CLV3, se obtuvo al observar que sus mutantes individuales presentan el mismo fenotipo en *Arabidopsis*, y estos están involucrados como reguladores negativos de SAM (meristemos de los brotes apicales) (Jeong et al., 1999; Trotochaud et al., 2000; Brand et al., 2000). Pero para la interacción se requiere CLV2, ya que

forma parte del complejo para la ruta de señalización (Shiu y Bleecker, 2001), por lo que existen al menos tres proteínas involucradas en el complejo de recepción y transmisión de señales que se encuentra en la membrana plasmática.

Dentro de la ruta de señalización de CLAVATA participan otros miembros como WUSHEL (WUS), CORYNE (CRN), una fosfatasa asociada a proteína cinasa (KAPP, por sus siglas en inglés) y *RhoGTPasa*, que hasta el momento se conocen como parte de complejo de 450 kDa (Jeong et al, 1999; Shiu y Bleecker, 2001). Existe una regulación entre KAPP y CLV1, en donde KAPP actúa como regulador negativo para CLV1, mediante la señalización por fosforilaciones (McSteen y Haeke, 1998). WUS por su parte, es un factor de transcripción que promueve la división celular en las células meristemales de los tallos. En la región central de los meristemas; sin embargo, su expresión es limitada por las señales de CLV3 (Brand et al., 2000; Trotochaud et al., 2000; Gish et al., 2013). Los receptores CRN poseen un dominio extracelular pequeño, un dominio transmembranal y el dominio cinasa citoplasmático, además de una región señal de aproximadamente 33 aminoácidos (Bleckmann et al., 2010). Todas ellas forman el complejo de respuesta a estímulos o de comunicación célula-célula (Figura 2).

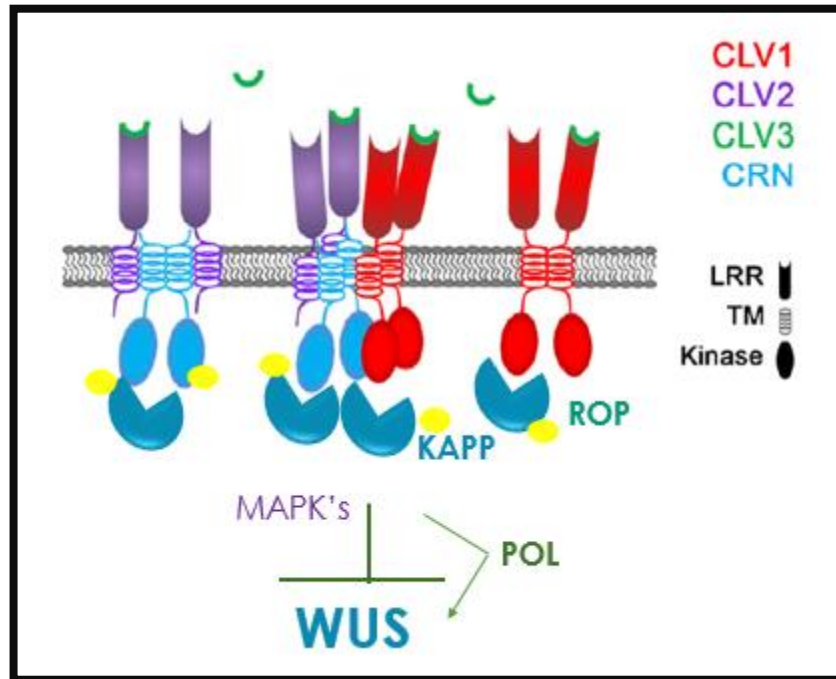


Figura 2: Mecanismo de acción de la familia CLAVATA en la zona central de los meristemos apicales (Stahl y Simon, 2010).

La relación que existe entre el complejo de estos receptores depende en primera instancia del estado en el que se encuentren las plantas. Como se mencionó anteriormente, el complejo CLV1/CLV3 se une a CLV2 cuando se está regulando el desarrollo del meristemo (Kayes y Clark, 1998). Si se tiene una señal baja de CLV3, entonces se activa la expresión de *WUS*, por lo que actúa positivamente en la proliferación celular, y así CLV3 pueda activar a los receptores CLV1 y CLV2 para la señalización (Brand et al., 2000; Kayes y Clark, 1998; Shiu y Bleecker, 2001). Por otra parte, CLV2 se encuentra interactuando paralelamente con CRN mediante sus dominios transmembranales, y coexisten junto al homodímero de CLV1 en la membrana plasmática de las células de los meristemos (Bleckmann et al., 2010; Wang et al., 2010). En estos estudios se evaluó la funcionalidad de estos receptores en meristemos apicales, la cual es una forma de respuesta ante la proliferación celular mediante receptores tipo cinasas.

En el desarrollo de las plantas se da la morfogénesis y la diferenciación. Un ejemplo de la diferenciación es la de los meristemos apicales en la floración. En estudios con mutantes *clv2* de *A. thaliana* se observó que existe un aumento de los pedicelos en las floraciones, así como en el gineceo, por lo que CLV2 actúa en la diferenciación de estos órganos florales (Kayes y Clark, 1998). Estos estudios presentan evidencia de que toda célula en cualquier momento de su desarrollo pudiera poseer receptores de membrana como los RLKs. De igual manera, durante la floración, fecundación y embriogénesis se encuentran involucrados en este tipo de señalización; sin embargo, el conocimiento en esta área aún es muy escaso. Para entender las funciones de los integrantes de la ruta de señalización CLAVATA, se realizan estudios con mutantes en esos genes, pero también se pueden realizar estudios de complementación génica para dilucidar su función.

II.3 Vectores Binarios para la Transformación de Plantas Mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Para la realización de la complementación génica, mutagénesis, funcionalidad e interacciones de proteínas, se han desarrollado técnicas para lograr la introducción de genes a plantas, tanto a monocotiledóneas como dicotiledóneas. Estos estudios han aumentado debido al interés de investigar la función de proteínas de plantas de interés como modelos de estudio o de interés comercial, como *A. thaliana*, arroz, tomate, entre otros. Los vectores binarios son plásmidos que se encuentran en la bacteria *A. tumefaciens*, y están de la mano con el plásmido Ti. *A. tumefaciens* en su forma nativa, genera la maquinaria necesaria para introducir genes de opinas al genoma de la planta y utilizarla como generadora de alimento (opinas), causando la producción de tumores en las plantas (Karimi et al., 2002; Curtis y Grossniklaus, 2003).

La maquinaria utilizada para la integración del material genético se encuentra en los plásmidos Ti, mientras que en el vector binario contiene el material génico a integrar, este es denominado T-DNA. Esta región posee dos extremos de 25 pb, con los que se detecta y se recombina en el genoma de la planta. En vectores comerciales, estas regiones son derivados del plásmido pTiT371 de la nopalina, en su uso comercial. Dentro de estos extremos se coloca el casete que se quiere integrar al genoma de la planta. El casete que se va integrar se diseña y se construye dependiendo del objetivo, por ejemplo: si se desea sobreexpresar, se necesita un promotor, la región codificante y el terminador; si se desea fusionar el gen de interés con el de la proteína verde fluorescente se inserta entre el gen y el terminador. La obtención de los vectores binarios es laboriosa, por lo que se buscan nuevos métodos que faciliten la construcción de estos vectores (Karimi et al., 2013; Karimi et al., 2007).

Una de los sistemas disponibles más utilizado es el GATEWAY®, el cual tiene como objetivo minimizar los cortes con enzimas de restricción en el momento de construir el vector binario. El sistema posee regiones de recombinación denominadas *att*, que son homólogas entre el vector destino y el vector donador, siendo el último el que transfiere el gen de interés al vector destino (Vector binario). Una forma de selección es que el vector destino posea un gen *ccdB*, el cual es tóxico para las cepas comerciales de *E.coli*. Este gen codifica para una proteína que inhibe a la DNA girasa, por lo que no se realiza la replicación en la bacteria de *E.coli*. Una de las características de este sistema es que tiene la capacidad de replicarse tanto en *E.coli* como en *A. tumefaciens*, ampliando su utilización (Nakagawa et al., 2009; Karimi et al., 2007)

Este sistema se ha utilizado para construir vectores binarios para transformar monocotiledóneas (cereales), dicotiledóneas (*Arabidopsis*, tabaco, tomate, entre otras) y en levaduras. En la mayoría de los trabajos revisados, se ha utilizado este sistema en la creación de vectores para la mutagénesis,

complementación génica y funcionalidad de proteínas; así mismo co-localización, interacción proteína-proteína entre otras funciones (Alberti et al., 2007; Curtis y Grossniklaus, 2003).

II.4. Estudios de Complementación Genética para Evaluar Funcionalidad de Proteínas

Una de las técnicas aplicadas para conocer la funcionalidad de genes de interés, es la complementación genética. Esto es posible ya que en una mutante de dicho gen o una especie que no lo posea, se le incorpora el gen de interés en un vector y con él se transforma la planta, expresándose posteriormente en ésta. Se han desarrollado estudios de complementación genética en varios organismos o células, por ejemplo el estudio de Laiho y colaboradores (1991), en donde utilizaron células mutantes somáticas de hígado para conocer la función de un factor β de crecimiento. En otro estudio de complementación se incorporó el gen para la chalcona isomerasa (CHI), encargada de la síntesis de flavonoles a una planta transgénica de tabaco. El fenotipo observado fue una disminución de antocianinas y además observaron un incremento de flavonoles en las flores, cumpliendo el gen con su función (Zhou et al., 2014). Así mismo, los estudios de complementación ocurren generalmente en *Arabidopsis*, sin embargo, también se han hecho en otros organismos como levaduras u otras plantas.

Por otra parte en un estudio de *A. thaliana* en donde vieron la función del gen *SOS1*, observaron que este gen se encuentra involucrado en la homeostasis de Na y K. Los autores utilizaron una mutante *sos1-1* de *A. thaliana*, la cual no expresaba el gen de *SOS1*, así que al incorporar el vector 35S-SOS1:sos1-1 por medio de *A. tumefaciens*, se pudo complementar la mutante. El resultado fue que la mutante complementada con 35S-SOS1:sos1-1

obtuvo un fenotipo igual al de las plantas silvestres, siendo satisfactoriamente recuperada (Shi et al., 2000). En otro estudio se observó la actividad de la Glutathione S Transferasa (GST) de ciclamen como acarreadora de antocianinas en *A. thaliana* mediante la complementación. El fenotipo resultante fue la acumulación de antocianinas en los brotes de *A. thaliana*, cumpliendo la función acarreadora de antocianinas propia de la GST (Kitamura et al., 2012). Así mismo se han realizado estudios relacionados con la función de los receptores de membrana tipo cinasas, también en la planta modelo de estudio *A. thaliana* (Durbak y Tax, 2011; Wang et al., 2010).

En estudios de complementación generalmente se utilizan mutantes de *Arabidopsis*, de las cuales existen un gran número de mutantes para los estudios de proteínas. Es por eso que se cuenta con una diversidad de mutantes para los receptores tipo cinasas, por lo que existen mutantes de la familia CLAVATA, con los que han demostrado su funcionalidad en el crecimiento y desarrollo de los meristemas. Por ejemplo, en el 2010 Wang y colaboradores estudiaron la funcionalidad de CLAVATA2 (CLV2) al restablecer la mutante de *clv2* en *Arabidopsis*, mediante la complementación del gen de *CLV2*. En este estudio observaron que la mutante poseía numerosos frutos, restableciéndose el fenotipo y presentando aproximadamente cuatro frutos, como correspondería a la silvestre. Por lo anterior, se concluyó que *CLV2* está involucrada en el desarrollo y formación de frutos de *A. thaliana*.

