



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA**

**“Análisis del movimiento sistémico de
macromoléculas en *Cucurbita maxima*”**

TESIS

Que presenta

FRANCISCO ARTURO RAMÍREZ ORTEGA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis:

Dr. Roberto Ruiz Medrano

México, D.F.

Febrero, 2015

Agradecimientos:

A la Doctora Bety: Quien literalmente le dio un rumbo a mi vida, cuando al salir de la carrera, no sabía que iba a hacer en mi formación profesional.

Al Doctor Roberto: Que siempre dirigió mis pasos y con paciencia me instruyó poco a poco para formarme como doctor.

Y ambos, a quienes no solamente me formaron primero como maestro en ciencias, luego como doctor en ciencias, sino que aun me están formando para ser investigador y con el amor de padres me ayudaron a conseguir empleo y animan a superarme día a día con su ejemplo.

A la Doctora Horcasitas, porque con sus consejos, no solamente salvó mi postgrado varias veces, sino que también me alentó a seguir adelante cuando ya no podía más.

A la Doctora Maru, quien también me ayudó a salir adelante cuando creí que todo estaba perdido.

Al Maestro Abel, a quien le debo el trabajo que tengo y sé que también hizo posible este momento.

A Berenice, quien fue como una hermana desde inicios del postgrado y ahora también en mi trabajo.

A Lidia que con firmeza y decisión me formó y adiestró.

A Don José Luis que siempre me ayudó a encontrarle el sentido a las cosas que parecían no tenerlo y ver con humor las situaciones más difíciles.

A Bety Altamirano con quien siempre conté con su apoyo, consejos y ayuda técnica.

A Robert, Vale, Angie, George, Andrés, Pool, Brendita, Rebeca y Estela Xocconostle, con que han estado conmigo en las buenas y en las malas. Con quienes he llorado y reído, caminado en el mismo camino, padecido y festejado y sobre todo, pasado momentos inolvidables.

A Vania quien desde lejos me alentaba a seguir adelante.

A las personas que me ayudaron a que este día fue posible, que me hicieron poner los pies en la tierra con sus consejos y ayuda técnica: J. Jesús Hinojosa Moya, Estela Gómez, Marta Salgado Siclán, Hugo Aguirre y José Luis Cruz Saramillo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice desglosado.....	II
Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tablas.....	IX
Índice de Gráficas	X
1.- ABSTRACT.....	1
2.- RESUMEN	2
3.- INTRODUCCIÓN	3
4.- JUSTIFICACIÓN	45
5.- HIPÓTESIS	46
6.- OBJETIVOS	47
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	48
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
9.- CONCLUSIONES	87
10.- BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DESGLOSADO

	Página
1.-ABSTRACT.....	1
2.- RESUMEN	2
3.- INTRODUCCIÓN	
3.1.- El tejido vascular de las plantas.....	3
3.1.1.- Generalidades del xilema.....	3
3.1.2.- Generalidades del floema	4
3.1.3.- Funciones fisiológicas donde interviene el floema	5
3.1.3.1.- Floración.....	5
3.1.3.2.- Respuesta a distintos tipos de estrés.....	5
3.1.3.3.- Silenciamiento génico postranscripcional	7
3.1.3.4.- Transporte de virus en plantas.....	8
3.1.3.5.- Intercambio de material genético entre células de injerto	9
3.1.4.- Importancia de la regulación del transporte en plantas.....	12
3.2.- Generalidades de la calabaza.	
3.2.1.- Características físicas de la calabaza.....	13
3.2.2.- Estudio Bioquímico y fisiológico en calabaza.....	15
3.3.- Transformación genética.	
3.3.1.- Generalidades de la transformación genética.....	16
3.3.2.- Técnicas de transformación directa.....	17
3.3.3.- Técnicas de transformación indirecta.....	18
3.3.4.- Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i>	19
3.4.- Genes reporteros.	
3.4.1 Generalidades de las proteínas utilizadas como reporteras de la transformación.....	24
3.4.2.- Marcadores de selección.....	24
3.4.3.- Marcadores de información.	24
3.4.4.- Generalidades de GFP.....	27
3.4.5.- Generalidades de la β -glucuronidasa.....	31