En otro estudio sobre el desarrollo de la flor y frutos en *A. thaliana*, con diversas mutantes de la familia CLAVATA, se observaron diferencias con las plantas silvestres (Durbak y Tax, 2011). Las mutantes del receptor *CLV2*, denominadas *clv2-2*, *clv2-7* y *clv2-8*, poseen diversas mutaciones, como inserciones de T-DNA (*clv2-7*) y un cambio de aminoácido (*clv2-8* y *clv2-2*) (Figura 3). Estas mutantes se caracterizan por un fenotipo débil a intermedio, ya que solamente presentan un mayor número de órganos frutales. Así mismo

observaron que las mutantes formaban mayor número de carpelos, por lo que se observó una malformación en los frutos de *A. thaliana*

Por otra lado, en una mutante *clv2-1* de *A. thaliana* cultivar Lansberg erecta, con la inserción de cDNA al genoma de la secuencia obtenida de *CLV2* de *A.thaliana* (AT1G65380.1), se encontró que el fenotipo mutante se reestableció parcialmente (Bleeckman et al., 2010). En la misma planta complementada se pudieron observar órganos frutales con fenotipo silvestre (rescatado o complementado) y mutante (Bleeckman et al., 2010). Por lo tanto, las mutantes con un número mayor de órganos frutales es ocasionada por la pérdida de la función de *CLV2* además de la pérdida de función de otros miembros de la ruta de señalización CLV (Durbak y Tax, 2011).

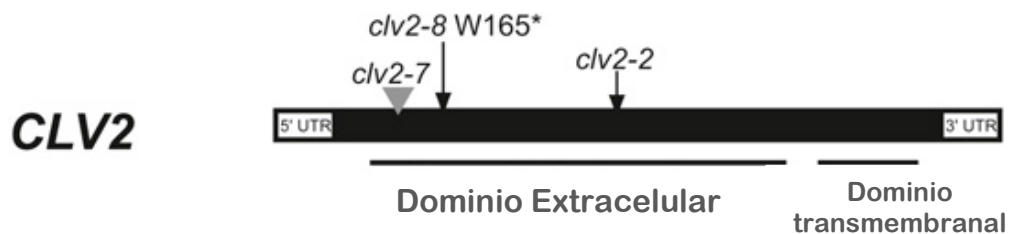


Figura 3. Diagrama de las inserciones y mutaciones de las mutantes *clv2-2*, *clv2-7* y *clv2-8* de *Arabidopsis thaliana*. Flechas negras indican mutaciones puntuales y el triángulo inserciones de T-DNA. Tomado de Durbak y Tax, 2011.

Los estudios anteriores demuestran la importancia de los receptores de la familia CLAVATA en el desarrollo y diferenciación celular de los meristemos, y resaltan la importancia de investigar más al respecto. Con la utilización de la técnica de complementación genética en *A. thaliana*, se podrá determinar si la *CLV2* putativa de mango es funcional y puede desempeñar el papel esperado en la transducción de señales de la ruta CLAVATA en la planta modelo. Por lo

anterior, es importante transformar a *CLV2* de mango en la planta modelo *A. thaliana* para evaluar si el gen de mango rescata el fenotipo en las mutantes *clv2*. Lo anterior confirmaría que el transcrito *CLV2* obtenido de mango (Dautt-Castro et al., 2015) es el ortólogo de *CLV2* de *Arabidopsis*. En mango, es poco factible evaluar experimentalmente la funcionalidad de este gen, ya que su desarrollo requiere un largo periodo de tiempo. Además, un sistema *in vivo* utilizando *A. thaliana* es más factible que la técnica de mutagénesis por su periodo de desarrollo mucho más corto.

III. HIPÓTESIS

Agrobacterium tumefaciens transformado con *CLV2* de mango infecta a la plantas mutantes *clv2* de *Arabidopsis thaliana* para transfectarlas.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Obtener vectores binarios con el gen ortólogo *CLV2* de mango para transformarlo en *Agrobacterium tumefaciens* e infectar plantas mutantes *clv2* de *Arabidopsis thaliana*.

IV.2. Objetivos Específicos

- ✓ Construir vectores binarios por medio de clonación con el cDNA de *CLV2* de mango.
- ✓ Obtener células de *Agrobacterium* transformadas con los vectores binarios.
- ✓ Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes *-clv2*, con *Agrobacterium* transformado y evaluar el fenotipo resultante.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Cultivo de Plantas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestre ecotipo Columbia y WS y mutantes *clv2* (*clv2-3*, *clv2-7* y *clv2-8*), se obtuvieron del laboratorio del Dr. Frans Tax (Depto. MCB, Universidad de Arizona; Durbak y Tax, 2011). Las semillas se mantuvieron en condiciones de desecación y posteriormente se sembraron en macetas con suelo húmedo (aproximadamente 15 semillas por maceta), para la obtención de plantas y semillas de todos los genotipos a utilizar para la transformación. La germinación de las semillas se llevó a cabo mediante una incubación a 4°C por dos días, posteriormente se pasaron las macetas a una cámara de crecimiento a 25°C. Para su crecimiento se aplicó un fotoperiodo de 18 horas luz/ 6 horas oscuridad, y se mantuvieron en la cámara de crecimiento por un periodo de un mes y medio para el desarrollo vegetativo y reproductivo (floración y fructificación). Al término del desarrollo del fruto las plantas se desecaron y se obtuvieron las semillas correspondientes para los procedimientos siguientes (Clough y Bent, 1998).

V.2. Transformación de *Arabidopsis thaliana* con la Región Codificante de *CLV2* de Mango (*MiCLV2*)

Para la obtención de mutantes transformadas fue necesario obtener primeramente la región codificante de mango para poder introducirla dentro de los vectores binarios a utilizar. Estos vectores son los siguientes: pBIB:KAN:GFP:GWR y pBIB:BASTA:35S:GWR, estos fueron donados por el Dr. Frans Tax (Universidad de Arizona). Estos vectores poseen un tamaño de 15150 pb y 13857 pb, respectivamente, además contienen características deseables como sitios de clonación y de recombinación para la construcción y ensamblaje de vectores binarios para la transformación en plantas.

A parte de las características antes mencionada los vectores poseen diferentes características entre ellos, el primero presenta la resistencia al antibiótico Kanamicina y posee la proteína de fusión verde fluorescente (GFP). Mientras que el segundo vector posee resistencia al herbicida BASTA y posee el promotor nativo del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV). Durante el armado del vector binario se utilizaron los siguientes iniciadores específicos para la inserción de *CLV2*, así como para la verificación de la orientación del gen *MiCLV2* (Tabla 1). Para la verificación de los patrones de digestión de los DNA plasmídicos a lo largo de la obtención de las construcciones de los diferentes vectores binarios, se realizaron ensayos *in-silico* en el programa Serial Cloner 2.6.1, en donde se utilizaron las diferentes secuencias de los vectores a utilizar durante las construcciones.

Tabla 1. Iniciadores específicos utilizados en la amplificación y detección de orientación de la secuencia de *clv2* de mango (*MiCLV2*)

Nombre	Iniciador (5' a 3')
MiCLV2XhoI Fw	CTCGAGATGAAACTCAACTGG
MiCLV2XhoI Rv	CTCGAGATTTTTTGTCTGGAGAATG
MiCLVBamHI	CGGGATCCATGAAACTCAACTGG
MiCLV2Sacl	CGAGCTCTCAATTTTTTGTCTGGAG
MiCLV2A2Fw	CTCTCACAGGTTACACCACTC
MiCLV2S2Fw	GCTTCATGGAGTGATTCCAG
GFPRv	CGCACCAGGTAGTTTTCCAG

V.2.1. Clonación de *CLV2* de Mango y Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

V.2.1.1 Clonación de la región codificante de *CLV2* de mango

La región codificante de *CLV2* de mango (*MiCLV2*) se obtuvo mediante PCR convencional con iniciadores específicos, diseñados según la secuencia nucleotídica obtenida en el transcriptoma de mango Kent del laboratorio de Biología Molecular y Genética de Plantas de CIAD (Dautt-Castro et al., 2015). Esta secuencia posee el sitio de restricción para la enzima *XhoI* y carece del codón de terminación en su secuencia (Tabla 1). Se utilizó la mezcla comercial Phusion (R) High-fidelity PCR MMW /HF Buffer 2X (BioLabs), para la amplificación de *MiCLV2* a partir de cDNA de pulpa de mango cv. Kent (Templado). Las condiciones de la amplificación por PCR fueron las siguientes: 98°C por 30 segundos (s) y 30 ciclos de 98°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 2 minutos (min) y una extensión final a 72°C por 7 min (Green y Sambrook, 2012). Las reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (Tris/ ácido bórico /EDTA), y se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (1 µg/ µl, Invitrogen).

El producto amplificado se clonó al vector pGEM (Invitrogen) y se transformó en células competentes *E. coli* Top 10 mediante el método de choque térmico. Las colonias transformantes se cultivaron en medio LB con 100 µg/ml de carbenicilina (100 mg/ml). La extracción de DNA plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina (Green y Sambrook, 2012). Las mediciones de absorbancia para determinar su concentración (a 260 nm) y su grado de pureza (relación 260/280 nm), se realizaron en un espectrofotómetro Epoch (Bio Tek). La secuenciación del producto amplificado se realizó en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) de IPICYT (Instituto Potosino Científico y Tecnológico, en San Luis Potosí, México). Se utilizaron los vectores de expresión pBIB:KAN:GFP:GWR y pBIB:BASTA:35S:GWR se transformaron en células *E. coli* ccdB, estas son células que aportan doble selección. El vector de expresión se obtuvo subclonando el *MiCLV2* en el vector pBIB:KAN:GFP:GWR y pBIB:BASTA:35S:GWR.

V.2.1.2 Construcción del vector binario pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2:GFP:GWR

El gen *MiCLV2* se ligó en pBIB:KAN:GFP:GWR mediante digestiones de los vectores pBIB:KAN:GFP:GWR y el vector pGEM:*MiCLV2* con 20 U de enzima *XhoI* (New England, BioLabs). Para la ligación se utilizaron 10 µg de pBIB:KAN:GFP:GWR, 7.5 µg de pGEM-*MiCLV2*, 3U de DNA ligasa (Roche) y 5 µl de buffer de ligación, en una reacción de volumen total de 10 µl. El constructo pBIB:KAN::*MiCLV2*::GFP:GWR debe contener los siguientes elementos: una región de recombinación, la región codificante de *MiCLV2* junto con la secuencia de la proteína verde fluorescente y el terminador NOS.

Para la identificación de clonas recombinantes que contienen la inserción de *CLV2* de mango se realizó un PCR de colonia con los iniciadores específicos, con las mismas condiciones de amplificación, obteniendo un

fragmento de 2185 pb. Además, para la verificación de la orientación de la inserción de *CLV2* se diseñaron iniciadores específicos para *CLV2* de mango y para la proteína verde fluorescente del vector (Tabla 1). La orientación correcta de *CLV2* insertado se determinó con los iniciadores MiCLV2A2Fw y GFPRv que resulta en un producto de amplificación de 670 pb. Por otra parte, si el *CLV2* se inserta en la orientación incorrecta, usando los iniciadores MiCLV2S2Fw y GFPRv se obtiene un producto de amplificación de 450 pb (Figura 4). Además, se realizaron digestiones con las enzimas *EcoRV* y *Sall*, en donde se obtuvieron diferentes patrones según la dirección de clonación correcta o incorrecta. Se seleccionaron los constructos correctos y se enviaron a secuenciar con los iniciadores MiCLV2A2Fw y GFPRv al laboratorio LANBAMA de IPICYT.

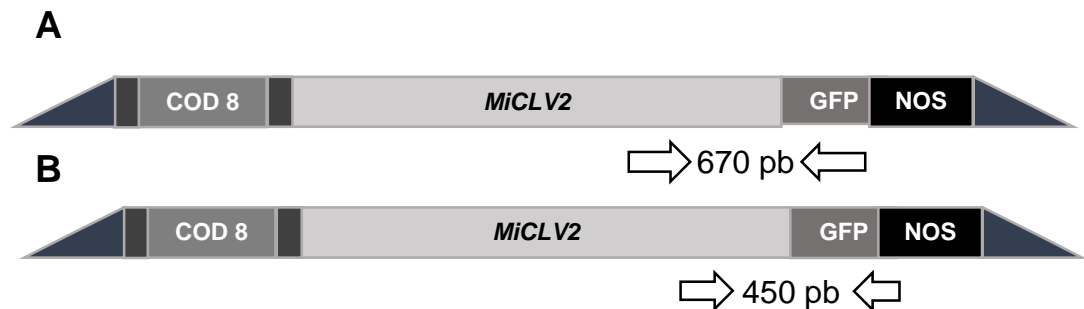


Figura 4. Diagrama de la distribución de iniciadores internos específicos para la verificación de la orientación de *MiCLV2* en el vector binario PBIB:KAN:GFP:GWR . A) *MiCLV2* en orientación correcta y B) *MiCLV2* en orientación incorrecta.

Una vez confirmada la clonación correcta de *MiCLV2* se continuó con la recombinación mediante las regiones *attb1* y *attb2*, para introducir la secuencia nucleotídica del promotor de *CLV2* de *Arabidopsis thaliana* (*pAtCLV2*). La secuencia nucleotídica de *pAtCLV2* se obtuvo del plásmido pCR®8/GW/TOPO (Invitrogen), el cual posee los sitios homólogos para la recombinación (*attL1* y *attL2*). Estos sitios se necesitan para la introducción del *pAtCLV2* al constructo, para ello se utilizó el sistema de GATEWAY® LR Clonase II (Invitrogen).

Para lo anterior, se usaron 150 ng del vector pBIB:KAN:GTW::*MiCLV2*::GFP y 150 ng de pCR8+*pAtCLV2* en una reacción de volumen final de 5 µl; se añadió 1 µl de LR clonase Mix y se dejó incubando toda la noche a 25 °C. Finalmente, al término de la incubación la reacción se trató con 0.5 µl de proteinasa K por 10 min a 37°C. La transformación se realizó en células químicamente competentes (*E. coli* Top10), en donde se agregó 1 µl de la reacción resultante a 50 µl de células competentes y se dejó incubando 30 min en hielo. Al finalizar, se incubó rápidamente 30 s en un termoblock a 42°C y se regresó al hielo. Las células se resuspendieron en 250 µl de medio S.O.C, y se incubaron en agitación a 37° C por una hora. Posteriormente, se sembró y cultivó en placa de agar LB con 50 µg/µl de kanamicina, y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente, se analizaron las cepas por medio de PCR de punto final y aquellas que dieron positivo a la amplificación se les extrajo el DNA plasmídico mediante el protocolo de lisis alcalina. Finalmente se analizó el constructo obtenido pBIB:KAN::*pAtCLV2*:*MiCLV2*:GFP:NOS mediante digestión con 20 U de *Xho*I, y se analizó por electroforesis con gel de agarosa al 0.8%.

V.2.1.3 Construcción del Vector Binario pBIB:BASTA:35S:*MiCLV2*:GWR. Además de la descrita anteriormente, se utilizó otra estrategia de clonación de *MiCLV2* para su transformación en mutantes *clv2* de *A. thaliana*. Para ello, se utilizó la secuencia de *MiCLV2* obtenida por amplificación con los iniciadores *MiCLV2*BamHiFw y *MiCLV2*SacIRv (Tabla 1), que al vector de clonación pCR8/gwr/topo. En la reacción de ligación se usaron las siguientes condiciones: 1.5 U de DNA ligasa, 6 µl de buffer 2X, 0.5 µl del vector pCR8/gwr/topo y 2.5 µl de la amplificación de *MiCLV2* en un volumen final de 12 µl. Se realizó la transformación de *E. coli*, como se describió anteriormente y las colonias resultantes se analizaron por PCR de colonia para verificar la inserción. Así mismo se realizó extracción de DNA plasmídico de las colonias positivas,

para enviar a secuenciar a la Universidad de Arizona (Tucson, AZ, EE.UU). Para la recombinación se utilizaron las mismas condiciones antes mencionadas, solamente que se utilizó el vector pBIB:BASTA:35S:GWR y pCR8+*MiCLV2*. Con ello se obtuvo el vector de transformación pBIB:BASTA:35S::*MiCLV2*::GWR, para su posterior transformación en *Agrobacterium tumefaciens*.

Se realizó la transformación de los constructos pBIB::pAtCLV2:*MiCLV2*::GFP:GWR y pBIB:BASTA:35S::*MiCLV2*::GWR en cepas de *A. tumefaciens* (GV3103) electrocompetentes. Posteriormente se transformaron en células *A. tumefaciens* GV3103 electrocompetentes, con 1.8V, 200 ohms y 25 micro F (Shen, 1996). El resultado de la transformación se incubó en medio SOC por una hora a 30°C en agitación, y finalmente se cultivó en agar LB adicionado con los siguientes antibióticos: carbenicilina(100 µg/ µl) y kanamicina (50 µg/ µl) y se dejó incubándose a 30°C toda la noche por al menos dos días hasta la aparición de colonias. De las colonias obtenidas se extrajo DNA plasmídico para la verificación de transformadas por ensayos de digestión correspondientes a cada constructo. Después, se cultivaron la cepas transformadas de *Agrobacterium* en medio LB adicionado con 100 µg/ µl de carbenicilina y 50 µg/µl de kanamicina para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

V.2.2. Transfección de mutantes -*clv2* de *Arabidopsis* con *Agrobacterium tumefaciens* Transformado con los Constructos Obtenidos

La transformación de *A. thaliana* se realizó mediante el método de gota por gota y por infiltración (Martínez-Trujillo et al., 2004; Clough y Bent, 1998). Las plantas que se transformaron fueron los ecotipos silvestres Wassilewskija.

(WS) y Columbia (col), y las mutantes *clv2-2*, *clv2-7* y *clv2-8*. Cada una se transformó individualmente con las cepas de *A. tumefaciens* (GV3103) transformadas tanto con el constructo pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR como pBIB:BASTA:35S::MiCLV2::GWR, según la técnica descrita por Martínez-Trujillo (2004).

El cultivo independiente de las cepas transformadas de *Agrobacterium* se realizó añadiendo los antibióticos correspondientes: carbenicilina a 100 µg/µl de concentración final y kanamicina a 50 µg/µl, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6 a 0.8. Un punto importante en el crecimiento de *Agrobacterium* es el color de la pastilla bacteriana, ya que si no está de color rosa o salmón, quiere decir que el cultivo se contaminó con alguna otra bacteria. Otra forma para conocer que no se cultiva *Agrobacterium* es el monitoreo de la densidad óptica, si se observa un aumento repentino al poco tiempo es probable que se haya contaminado. Al término del cultivo de *Agrobacterium* se realizó la resuspensión y la transformación de *Arabidopsis*.

Se resuspendió en diferentes medios de infiltración hasta una densidad óptica (600 nm) de 0.8 a 2.0, debido que es necesario una sobrepoblación de biomasa para la activación de la maquinaria de *Agrobacterium*. Los medios de infiltración fueron los siguientes: 0.025% de Tween 20, sacarosa al 5% y 0.5X de MS; el siguiente fue 0.075% de Silwet® L-77 AG, sacarosa al 5% y 0.5X de MS; otro contenía 0.025% de Silwet® L-77 AG y sacarosa al 5%; finalmente, el último tenía sacarosa al 5% y 0.075% de Silwet® L-77 AG. Se colocó una gota de co-cultivo de *Agrobacterium* en los primeros brotes florales de las plantas de *Arabidopsis*, que corresponde a una planta de 5 cm de longitud. Las plantas se cubrieron con plástico y se dejaron en un ambiente de oscuridad por 10 horas. Se retiró el plástico al término del periodo y se mantuvieron en fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, para completar su desarrollo. Las plantas se desecaron y se cosecharon las semillas para su almacenamiento.

V.3 Selección de Semillas Transformadas para los Dos Vectores Binarios

V.3.1 Selección de Semillas Transformadas con el Vector Binario

pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR

Las semillas de las plantas que fueron transformadas se colectaron, y se esterilizaron con lavados de etanol al 95% por tres minutos y cloro al 25% durante siete minutos, con lavados intermedios de agua bi-destilada estéril de tres minutos. Posteriormente, se colocaron las semillas en placas de agar MS con 3% de sacarosa sin y con kanamicina (50 µg/ml) (Barik, 2013; Clough y Bent, 1998). Posteriormente, se realizó el proceso de estratificación para la germinación de la semilla, para ello se incubaron las placas por dos días en refrigeración (4°C). Finalmente, las placas se trasladaron a una cámara bioclimática con un fotoperiodo de luz/oscuridad (16h/8h, respectivamente), para la germinación y desarrollo de las semillas. Aquellas que germinaron fueron aclimatadas en macetas con peat-moss® cubiertas con plástico

Por otra parte, en colaboración con el Laboratorio de Fitomejoramiento Vegetal del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Región Guasave, Sinaloa (CIIDIR) a cargo del Dr. Francisco Quiroz se realizaron análisis de microscopía confocal de los germinados. Se analizaron dos líneas mutantes transformadas (clv2-8 y clv2-7) y semillas de *Arabidopsis* silvestre Columbia, DR5:GFP y DII:Venus, como controles negativo y positivo.

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X para las observaciones, con una longitud de excitación de 480 nm. La línea de visualización de fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) fue de 496-540 nm y para la fluorescencia roja para la visualización de la clorofila de 640-700 nm. Mediante esta técnica se confirmó la transformación de *Arabidopsis* porque la construcción A, tiene a la proteína verde fluorescente fusionada a la secuencia de *CLV2* de mango. En las semillas de las plantas transformadas se expresa la proteína verde fluorescente.

V.3.2 Selección de Semillas Transformadas con el Vector Binario

pBIB:BASTA:35S::MiCLV2::GWR

Las semillas colectadas de las plantas transformadas con el vector binario pBIB:BASTA:35S::MiCLV2::GWR se sembraron en macetas con peat-moss[®] y se incubaron a 4°C por dos días para inactivar la estratificación y que se active la germinación de las semillas. Al término de este periodo las macetas se trasladaron a la cámara bioclimática a 25°C, con 50-70% de humedad y un fotoperiodo de 18h luz / 8 h oscuridad. Se dejaron desarrollarse hasta los 8 días o al inicio de la aparición del segundo par de hojas verdaderas para el ensayo de resistencia al herbicida BASTA[®] (200g/L). Las plantas se rociaron con una dilución de 1:1000 (concentración final 0.2 g/L) partiendo del stock comercial del herbicida. Este proceso se repitió una vez después de dos días de la primer rociada. Finalmente las plantas se mantuvieron en un ambiente controlado para su desarrollo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Construcción de los Vectores Binarios para la Transformación de Plantas Silvestres y Mutantes *-clv2* de *Arabidopsis thaliana*

Para la complementación génica de las mutantes *-clv2* en *A. thaliana*, es necesario la construcción de un vector T-DNA que contenga la secuencia del gen de interés. La secuencia nucleotídica de la región codificante de *CLV2* de mango se clonó en el vector binario pBIB:KAN:GFP:GWR y en el pBIB:BASTA:35S:GWR (Figura 5). Así mismo, existen diferencias entre ellos debido a que el vector pBIB:BASTA:35S:GWR, posee el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, mientras que pBIB:KAN:GWR:GFP no posee un promotor por lo que es necesario insertarle uno (Karimi *et al.*, 2002)

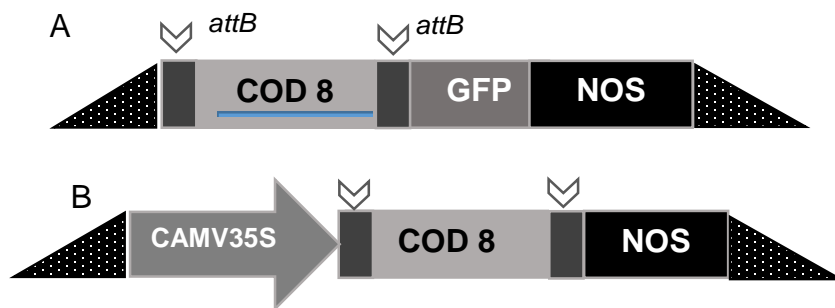


Figura 5: Diagrama de los vectores binarios. A) pBIB:KAN:GWR:GFP, B) pBIB:35S:BASTA:GWR

VI.1.1. Obtención del Vector Binario pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR con la Secuencia MiCLV2

La secuencia de *CLV2* de mango (*MiCLV2*), tiene un ORF de 2175 pb y codifica para una proteína deducida de 724 aa. Analizando la secuencia de *CLV2* en comparación con la de *A. thaliana* (GenBank AAF02655.1), mostró una cobertura del 95%, una identidad de 63% y una similitud de 77% (anexo 1). Se obtuvo la amplificación de *MiCLV2* a partir del cDNA de pulpa de mango, la banda obtenida de >2000 pb correspondiente al tamaño esperado 2175 pb (Figura 6), Posteriormente, se ligó la secuencia de *MiCLV2* en el vector de clonación pGEM, en donde se obtuvieron clonas positivas. Los constructos fueron analizados por secuenciación, para confirmar la secuencia nucleotídica, así como su posición en el marco de lectura correcto (Anexo 2). Posteriormente se realizó un corte de restricción con *XhoI* para la colonia correcta en el vector pGEM+*MiCLV2* y el vector pBIB:KAN:GFP:GWR, para la ligación y obtención de la inserción de *MiCLV2* en el vector binario (Figura 7). Se analizaron por PCR de punto final las colonias resultantes de la ligación y transformación en *E.coli* (ccdB). Se obtuvieron tres colonias (115, 121 y 212) con una amplificación de 2175 pb (Figura 8).