	Página
3.5.- Proteínas involucradas en el transporte de macromoléculas en floema.....	31
3.5.1.- Generalidades de la CmPP16.....	32
3.5.2.- Generalidades de Knotted.....	33
3.6.- Mecanismos de tolerancia y resistencia a sequía.....	34
3.6.1.- Papel de la trehalosa en sequía	36
3.6.2.- Papel de las proteínas LEA durante la sequía	38
3.6.3.- Mediciones fisiológicas de cambios ocurridos durante el estrés hídrico	39
3.6.3.1.- Fotosíntesis	39
3.6.3.1.1.- Iluminación	39
3.6.3.1.2.- CO2 disponible	42
3.6.3.1.3.- Flujo de aire	43
3.6.3.2.- Transpiración	43
3.6.3.3.- Conductividad estomática	43
3.6.3.4.- Capacidad de retención de agua del suelo (WHC)	43
3.6.3.5.- Humedad transpirable del suelo (FTSW)	44
4.- JUSTIFICACIÓN	45
5.- HIPÓTESIS	46
6.- OBJETIVOS	47
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	
7.01.- Vectores	48
7.01.1.- Vector pCAMBIA	48
7.01.1.1.- mEGFP5	49
7.01.1.2.- GUS	49
7.01.1.3.- CaMV 35S	49
7.01.1.4.- Kanamicina	49
7.01.2.- Vector pBIN19	49
7.01.3.- Vector pK7FWG2	49
7.02.- Cepas de Agrobacterium	50

	Página
7.03.- Material Vegetal	50
7.04.- Análisis Físicoquímico del suelo	51
7.04.1.- Contenido de humedad	51
7.04.2.- Determinación de WHC (Water Holding Capacity)	51
7.04.3.- Determinación de FTSW (fractions of Transpirable Soil Water)	51
7.04.4.- Contenido de Materia orgánica	51
7.04.5.- Determinación del % de Arcilla, Limo y Arena	52
7.05.- Inoculación con Agrobacterium	52
7.06 Ensayo de GUS	53
7.06.1.- Formulación de la solución para la actividad enzimática de la b- glucuronidasa.....	53
7.06.2.- Formulación de la solución para cristalizar y precipitar carbohidratos	54
7.06.3.- Formulación de la solución para extraer clorofila	54
7.06.4.- Formulación de la solución para decolorar tejido vegetal	54
7.07.- Visualización de GFP	54
7.07.1.- Solución para eliminar clorofila para visualizar GFP	54
7.07.2.- Solución de conservación para visualizar GFP	55
7.08.- Extracción de DNA y RNA	55
7.09.- Análisis mediante PCR	55
7.09.1.- Composición de la mezcla de PCR	55
7.09.2.- Oligonucleótidos empleados	56
7.09.3.- Programa para la PCR	56
7.10.- RT-PCR y PCR tiempo real	57
7.10.1.- RT-PCR	57
7.10.2.- PCR tiempo real	58
7.11.- Tratamiento de sequía	58
7.12.- Medición de parámetros fisiológicos en las plantas durante la sequía	58