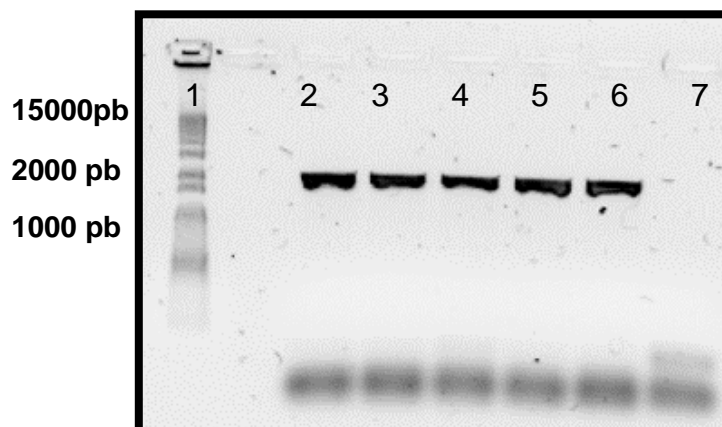


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificaciones de *MiCLV2* obtenidas por PCR, a partir de cDNA de pulpa de mango. Carril 1: marcador de peso molecular 1 KB Plus. Carriles 2-6: Amplificaciones de *MiCLV2*. Carril 7: Control negativo.

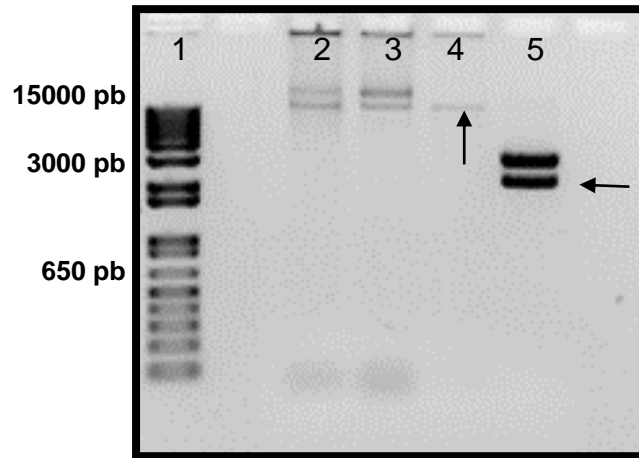


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de los vectores pBIB:KAN:GWR:GFP y pGEM:*MiCLV2* con la enzima de restricción *XhoI*. Carril 1: Marcador de peso molecular, los carriles 2 y 3 corresponden a pBIB:KAN:GWR:GFP sin digerir, el carril 4 corresponde a pBIB:KAN:GWR:GFP digerido y el carril 5 corresponde a pGEM:*MiCLV2* digerido.

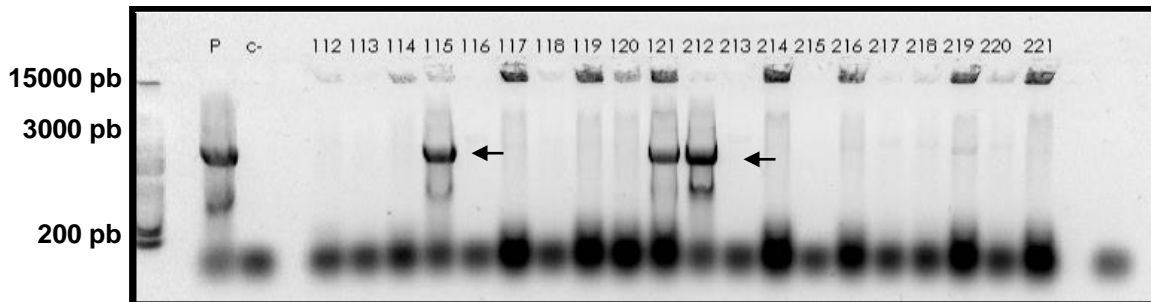


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR de colonia para la detección de clonas recombinantes que contengan *MiCLV2* en el vector binario pBIB:KAN:GFP:GWR. Flechas negras colonias positivas para el gen de *MiCLV2*.

Para confirmar la inserción de *MiCLV2* en el vector pBIB:KAN:GFP:GWR se realizó una digestión con *XhoI* de los DNA plasmídicos obtenidos de las tres colonias recombinantes (115,121 y 212). En la figura 9 se observa un fragmento, producto de la digestión, del tamaño esperado de 2175 pb, que corresponde al tamaño de *MiCLV2*. De esta manera podemos comprobar que

el constructo ya tiene ligada la secuencia de *MiCLV2*. Debido a que se realizó el corte con una sola enzima de restricción, fue necesario realizar ensayos para confirmar la orientación de la inserción en el sentido de la transcripción del gen, en la dirección correcta con respecto al promotor. Para ello se realizaron ensayos de restricción y amplificaciones con iniciadores internos específicos para las dos posibles direcciones del DNA clonado. Utilizando el DNA plasmídico obtenido de las colonias, se amplificó una banda de 670 pb, correspondiente a la orientación correcta, además las muestras no amplificaron con los iniciadores que indicaban la orientación incorrecta, por lo que se confirma la clonación en la orientación correcta. Se utilizó una clona en la orientación incorrecta, como control negativo para las amplificaciones y digestiones (Figura 10).

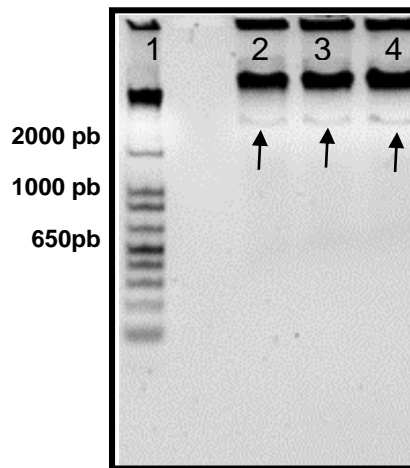


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA plasmídico obtenido de tres colonias recombinantes y digerido con *XhoI*. Carril 1: Marcador de Peso molecular, Carriles 2-4: muestras 115, 121 y 212 digeridas con *XhoI*, respectivamente.

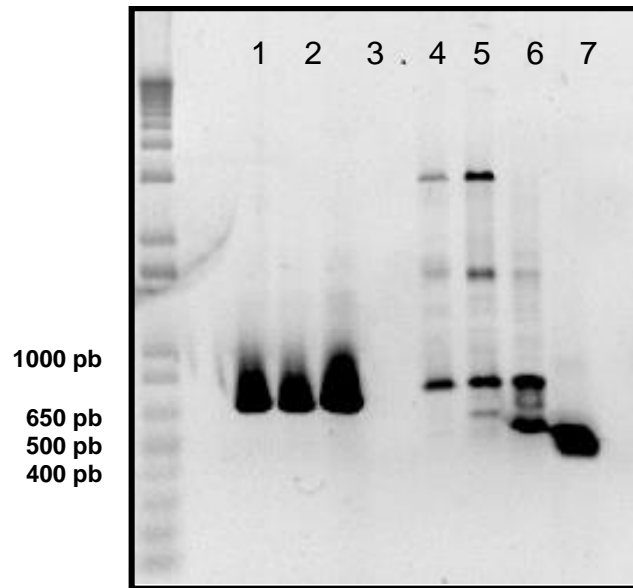


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de verificación de la orientación de la secuencia de *MiCLV2* en el vector binario pBIB:KAN: GFP:GWR. Los carriles 1-3, son las muestras de las colonias 115, 121 y 212 que amplificaron una banda de 670 pb, mientras que los carriles 4-6 no amplificaron la banda 450 pb correspondiente a la orientación incorrecta. El carril 7 corresponde a la colonia 14, es el control negativo de orientación incorrecta, amplifica la banda de 450 pb.

Para verificar la orientación mediante ensayos de restricción se realizaron digestiones dobles con las enzimas *EcoRV* y *Sall*. En un ensayo *in-silico* en el programa Serial Cloner 2.6.1 (Pérez, 2013), se determinó que para la secuencia del vector pBIB:KAN:GFP:GWR/*EcoRV*-*Sall*, se obtendrían fragmentos de los siguientes tamaños: 5020, 2736, 2214, 1801, 1656, 1597 y 126 pb. Para el vector pBIB:KAN::*MiCLV2*::GFP: GWR (*MiCLV2* clonado en la orientación correcta), los fragmentos deben de ser de 5020, 2994, 2736, 1801, 1656, 1597,1403 y 126 pb. Cuando se tiene *MiCLV2* clonado en la orientación incorrecta se obtendrían fragmentos de los tamaños siguientes: 5020, 3358, 2736, 1801, 1656, 1597, 1043 y 126 pb. De los DNA plasmídicos analizados mediante las digestiones dobles, aquellos correspondientes a las colonias 115 y 212 presentaron el patrón de bandas correspondientes a *MiCLV2* clonado en la orientación correcta. También se confirmó que en la colonia de orientación

incorrecta mediante los cortes de restricción. Los DNA plasmídicos de las demás colonias analizadas resultaron ser el vector pBIB:KAN:GFP:GWR sin inserto (Figura 11).

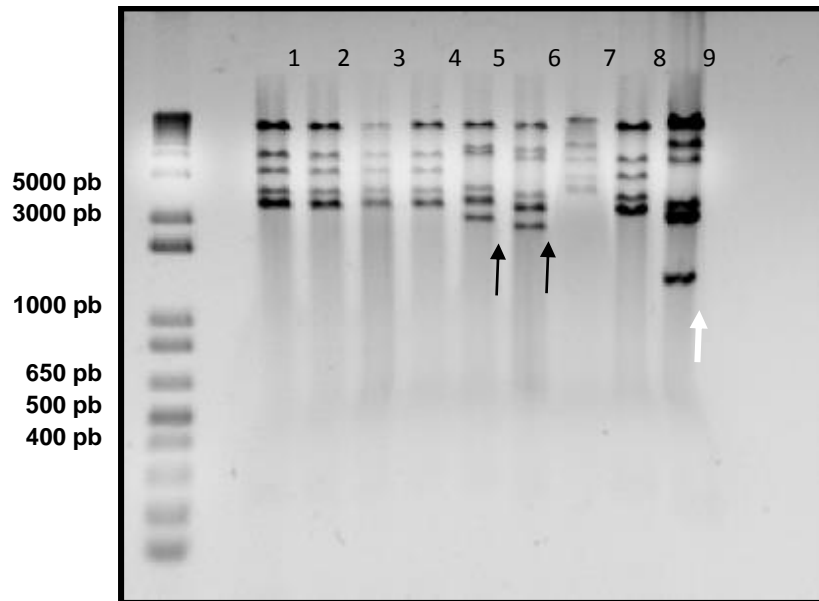


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones dobles con *EcoRV* y *SalI*. El patrón esperado para *MiCLV2* clonado en orientación correcta se obtuvo para las muestras de los carriles 5 y 6 provenientes de las colonias 115 y 212, respectivamente (flecha negra). El carril 9 corresponde a una clona en orientación incorrecta proveniente de la colonia 14 (flecha blanca). El patrón de bandas observados en el resto de los carriles corresponden al vector pBIB:KAN:GFP:GWR sin inserto.

Además de las digestiones dobles para confirmar la dirección de la clonación de *MiCLV2*, se obtuvo la secuencia nucleotídica de las inserciones de las clonas 115 y 212. Las secuencias obtenidas en la secuenciación confirmaron que las clonas tenían a *MiCLV2* insertado en la orientación correcta. Se utilizó el algoritmo BLASTX (Altschul et al., 1990) para el análisis de las secuencias. De esta manera se obtuvo la construcción parcial del vector (faltando insertarle

el promotor que dirija la transcripción), nombrándolo pBIB:KAN::*MiCLV2*::GWR:GFP, y en la figura 12 se muestra un esquema de ello. Para obtener el constructo completo para el siguiente paso, se tomó el DNA plasmídico obtenido de la clona 212 para mediante recombinación homóloga clonarle el promotor nativo de *CLV2* de *A. thaliana*.