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1.- implementación del sistema de transformación.	60
8.1.1.- Cambios morfológicos en las hojas de las plantas transformadas con las construcciones CaMV 35S-mgfp5-uid A y CaMV 35S-mgfp5-CmPP16-Egfp.	60
8.1.2.- Cambios morfológicos en las hojas de las plantas transformadas con la construcción rol C-KN1-Egfp	60
8.2.- Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción mgfp5-uid A.....	63
8.3.- Visualización de GFP	
8.3.1.- Visualización de mGFP5 en plantas con la construcción GFP-GUS.....	65
8.3.2.- Visualización de FGP en plantas con la construcción KN1-EGFP.....	66
8.3.3.- Visualización de FGP en plantas con la construcción CmPP16-EGFP.....	67
8.4.- Análisis por PCR punto final de plantas transformadas	69
8.4.1.- Análisis por PCR punto final de plantas transformadas con la construcción mGFP5-GUS	69
8.4.2.- Análisis por PCR punto final de plantas transformadas con la construcción KN1-EGFP	71
8.4.3.- Análisis por PCR punto final de plantas transformadas con la construcción CmPP16-EGFP	72
8.5.- Análisis por RT-PCR y PCR tiempo real de plantas transformadas.....	73
8.5.1.- Análisis por PCR tiempo real del número de copias de GFP en el DNA genómico.....	74
8.5.2.- Análisis por PCR tiempo real del número de copias de CmPP16 en el DNA genómico	75
8.5.3.- Análisis por PCR tiempo real del número de copias de Knotted en el DNA genómico	76
8.5.4.- Análisis por RT-PCR de niveles de transcripción de GFP	76
8.5.5.- Análisis por RT-PCR de niveles de transcripción de Knotted	77
8.5.6.- Análisis por RT-PCR de niveles de transcripción de CmPP16	77

	Página
8.6.- Resultados de la prueba de tolerancia a sequía.....	78
8.6.1.- Resultados del análisis de textura del suelo	78
8.6.2.- Resultados de la capacidad de retención de agua del suelo	78
8.6.3.- Determinación de la intensidad de iluminación óptima.....	80
8.6.4.- Mediciones de parámetros fotosintéticos con respecto a la sequía	81
8.6.4.1.- Fotosíntesis neta ante el estrés hídrico	82
8.6.4.2.- Conductividad estomática en plantas sometidas a estrés hídrico	84
8.6.4.3.- Niveles de transpiración en plantas sometidas a estrés hídrico	85
9.- CONCLUSIONES	87
10.- BIBLIOGRAFÍA	88

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Movimiento de agua y nutrientes en tejido vascular.....	3
Figura 2.- Estructura del floema.....	5
Figura 3.- Transporte de señales en el floema.....	7
Figura 4. Silenciamiento genético postranscripcional.....	8
Figura 5. Electroforesis de RNA total.....	9
Figura 6. Macromoléculas viajando del portainjerto al injerto	10
Figura 7. Plántulas intercambiando marcadores moleculares.....	11
Figura 8. Northern blots de distintas clonas de los injertos de tabaco.....	11
Figura 9. Gel de proteínas de floema de distintas dicotiledoneas	12
Figura 10. Flores de <i>Cucurbita maxima</i>	14
Figura 11. Uso de codón de <i>Cucurbita máxima</i>	15
Figura 12. Tumores vegetales formados mediante el uso de <i>Agrobacterium</i>	19
Figura 13. Plasmido Ti	21
Figura 14. Maquinaria Bioquímica y Genética involucrada en la infección de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> silvestre	21
Figura 15. Primeras vistas de la GFP	27
Figura 16: Espectros de excitación y emisión de las distintas proteínas fluorescentes mejoradas	28
Figura 17. Imágenes de GFP y clorofila	29
Figura 18: Vista de tejido de tabaco expresando GFP y YFP	30
Figura 19. Corte de pétalo de flor de calabaza visto en microscopio multifotónico.....	30
Figura 20.- Detalles de la β -glucuronidasa	31
Figura 21.- <i>Selaginella lepidophylla</i> en sus distintas fases	34
Figura 22 estructura de la Betaina	35
Figura 23. Estructura de distintos disacáridos	37
Figura 24. Reacción de degradación de la trehalosa en glucosa	37
Figura 25. Efecto de sobreexpresión de proteínas LEA en plántulas de <i>Arabidopsis</i>	39
Figura 26. Unidades de iluminación	40

	Página
Figura 27. Efecto de intensidad de iluminación en la fotosíntesis	42
Figura 28. Mapa del vector pCAMBIA1304	47
Figura 29. Plásmido pBin19 para <i>Agrobacterium</i>	49
Figura 30. Mapa del vector pK7FWG2	50
Figura 31: Diagrama de textura del suelo	52
Figura 32. Inoculación de plátulas de calabaza con la suspensión de <i>Agrobacterium</i> con jeringa de insulina	53
Figura 33: Fenotipo de las calabazas posterior a la inoculación con <i>A. rhizogenes</i>	59
Figura 34: Nudos en los cotiledones de plántulas.	60
Figura 35: Cotiledones con fenotipo nudoso	61
Figura 36: Hojas de calabaza transformadas con <i>A. rhizogenes</i> K599 conteniendo la construcción KN1-EGFP.	61
Figura 37: Hojas de calabaza transformadas con <i>A. rhizogenes</i> K599 conteniendo la construcción KN1-EGFP	62
Figura 38: Planta transformada con <i>A. tumefaciens</i> conteniendo KN1-EGFP	62
Figura 39: Ensayo de GUS para la detección de la β -glucuronidasa	63
Figura 40: Distribución de la β -glucuronidasa en el cilindro vascular de raíz	64
Figura 41: Distintos tejidos expresando β -glucuronidasa	64
Figura 42: β -glucuronidasa expresada en estomas	65
Figura 43: Vista de gfp en cortes de plantas transformadas	65
Figura 44: Vista en microscopio confocal de distintas muestras de plantas transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el vector pBin19	66
Figura 45: Corte longitudinal de tallo	66
Figura 46: Expresión de GFP en tejido vascular	67
Figura 47. Vista de GFP en plantas transformadas con la CmPP16-EGFP	68
Figura 48. Fluorescencia en tricoma	68
Figura 49. PCR vs. GFP en plantas transformadas con mGFP5-GUS	69
Figura 50. PCR vs. GFP en plantas transformadas con KN1-EGFP	71
Figura 51. PCR vs. GFP en plantas transformadas con CmPP16-EGFP	72

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Función de los genes <i>vir</i>	22
Tabla 2.- Genes marcadores más comúnmente utilizados.....	25
Tabla 3: Tipos de proteínas fluorescentes.....	28
Tabla 4. Tipos de frecuencias que componen la luz visible	41
Tabla 5. Iluminación en luxes que hay en distintas condiciones	42
Tabla 6: Secuencia de los oligonucleótidos empleados	56
Tabla 7: Programa para las PCR	57
Tabla 8: Parámetros ambientales de medición de la fotosíntesis	58
Tabla 9. Eficiencia de transformación de plantas transformadas con la construcción mGFP5-GUS	70
Tabla 10: Eficiencia de la expresión de Knotted en plantas de calabaza	71
Tabla 11. Eficiencia de transformación de plantas de calabaza con la construcción CmPP16-EGFP	72
Tabla 12. Reporte de Ct que reporta el programa para cada muestra	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1. Gráfica de Fluorescencia vs. Ciclos	73
Gráfica 2. Fluorescencia Normalizada contra ciclos	73
Gráfica 3. Gráfica de Ct vs. Concentración de DNA inicial	74
Gráfica 4. Numero de copias de GFP vs. copias de Actina en DNA total	75
Gráfica 5. Número de copias de CmPP16 vs. número de copias de Actina	75
Gráfica 6. Número de copias de Knotted vs. número de copias de Actina	76
Gráfica 7. Niveles relativos del transcripción de GFP con respecto a Actina	76
Gráfica 8. Niveles de relativos de transcripción de Knotted comparados con los de Actina	77
Gráfica 9. Niveles de relativos de transcripción de CmPP16 comparados con los de Actina	78
Gráfica 10. WHC y FTSW vs. días de sequía	79
Gráfica 11. Linearización de WHC y FTSW con respecto a los días de sequía	80
Gráfica 12. Determinación de la iluminación óptima para calabaza	81
Gráfica 13: Fotosíntesis vs. días de sequía. También se muestra el % de FTSW con respecto a los días de sequía	82
Gráfica 14. Medición de fotosíntesis durante el estrés hídrico en plantas transformadas con <i>A. rhizogenes</i>	83
Gráfica 15. Medición de fotosíntesis durante el estrés hídrico en plantas transformadas con <i>A. tumefaciens</i>	83
Gráfica 16. Conductividad estomática vs. FTSW	84
Gráfica 17. Tasa de transpiración vs. FTSW	85