Figura 12 : Diagrama pBIB:KAN::*MiCLV2*:GFP:GWR producto de la ligación de *MiCLV2* en el vector binario pBIB:KAN:GWR:GFP.

Se obtuvo la recombinación del promotor nativo al constructo de pBIB:KAN::*MiCLV2*:GFP:GWR y de las colonias transformadas se preparó el DNA plasmídico. Al digerir los plásmidos de las colonias recombinantes con *XhoI* se obtuvieron los fragmentos de 14106, 2178 y 646 pb esperados (Figura 13). De esta manera se confirma la recombinación de la secuencia del promotor nativo de *CLV2* en el vector pBIB:KAN::*MiCLV2*::GFP:GWR, obteniéndose el vector binario completo mostrado en la figura 14.

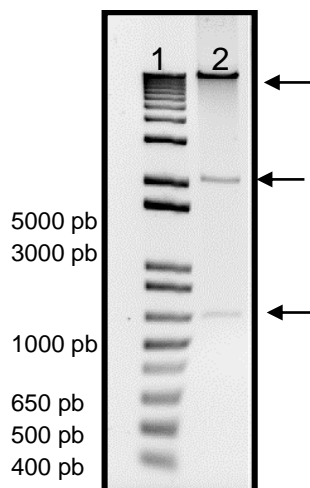


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión de pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR con la enzima *XhoI*. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Muestra digerida con la enzima *XhoI*.



Figura 14: Diagrama de pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR obtenido mediante recombinación para insertar el promotor nativo de *CLV2* en *Arabidopsis thaliana*, en el vector binario pBIB:KAN::MiCLV2:GFP:GWR.

VI.1.2. Clonación de MiCLV2 en el Vector Binario pBIB:BASTA:35S:GWR

Para la construcción del segundo vector binario conteniendo el promotor 35S del virus de la coliflor (CaMV), se ligó la secuencia de *MiCLV2* en el vector de clonación pCR8/TOPO/GWR. La clona recombinante se identificó mediante PCR de colonia con iniciadores específicos (Figura 15, línea 9), y se confirmó la orientación del inserto por secuenciación y análisis de alineamiento. Posteriormente se realizó un ensayo de recombinación con el vector PBIB:BASTA:35S:GWR y el vector pCR8+MiCLV2, anteriormente obtenido.

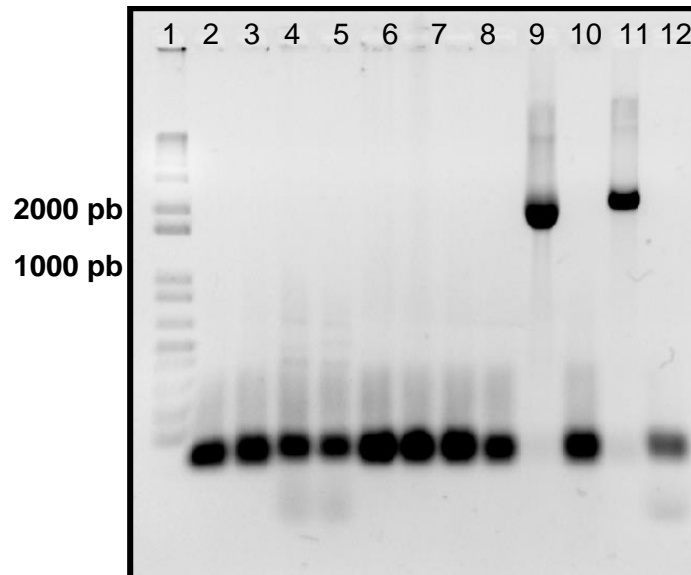


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de colonia para identificar clones recombinantes de *MiCLV2* en pCR8/TOPO/GWR. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus, 2-9 muestras analizadas por PCR de colonia, el carril 9 corresponde a la colonia positiva para la amplificación de *MiCLV2*. El carril 11 es el control positivo y el carril 12 el control negativo.

El producto de la recombinación de los dos vectores anteriormente mencionados se obtuvo 22 colonias, a las que se les realizó un PCR de punto final con los iniciadores específicos (Tabla1). Esta ligación se transformó en células *E.coli* Top10, como método de selección para la recombinación, es decir si la recombinación fue exitosa se tendrán bacterias sobrevivientes con el vector, de lo contrario el vector no es capaz de mantener la células viables. De las 22 colonias obtenidas solo 18 clonas amplificaron para la secuencia de *MiCLV2*, de estas colonias solamente se tomaron las colonias 11 y 12 para la extracción de DNA plasmídico y estudios posteriores (Figura 16). Posteriormente, se realizó un ensayo de digestión con la enzima *EcoRI*, que mapea en el vector y en la secuencia de *MiCLV2* obteniendo tamaños de 17,380, 2207, 303 y 170 pb, se observan las tres bandas, pero la banda de 170 pb no se alcanza a visualizar por ser tan pequeña (Figura 17). Mediante estos ensayos se identificaron las colonias positivas, así mismo la dirección de

clonación. En la figura 18 se observa el vector obtenido: pBIB: BASTA::35S::MiCLV2::GWR.

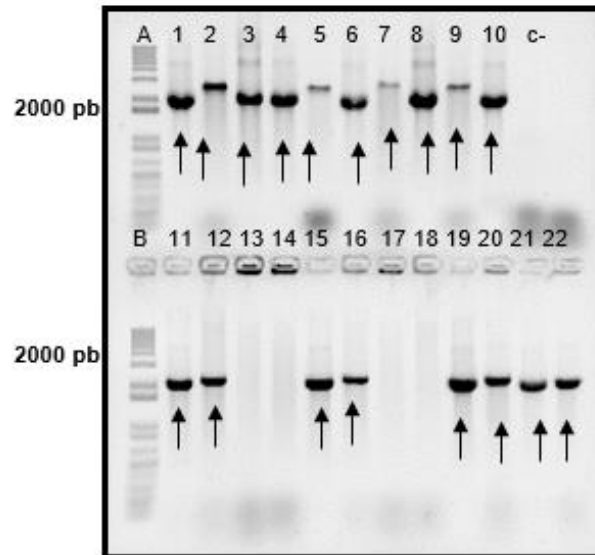


Figura 16: Análisis electroforético de PCR de colonia para el constructo pBIB: BASTA::35S::MiCLV2::GWR. A y B: Marcadores de peso molecular, Carriles 1-22, muestras de colonias bacterianas para el gen de *MiCLV2*. Flecha negra colonias positivas.

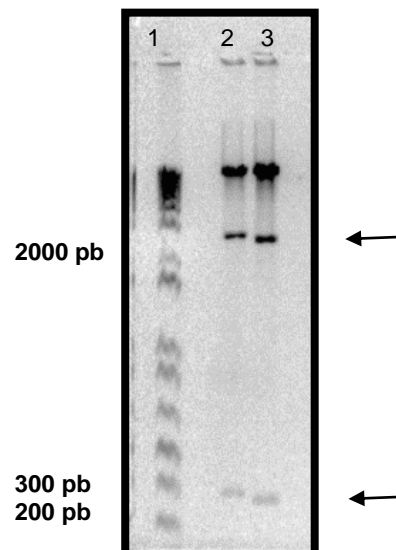


Figura 17. Análisis electroforético del ensayo de digestión con las enzimas *EcoRI*. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 1 y 2: Muestra 11 y 12 digerida con la enzima *EcoRI*.



Figura 18: Diagrama de pBIB: BASTA::35S::MiCLV2::GWR la recombinación de MiCLV2 en el vector binario pBIB:BASTA:35S:GWR

En este vector se dará una expresión constitutiva del gen de *MiCLV2* en la planta de *A. thaliana*, por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La secuencia de *CLV2* de mango se encontrará en una expresión continua, en *Arabidopsis*. Este promotor podrá generar un fenotipo fuerte en comparación con la expresión del promotor nativo de *CLV2* de *Arabidopsis* que se mantendrá regulado dependiendo de la inducción o represión del gen. El promotor 35S es uno de los más usados en genes que se van a transformar en plantas, debido a que se ha observado que su expresión es constitutiva y se mantiene en cualquier especie de planta. Es por ello que la utilización de este promotor permita una expresión del fenotipo más fuerte contrarrestando con el fenotipo de las mutantes (Mitsuhara et al., 1996).

VI.2. Transformación de los dos vectores Binarios T-DNA en de *A. tumefaciens* (GV3103)

Al confirmar que se obtuvieron los dos vectores binarios en las cepas de *E. coli*, se pasó a transformarlos en *A. tumefaciens* GV3103, por medio de electroporación. El DNA plasmídico de los vectores, pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR (A) y pBIB:35S::MiCLV2:BASTA:GWR

(B) se transformó y de las colonias que crecieron se preparó DNA plasmídico y éste se utilizó en reacciones de PCR y en reacciones de digestión.

Los DNA plasmídicos obtenidos de colonias de *Agrobacterium* transformadas, se utilizaron para amplificar la secuencia de *MiCLV2* de los constructos mediante de PCR de punto final y en la Figura 19, se observa la amplificación de la secuencia de *MiCLV2* clonada en cada vector (panel A y B). Las reacciones de digestión con las enzimas *XhoI* y *PstI* del vector pBIB:KAN::pAtCLV2:*MiCLV2*::GFP:GWR se muestran en la Figura 20, donde se observa que la cepa A4 es la correcta, ya que la A5 no presentó cortes con dichas enzimas. Por otra parte, A4 presenta las bandas correspondientes a las obtenidas en el ensayo *in-silico* de tamaños 6706, 6454, 2941 y 829 pb, así mismo se tienen los fragmentos de 14106, 2178 y 646 pb, correspondientes a los cortes por la enzima *XhoI*.

Mientras que para la cepa B se obtuvo la amplificación de 2175 pb correspondiente para *MiCLV2*, confirmando su inserción (Figura 21). Por otra parte el ensayo de restricción con la enzima *EcoRI*, se observó a las cuatro bandas de tamaños esperados de 11,738, 2207, 303 y 170 pb (Figura 20). Se puede observar el patrón esperado para cada una de ellas como en el ensayo *in-silico* de las construcciones realizadas con el programa Serial Cloner. Los ensayos son los mismos realizados para verificar la transformación en la cepa *E.coli*, los resultados confirman que se posee el mismo constructo en las bacterias hospederas de *Agrobacterium*.

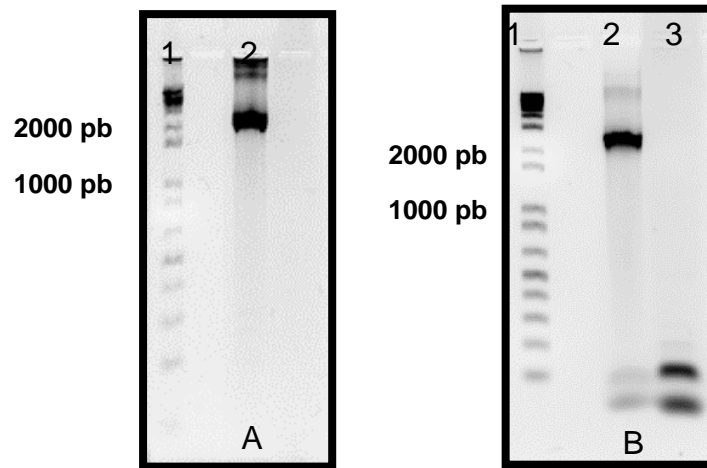


Figura 19: Análisis electroforético de los amplicones de las colonias transformadas de *Agrobacterium* GV3103 con los vectores A) pBIB:KAN::pATCLV2:MiCLV2:GFP:GWR y B) pBIB:BASTA:35S::MiCLV2::GWR. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus, Carril 2: Constructo de pBIB:KAN::pATCLV2:MiCLV2:GFP:GWR ó pBIB:BASTA:35S::MiCLV2:GWR, respectivamente, Carril 3: control negativo.

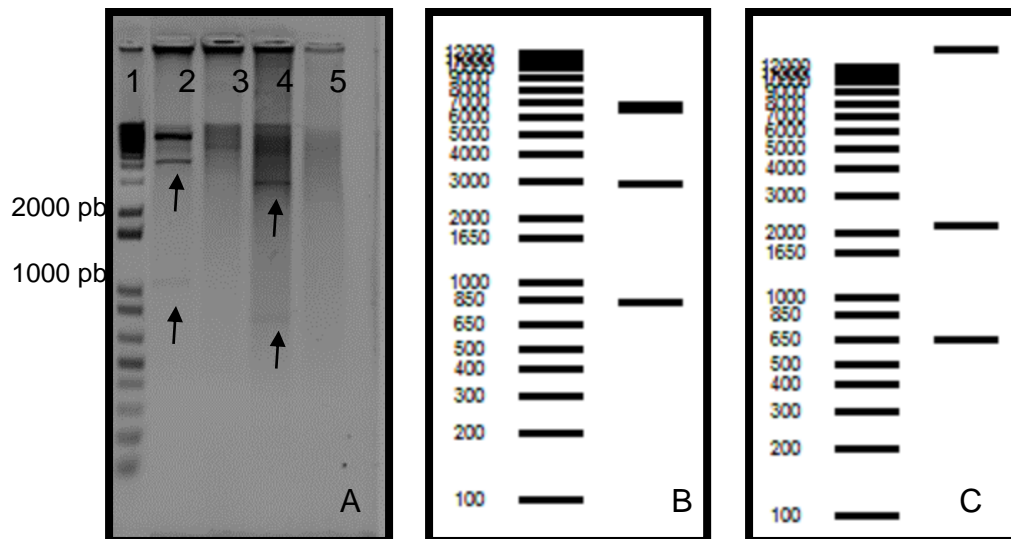


Figura 20: Análisis de ensayo de restricción de DNA plasmídicos con el constructo pBIB:KAN::pATCLV2:MiCLV2:GFP:GWR, utilizando las enzimas *Pst*I y *Xho*I. A) Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus, Carril 2: Digestión con *Pst*I para la muestra A4, Carril 3: Digestión con *Pst*I para la muestra A5, Carril 4: Digestión con *Xho*I para la muestra A4, Carril 5: Digestión con *Xho*I para la muestra A5. B) Ensayo *in-silico* con la enzima de restricción *Pst*I, C) Ensayo *in silico* con la enzima de restricción *Xho*I.

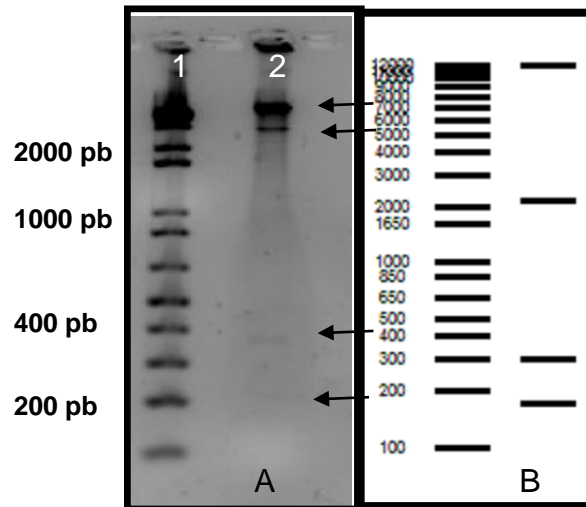


Figura 21: Análisis del ensayo de restricción con la enzima *EcoRI*, de la cepa transformada de *Agrobacterium* GV3103 con el constructo pBIB:BASTA:35S::*MiCLV2*:GWR. A) Electroforesis con la muestra analizada; Carril 1: Marcador de peso molecular , Carril 2: Digestión del vector con la enzima *EcoRI*, B) Ensayo *in-silico* de pBIB:BASTA:35S::*MiCLV2*:GWR.

VI.3. Transformación de *Arabidopsis thaliana* por de *Agrobacterium tumefaciens* Transformado con los Vectores Binarios

En este estudio se ensayaron varios métodos de transformación de las plantas silvestres (WS y Col) y mutantes *clv2* (*clv2-2*, *clv2-7* y *clv2-8*), los cuáles cumplen con requisitos necesarios para la transformación. La mutante *clv2-8*, posee una secuencia trunca debida a la inserción de un codón de alto en lugar del residuo triptófano 185, *clv2-2* posee una mutación puntual y *clv2-7* posee una región insercional en la región 5' UTR (Durbak y Tax, 2011). Las silvestres WS y Col, poseen un desarrollo normal de la roseta, del tallo y de sus órganos frutales. En cambio, la mutante *clv2-8*, es de crecimiento lento, posee un tallo grueso, las hojas de la roseta tienden a ser más gruesas y verdosas, posee un mayor número de órganos frutales en el ápice y a través del tallo, sus frutos son cortos y anchos (Figura 22). A diferencia de *clv2-8*, las dos mutantes

restantes poseen un tallo débil, y un menor número de órganos frutales en comparación con la mutante *clv2-8*.

Los componentes del medio de transformación son básicamente un surfactante y sacarosa; además del cultivo bacteriano transformado con los constructos. Otros estudios muestran que se puede utilizar la solución Murashige y Skoog (MS). Clough y Bent en 1998, realizaron varias combinaciones para obtener una combinación eficiente para la transformación de *Arabidopsis*, entre ellos el uso de Tween 20 y Silwet® L-77 AG (surfactante comercial), diferentes porcentajes de sacarosa y ausencia de ciertos componentes. Ellos confirmaron que el método con alta eficiencia de transformación fue aquel que tenía 5% de sacarosa y 0.02 a 0.1% del surfactante Silwet® L-77 AG, obteniendo porcentajes de transformación de 20 veces más con respecto al porcentaje de 0.0005% de Silweet L77. En este estudio se probaron cuatro tipos de medio de infiltración para conocer el medio con mejor eficiencia de transformación.



Figura 22. Mutante *-clv2-8*, Se observa el número elevado de frutos a través del tallo y en el ápice (Angulo-Sanchez, 2016, este estudio).

Los medios de infiltración fueron probados con el método de gota por gota, con excepción del medio de Sacarosa al 5% que fue sometido una sola vez al método de infiltración de toda la planta. El método de gota por gota consiste en poner una gota (20-50 μ l) en cada una de las yemas de *Arabidopsis* antes de la floración; en cambio con el método de infiltración completa se sumerge toda la planta en estado reproductivo en el cultivo de infiltración con *Agrobacterium* durante 30 segundos (Figura 23). Las plantas que fueron tratadas con el medio de infiltración se dañaron mecánicamente y a los días presentaron necrosis, en cambio con el método de gota por gota en medio sacarosa-Silwet L-77® no presentó necrosis.

Los medios de infiltración mencionados anteriormente se probaron para conocer cuál era el más efectivo para seguir utilizando a lo largo del experimento. De los cinco medios que se probaron, los que dieron mejor resultado fueron los medios con sacarosa y Silwet® L-77 AG, con los dos porcentajes de Silwet® L-77 AG al 0.025 % y 0.075 %, estos medios no causaron necrosis en las yemas como los anteriores, pero si causaron daño en hojas cualinares. Los medios con MS y Tween 20, fueron los que causaron necrosis de las yemas, quizá son muy agresivos para la planta en ese estado de desarrollo. Por otra parte, al utilizar el medio con Tween 20 con MS, las plantas no desarrollaron semillas para cosechar, las vainas se encontraban semi-desarrolladas sin semillas en el interior. Este resultado fue decisivo para descartar estos medios y seguir trabajando con aquellas que no dañaron a la planta gravemente.



Figura 23: Método de gota por gota con el medio de infiltración 5% de sacarosa y 0.025% de Silwet L-77® para transfectar mutantes *-clv2* de *Arabidopsis*.

VI.4. Crecimiento y Análisis de Semillas Transformadas con el pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2:GFP:GWR

El vector pBIB:KAN::pAtCLV2:MiCLV2:GFP:GWR, posee la resistencia a kanamicina y se realizaron ensayos de germinación de semillas transformadas (F0) en medio de MS con dicho antibiótico. Se utilizaron concentraciones de 0, 25, 50, 100, 125 µg/ml de Kanamicina, con un total de 1012 semillas analizadas para la línea mutante transformada y 753 semillas para la silvestre. Se sembró una línea transformada de *Arabidopsis* (*clv2-8* transformada) y *Arabidopsis* ecotipo Wassilewskija (WS, silvestre). Primeramente se desinfectaron las semillas y se sembraron en placas con antibiótico y se dejaron

incubando por dos días a 4°C para que estratificaran. Al término del periodo se pasaron a una cámara bioclimática con un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas. Al quinto día se contaron las germinaciones de cada una de las placas que se sembraron. La resistencia en las semillas transformadas debe ser de 1-2% según Martínez-Trujillo et al., (2004), mientras que las silvestres no deben de crecer.

En las placas se observó que hubo germinaciones en ambas líneas en las diferentes concentraciones de antibiótico (Figura 24). A pesar del porcentaje en ambas, el porcentaje de germinación en la línea mutante *-clv2-8* transformada tiende a ser más alta, con excepción de la concentración de 100 µg/ml de Kanamicina que disminuyó su porcentaje. El porcentaje de germinación obtenido es mayor, ya que en los germinados resistentes al antibiótico debe haber de 1-2 % de germinación, pero se obtuvo el 19.6 a 47.1 para la *clv2-8* transformada. Con ello podemos decir que se tiene un buen porcentaje de transformación. Se observó el mismo comportamiento de germinación (formación de hojas cotiledóneas y formación de raíz) en las diferentes líneas silvestres y mutantes transformadas. Se observó un alto índice de germinación en el medio con antibiótico y diferencias fenotípicas entre los germinados transformados y los germinados silvestres (Figura 25, C, E y F). Este fenotipo es similar al reportado por Harrison et al., (2006) en donde realizaron un método para obtener germinados resistentes a antibiótico en un tiempo más corto. Por lo que, las semillas germinadas son aquellas transformadas con el vector con el *pAtCLV2* y la secuencia de *MiCLV2*.

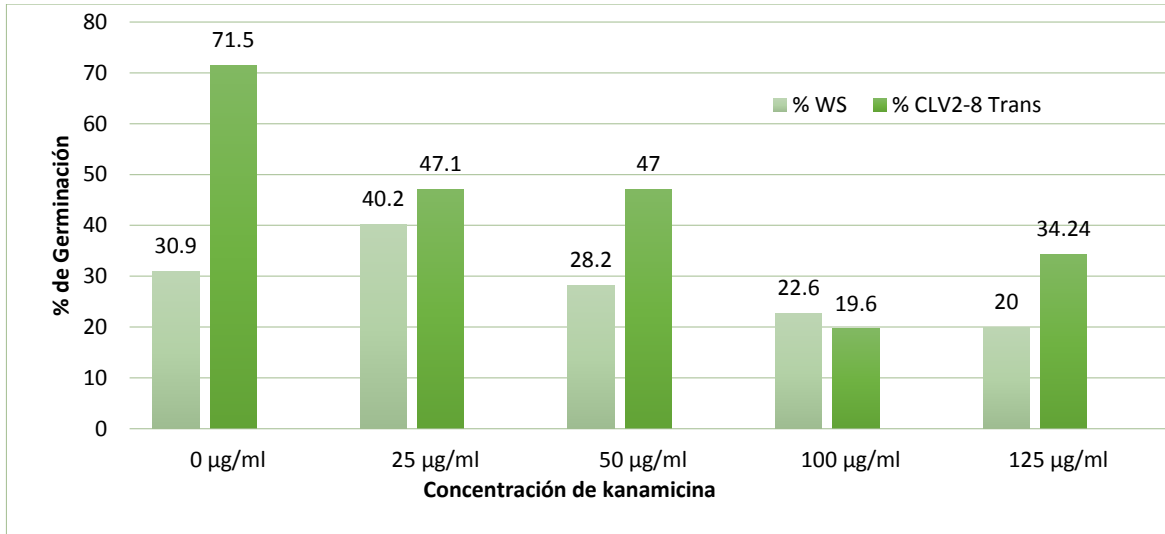


Figura 24. Porcentaje de germinación de dos líneas de *Arabidopsis thaliana*: línea silvestre WS y línea mutante *-clv2-8* transformada.