1.- ABSTRACT

In vascular biology, the study of long-distance translocation of macromolecules to their target tissue and their function has been limited because to the lack of efficient in vivo protein and RNA tracking. In order to test their translocation from the expressing tissue to distant, target organs, an efficient transformation method was developed to obtain composite plants, expressing proteins and RNA, which have shown systemic, long-distance movement properties. By employing *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens*, hairy roots or tumors, respectively, were produced with efficiency up to the 95%. Two genes encoding macromolecules with vascular-movement capacity were employed: maize *KNOTTED1* and pumpkin *CmPPI6*, which were GFP-tagged and their movement capacity in composite plants analyzed. Transgenic tissue bearing inserted T-DNA copies was limited to the tumor and roots; in contrast, the heterologous proteins and RNAs were detected in systemic distant tissue, in agreement to the transport observed in wild type plants. *KNOTTED1* produced phenotypes in distant tissues, comparable to those obtained in mutant plants, while the expression of *CmPPI6* provided drought-stress tolerance to transgenic plants. Interestingly, mRNA was also detected in systemic organs, in agreement to the findings of systemic RNA translocation *in planta*.

2.- RESUMEN

En la biología vascular, el estudio de translocación a larga distancia de las macromoléculas a su tejido blanco y su función ha sido limitado debido a la falta de estudio de las proteínas de floema *in vivo* y el poco seguimiento que se le puede dar al RNA. Con el fin de poner a prueba el desplazamiento de las macromoléculas, ya sea RNA o proteínas desde los tejidos que los expresan hasta los órganos blanco, se hace necesario el desarrollo de un método de transformación eficiente para la obtención de plantas quiméricas, para llevar acabo la sobreexpresión de proteínas a nivel sistémico.

Mediante el empleo de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*, se lograron obtener raíces pilosas y tumores, respectivamente a cada cepa. Fueron producidos con eficiencia de hasta el 95%. Además se emplearon dos genes que codifican las macromoléculas implicadas en el transporte a nivel vascular: *KNOTTED1* de maíz y *CmPP16* de calabaza, que fueron marcados con GFP, para analizar la capacidad que tienen de controlar el transporte.

Se logró demostrar que el T-DNA se limitó a los tumores y las raíces, en cambio, las proteínas heterólogas y el RNA fueron detectados en tejido distante, de acuerdo con el transporte observados en las plantas de tipo silvestre. La expresión de *KNOTTED1* produce fenotipos en tejidos distantes, comparables a los obtenidos en las plantas mutantes reportadas con anterioridad para maíz, mientras que la expresión de *CmPP16* en las plantas transgénicas causa tolerancia al estrés por sequía. Curiosamente, el mRNA se ha detectado también en los órganos sistémicos, que es consistente con la capacidad de movimiento en el floema de dichos RNAs.

INTRODUCCIÓN

3.- INTRODUCCIÓN

3.1.- El tejido vascular de las plantas.

El tejido vascular juega un rol importante en casi todas las funciones que la planta realiza, ya que un sin número de células se comunican a través de él. Entre las funciones más importantes que realiza, resaltan: Comunicación, drenaje, transporte de agua, azúcares, iones, cofactores, proteínas, lípidos, mensajeros, hormonas entre otras. Todas las plantas poseen sistema vascular, pero únicamente en las plantas superiores se encuentra desarrollado como tal en floema y xilema y son estos dos los mayores conductos de transporte. La sustancia contenida en el tejido vascular se le llama savia; a la savia que circula en el xilema se le llama savia bruta, mientras que la que hay en el floema se le llama savia enriquecida. La cantidad de agua y sales presentes en la savia del xilema y floema son relativamente constantes (Figura 1), pero las proteínas que contiene el xilema son distintas a las que contiene el floema (Turnbull y Lopez-Cobollo, 2013).