Por otra parte las semillas silvestres que germinaron ante el antibiótico, son sensibles ya que pueden germinar en condiciones favorables como un medio rico en minerales y nutrientes. Más no son viables ya que se pudo observar en la mayoría que solo desarrollaron su radícula y hojas cotiledóneas, como las que se reporta Valvekens et al.,(1988) donde observaron que después de realizar la selección con antibiótico, germinaban plántulas no viables a las que denominaron etioladas (Figura 25, B y D). A pesar de que las plántulas se encuentren en selección, pueden germinar mas no desarrollarse ya que al no poseer el gen *ntpl1*, que inactiva a la Kanamicina (Sundar y Sakthivel., 2008).

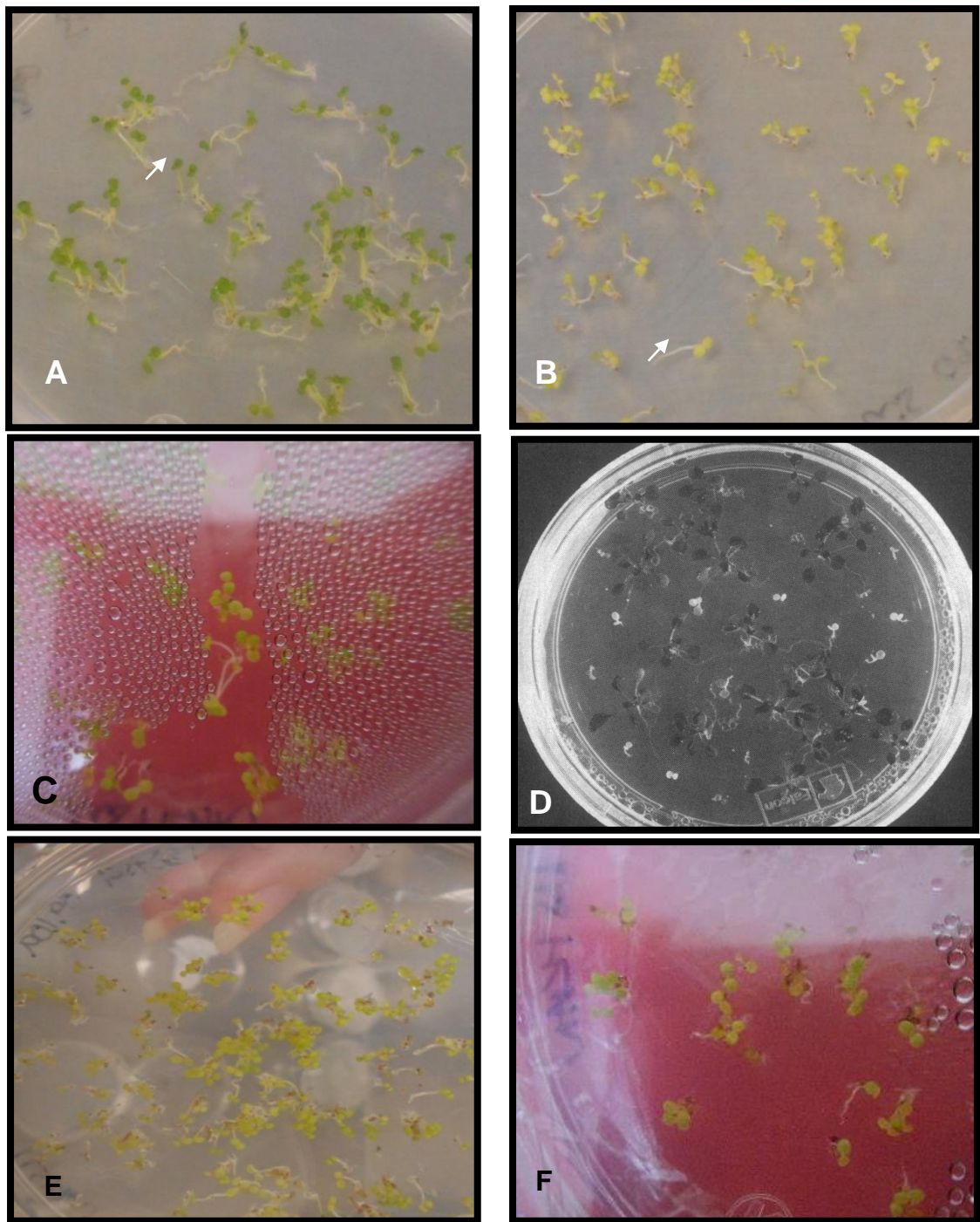


Figura 25: Germinación de semillas silvestres y mutantes transformadas. A: Semillas silvestre WS en medio sin antibiótico, B: Semillas silvestre WS en medio con antibiótico, C: Semillas silvestre WS transformadas en medio con antibiótico, D: Semillas germinadas en selección con kanamicina en el estudio de Valvekens et al.,(1988), E. y F: Germinados de semillas mutantes transformadas, *clv2-8* y *clv2-7* respectivamente.

En el periodo de aclimatación se trasplantaron 500 plántulas derivadas del ensayo de resistencia a antibiótico. Estas plántulas se encontraban sanas y permanecían verdes en medio con Kanamicina; se descartaron aquellas cloróticas o de tono café (Figura 26). Al término de 7 días post-aclimatación las plántulas se volvieron cloróticas, es decir perdieron su capacidad de realizar la fotosíntesis, siendo poco viables para su desarrollo. Este paso es crítico, debido a la naturaleza de cambio *in vitro* a *ex vitro*, el manejo de las plántulas al colocarlas en tierra debe ser extremadamente cuidadoso.



Figura 26: Pase de germinados al periodo de aclimatación.

Para la verificación de la inserción del vector binario pBIB:KAN::*pAtCLV2:MiCLV2::GFP:GWR* se realizó el análisis de líneas mutantes transformadas en germinados mediante microscopía confocal. La excitación y observación de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente fue en hojas cotiledóneas y en la raíz (Figura 27 panel A y B, respectivamente). Se observó la expresión de la proteína verde fluorescente en ambos tejidos, observándose mayor intensidad en la raíz. Con esta evidencia podemos asegurar que el procedimiento de transformación utilizada fue exitoso y se obtuvieron semillas heterocigotas para *CLV2* de mango. Sin embargo, es

necesario obtener plantas homocigotas para realizar estos ensayos de localización de la proteína GFP fusionada a CLV2.

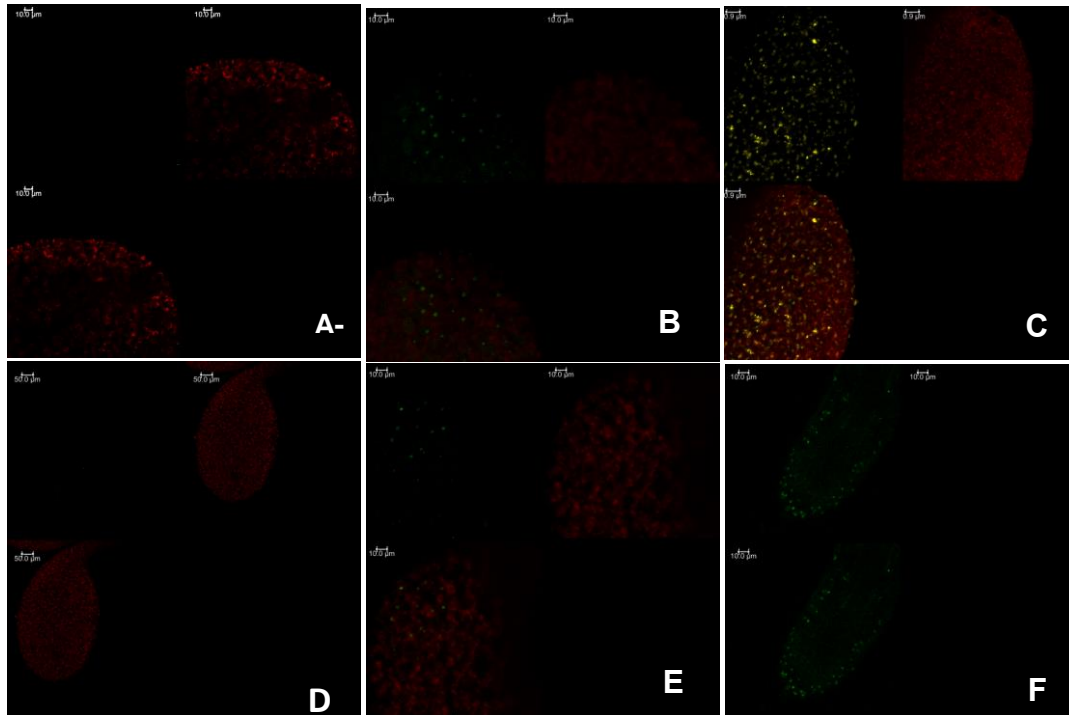


Figura 27: Localización de la proteína verde fluorescente fusionada a CLV2 de mango en germinados por microscopía confocal. Se muestra en color verde la fluorescencia de la proteína verde fluorescente, en rojo la excitación de clorofila, y en amarillo expresión de Venus. A: hojas de línea silvestre Columbia, B: Control positivo a fluorescencia de GFP línea DR5:GFP, C: Control positivo negativo a fluorescencia

Por otra parte, las resistentes al herbicida glufosinato (BASTA) se rociaron con BASTA en las hojas verdaderas y se administró a los 8 y 10 días después del periodo de incubación a 4°C. Las sobrevivientes al contacto con el herbicida presentaron una apariencia clorótica y murieron; mientras que las resistentes se mantuvieron verdes. Sin embargo, aun las plantas sobrevivientes perdieron la roseta pero si hubo desarrollo reproductivo, obteniendo plantas heterocigotas. Es por ello que es necesario llevarlas hasta la segunda generación y obtener semillas homocigotas, para el análisis de fenotipo y poder evaluar si CLV2 de mango realiza su función en las plantas de *Arabidopsis*.

VII. CONCLUSIONES

Se transformaron las plantas silvestres y mutantes *-clv2* de *Arabidopsis thaliana* con los dos vectores binarios que contienen el gen de *CLV2* de mango bajo los promotores CAMV35S y el promotor nativo. Se obtuvo evidencia fenotípica (resistencia a antibiótico o herbicida) y por microscopia confocal para asegurar la inserción de *CLV2* de mango en el genoma de *A. thaliana*.

VIII. PERSPECTIVAS

Se propone seguir trabajando con las líneas transformadas para estandarizar el proceso de aclimatación de las mutantes transformadas. Además se recomienda obtener plantas adultas homocigotas para evaluar el fenotipo resultante de la función de *MiCLV2* en mutantes restablecidas de *A. thaliana*. Con ello continuar los análisis de microscopía confocal en plantas homocigotas para observa expresión y localización del receptor CLV2 de mango.

IX. ANEXOS

```

ATCLV2      MIKIADFTLFFFFIFVFSPLPLAQSQPLDLPQDKASLLIFRVSIHDLNRSLSWTWYGSSC 60
MiCLV2      MKLNWVLLLYLCKILFLILLFSPSESELELNROEKASLLFRSLVQDSSQRLSSWVGSNC 60
          *      : *:: ::* *      *: :*: *::**::** :*: .: **:* **.*

ATCLV2      SNWTGLACQNPTGKVLSTLTLGSLNLSGQIHPSLCKLSSLSQSLDLSHNNFCGNIPSCFGSL 120
MiCLV2      TNWTGVTCESSQSGHVVSNLNTNINLSGQVHPSLCKLLFLEILVLSGNNLSGRIPLCFGTL 120
          :***::*:. :*:**.*.:.*****:***** * : * ** **:.*.** **:*

ATCLV2      RNLRTLNLRSRNRFIGSIPPTFMSLKELGEEVVLSENRRNLGGVVPWHWGFDFSMNLERVDLSF 180
MiCLV2      TSLKTLDLSHNGFVGVLPDTLMRLRNLEKILSGNSGLGGVFPWWVGNFSTNLEKLDMSF 180
          .*:**:*:* *:* :* ** * :*: * :*:** * .****.* *.*** ***:**.*

ATCLV2      CSFVGEPESELLYLKSLKYLNLSENNMTGTLRDFQQPLVVLNLASNRFSGTLPFCFYASRP 240
MiCLV2      DSPKGEPESESLFYKSLKYLNLGNNYLEGDVHDFYQGLSYLNLRSNRFSGTLPFCFSASAS 240
          ** *****:*****:* . * : * :** * * ** ***** ** .

ATCLV2      SLSVLNLAENSLVGGPLPCLGSLKELSHLNLFSNGFNIEISPRLVFSEKLVMLDLSHNGF 300
MiCLV2      SLTVLKDNNISIVGGPLPTCLASLQALRHMNLSFNRLNIEISPRLVFMEKLLVLDLSFNDL 300
          **:***:* :**:*:**.***.* : * :***** :***** ***:**.*.:.

ATCLV2      SGRLPISRISETTEKLGVLVLDLSHNSFSGDIPLRITELKSLQALRSLHNLITGDI PARIG 360
MiCLV2      SGPLPSEIPLTLAGLKSLEIVDFSSNNLFGSLSDAITKWSNLKYL SVARNKLSGNL PNWLF 360
          ** ***.*:***** ***** ***:***:***:***** *****:*****

ATCLV2      NLTYLQVIDLSHNSLTGSIPLNIVGCFQLLALMISNNLSGEIQPELDALDSLKILDVSS 420
MiCLV2      NLTYLQVIDLSHNSLTGSIPLNIVGCFQLLALIVNNNLSGQIQEELDALDSLKILDVSS 420
          ***** ***:*****:***:*****:*** *****:***.

ATCLV2      NHISGEIPLTLAGLKSLEIVDFSSNNLFGSLSDAITKWSNLKYL SVARNKLSGNL PNWLF 480
MiCLV2      NHISGEIPLTLAGLKSLEIVDFSSNNLFGSLSDAITKWSNLKYL SVARNKLSGNL PNWLF 480
          *:*****:*****:***** *.*:*****:***:***.***

ATCLV2      KFDKIQIMIDYSSNRFWFIPDDNLNSTR-FK--DFQTGGGEGFAEPPGKVEIKISA AVVA 537
MiCLV2      SFGAIRMMDFSSNKFTGYIPDGNFNISLNFNNVDITRSFSPKPVLSMRSMAINISAVVID 540
          .*. *:*:*:**:*: :***.*:* : * : * : . . . . : : **:*.*:

ATCLV2      KDELSFSYNLLSMVGIDLSDNLLHGEIPEALFRQRNIEYLNLSYNFLEGQLPRLEKLPRL 597
MiCLV2      ANVLNFNVDLHSTVGDIDLSDNLLHGVI PDGLFELRGLKYLNLNSYNFLNGQVPALDKMLSL 600
          : *.*.*:* * ***** ***:***. *.:*****:***:***.*

ATCLV2      KALDLSHNSLSGQVIGNISAPPGLTLLNLSHNCFSGIITEKEGLGKFPGALAGNPCLCVE 657
MiCLV2      RALDLSHNSLTGQIPGNISLKDLTVLNLSYNSFSGFVPEKQGSRKFPGAFAGNPCLCVE 660
          :*****:***: ****: .**:*:**.***:*:***.* *****:*****:***

ATCLV2      TP-GSKCDPANIDASQEIEYQNELVEGPISIWIFCLSAFISDFDGVLFCSARARSYIL 716
MiCLV2      SSSGEGCDRKS LPTVPKSFREEMAEGPISIWVFCLSFFVSYLGVMTLFC SARTRKYIL 720
          :. * . ** .: : : :*:**:*:**.*** *:* ***: ***:**:*

ATCLV2      QTKA 720
MiCLV2      QTKN 724
          ***

```

Anexo 1: Alineación de la secuencia aminoacídica de CLV2 de mango obtenida en el transcriptoma en comparación con la secuencia aminoacídica de *Arabidopsis thaliana*.

```

ClonaFW      MKLNWVLLLYLCKILFLIILFSPSESELELNREQKASLLFRSLVQDSSQRLSSWVGSNC 60
MICLV2      MKLNWVLLLYLCKILFLIILFSPSESELELNREQKASLLFRSLVQDSSQRLSSWVGSNC 60
*****

ClonaFW      TNWTGVTCEQSGHVVSLNLTNINLSGQVHPSLCKLLFLEILVLSGNNLSGRIPLCFGTL 120
MICLV2      TNWTGVTCEQSGHVVSLNLTNINLSGQVHPSLCKLLFLEILVLSGNNLSGRIPLCFGTL 120
*****

ClonaFW      TSLKTLDSLHNGFVGVLPDTLMRLRNKELILSGNSGLGGVFPWWVGNFSTNLEKLDMSF 180
MICLV2      TSLKTLDSLHNGFVGVLPDTLMRLRNKELILSGNSGLGGVFPWWVGNFSTNLEKLDMSF 180
*****

ClonaFW      DSKGELPESLFYKSLKYLDLGNLYEGDVHDFYQGLSYLNLRNRFSGTLPFCSASAS 240
MICLV2      DSKGELPESLFYKSLKYLDLGNLYEGDVHDFYQGLSYLNLRNRFSGTLPFCSASAS 240
*****

ClonaFW      SLTVLKLDDNSIVGGLPTCLASLQALRHMNLSFNRLNIEISPRLVFMEKLLVLDLDFNDL 300
MICLV2      SLTVLKLDDNSIVGGLPTCLASLQALRHMNLSFNRLNIEISPRLVFMEKLLVLDLDFNDL 300
*****

ClonaFW      SGPLPSEIAETTEKSGLLDLSHNRFS----- 328
MICLV2      SGPLPSEIAETTEKSGLVLLDLSHNRFSGEIPLKITELRSLQALFLSHNLLTGEIPARIG 360
*****

ClonaFW      -----
MICLV2      NLTYLQVIDLSHNMLSGSIPLNIVGCFQLLALIVNNNLSGQIQQELDALDSIKILDVSS 420

ClonaFW      -----SGNPP----- 333
MICLV2      NRISGEIPLTLAGLKSLEIVDFSSNNLFGSLSDAITKWSNLKYLVARNKLSGNLPNWLF 480
*****

ClonaFW      -----
MICLV2      SFGAIRMMDFSSNKFTGYIPDGNFNISLNFNNVDITRFSKPVLSMRSMAINISAVVID 540

ClonaFW      -----GLLKLR----- 339
MICLV2      ANVLNFNYDLHSTVGIDLSNLLHGVIPD-GLFELRGLKYLNLSYNFLNGQVPALDKMLS 599
*****

ClonaFW      -----SLT-----RQLFFLHKSF-----FLPHR----- 357
MICLV2      LRALDLSHNSLTGQIPGNISSLKDLTVLNLNSYNSFGFVPEKQGSRKFPAGAFAGNPDLCV 659
***          ::* .*: *:      *:*.:

ClonaFW      -----GE----- 359
MICLV2      ESSSGEGCDRKSLEPTVPGKSFREEMAEGPISIWVFCLSFFVSYLGVMTLFC SARTRKYI 719
**

ClonaFW      -----
MICLV2      LQTKN 724

```

Anexo 2. Alineación de la secuencia aminoacídica obtenida del transcriptoma de mango en comparación a la secuencia obtenida clonada en pGEM.

X. REFERENCIAS CITADAS

Alberti, S., Gitler, A. D., y Lindquist, S. (2007). A suite of Gateway® cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24 (10), 913-919.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403-410.

Barik, S. K. (2013). Floral dip: A simple and efficient agrobacterium mediated transformation method is used in a model plant *Arabidopsis thaliana*. *Cibtech Journal of Bio-Protocols*, 2 (2), 14-20.

Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C. A., y Simon, R. (2010). Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires *CRN* to localize *CLV2* to the plasma membrane. *Plant Physiology*, 152 (1), 166-176.

Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M., y Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289 (5479), 617-619.

Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z., y Meyerowitz, E. M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*, 122 (5), 1567-1575.

Clark, S. E., R. W. Williams, y E. M. Meyerowitz. (1997). The *CLAVATA1* Gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 89 (4). 575-585.

Curtis, M. D., y Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, 133 (2), 462-469.

Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C.A., Pacheco-Sánchez, M. A., Casas-Flores, S. J., Sánchez-Flores, A., Kuhn, D. N., Islas-Osuna, M.A. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science*, 6.

Durbak, A. R., y Tax, F. E. (2011). CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. *Genetics*, 189 (1), 177-194.

Gaillochet, C., Daum, G., y Lohmann, J. U. (2015). O Cell, Where Art Thou? The mechanisms of shoot meristem patterning, *Current Opinion in Plant Biology*, (23), 91-97.

Gish, L. A., Gagne, J. M., Han, L., De Young, B. J., y Clark, S. E. (2013). WUSCHEL-Responsive At5g65480 interacts with CLAVATA components *in vitro* and in transient expression. *PloS one*, 8 (6), e66345.

Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., y Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 2 (1), 19.

Jeong, S., A. E. Trotochaud, y S. E. Clark. (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *The Plant Cell Online*, 11 (10) 1925-1933.

Karimi, M., Depicker, A., y Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiology*, 145 (4), 1144-1154

Karimi, M., Inzé, D., y Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7 (5), 193-195.

Karimi, M., Inzé, D., V. Lijsebettens, M., y Hilson, P. (2013). Gateway vectors for transformation of cereals. *Trends in Plant Science*, 18 (1), 1-4.

Kayes, J. M., y Clark. S. E. (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development*, 125 (19), 3843-3851.

Kitamura, S., Akita, Y., Ishizaka, H., Narumi, I., y Tanaka, A. (2012). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen. *Journal of Plant Physiology*, 169 (6), 636-642.

Laiho, M., Weis, F. M., Boyd, F. T., Ignatz, R. A., y Massagué, J. (1991). Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (14), 9108-9112.

Long, J. y Barton, M. K. (2000). Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, 218 (2), 341-353.

Mandel, T., Moreau, F., Kutsher, Y., Fletcher, J. C., Carles, C. C., y Williams, L. E. (2014). The *ERECTA* receptor kinase regulates *Arabidopsis* shoot apical meristem size, phyllotaxy and floral meristem identity. *Development (Cambridge, England)*, 141 (4), 830–841.

Martínez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J. L., y Herrera-Estrella, L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22 (1), 63-70.

McSteen, Paula, y Sarah Hake. (1998): Genetic control of plant development. *Current Opinion in Biotechnology*, 9 (2) 189-195.

Mersereau, M., Pazour, G. J., y Das, A. (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene*, 90, 149–151.

Meyerowitz, E. M. (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology*, 125 (1), 15-19.

Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Y Ueno, K. (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, 37 (1), 49-59.

Nakagawa, T., Ishiguro, S., y Kimura, T. (2009). Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology*, 26 (3), 275-284.

Shen, W. H. (1996). Methods in Molecular Biology, vol. 49, Plant gene transfer and expression protocols: edited by Heddwyn Jones, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 466.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., y Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (12), 6896-6901.

Shiu, S. H., y Bleecker, A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science Signaling*, (113), 22.

Singer, K., Shibolet, Y. M., Li, J., y Tzfira, T. (2012). Formation of complex extrachromosomal T-DNA structures in *Agrobacterium tumefaciens*-infected plants. *Plant Physiology*, 160 (1), 511-522.

Song, S. K., Lee, M. M., y Clark, S. E. (2006). POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells. *Development*, 133 (23), 4691-4698.

Sundar, I. K., y Sakthivel, N. (2008). Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Journal of Plant Physiology*, 165 (16), 1698-1716.

Trotochaud, A.E., Jeong, S., y Clark, S.E. (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science*, 289 (5479), 613-617.

Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., y Matsubayashi, Y. (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, 319 (5861), 294-294.

Pérez, Franck. (2013). Serial Cloner 2.6.1. (http://serialbasics.free.fr/Home/Entries/2013/4/3_Serial_Cloner_2.6.1_update.html). *Serial Basics*, Consultado en Abril 2015.

Valvekens, D., Van Montagu, M., y Van Lijsebettens, M. (1988). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 (15), 5536-5540.

Wang, G., Long, Y., Thomma, B. P., de Wit, P. J., Angenent, G. C., y Fiers, M. (2010). Functional analyses of the *CLAVATA2*-like proteins and their domains that contribute to *CLAVATA2* specificity. *Plant Physiology*, 152(1), 320-331.

Yadav, R.K., Tavakkoli, M., Xie, M., Girke, T., y Reddy, G.V. (2014). A high resolution gene expression map of the *Arabidopsis* shoot meristem stem cell niche. *Development*. 141. 2735–2744.

Zhou, L., Wang, Y., Ren, L., Shi, Q., Zheng, B., Miao, K., y Guo, X. (2014). Overexpression of, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116 (3), 285-295.