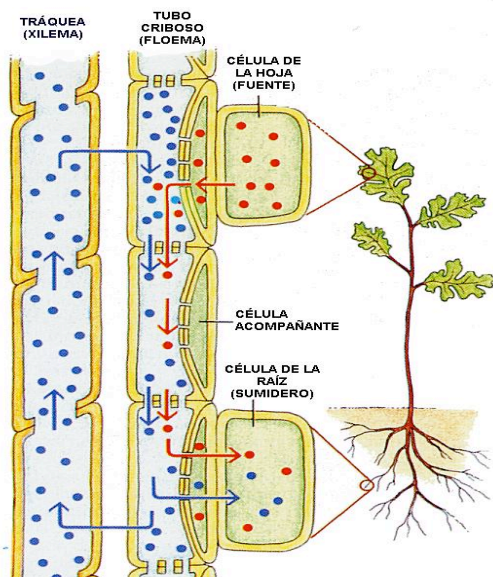


Figura 1. Movimiento de agua y nutrientes en tejido vascular. En esta figura se representa el movimiento de los nutrientes orgánicos, desde los tejidos productores (hojas principalmente) a los tejidos consumidores (raíces y meristemos en crecimiento). En el xilema el movimiento de solutos es unidireccional (Tomado de Wikipedia).

3.1.1.- Generalidades del xilema.

Nace desde la raíz de las plantas donde toma agua y sales del suelo y los lleva hasta la parte aérea de las plantas, en particular las hojas maduras en las que la transpiración es mayor; no importando la altura de las plantas, toda el agua que se transporta en él lo hace por capilaridad. La capilaridad se ve favorecida en clima frío, por ello los árboles de climas templados y fríos tienen un diámetro capilar mayor al de los árboles de latitudes tropicales y ecuatoriales que tienen menor diámetro capilar. Se encarga principalmente del transporte de agua y sales, aunque se han logrado identificar algunas hormonas que viajan a través de él.

INTRODUCCIÓN

Entre más alta es la especie de la planta y de mayor edad, se ve más lignificado, lo cual le confiere dureza y le permite mantener su forma, para evitar taponamientos. Aunque se sabe poco de ello, se ha observado que puede drenar con relativa rapidez la aparición de burbujas, para permitir el flujo de solutos.

Esta constituido por células que pierden todos sus organelos durante la diferenciación. El movimiento es en una sola dirección (ascendente). El hecho de que las células del xilema no tengan membrana permite el libre flujo de solutos a todas las células que están alrededor, aunque su pared celular esta reforzada para soportar la presión hidrostática necesaria para llevar el agua a las copas de los árboles. El elemento vascular es continuo en el espacio extracelular, para que la tensión superficial y la diferencia osmótica hagan el trabajo contra la gravedad, de transportar el agua.

3.1.2.- Generalidades del floema.

El floema distribuye azúcares, aminoácidos y otros nutrientes de los tejidos fotosintéticamente activos (autótrofos) que son principalmente las hojas maduras; a los que no son capaces de fotosintetizar (heterótrofos) que va siendo el resto de la planta, pero los que más consumen los fotosintátos son los meristemas en crecimiento. Solo en algunos tipos de plantas como las cactáceas el principal tejido productor es el tallo. Se ha observado que entre más eficiente es el tráfico de solutos en el floema, más eficiente es la fotosíntesis (Turgeon, 2010).

Aunque en el xilema se encuentran presentes moléculas que tienen un papel activo en la señalización, la gran mayoría de ellas se encuentran en el floema. Entre ellas, las más importantes son el RNAm y las proteínas de unión a RNA, que son capaces formar complejos ribonucleoproteicos funcionales que modifican el diámetro de exclusión de los plasmodesmos (Turnbull y Lopez-Cobollo, 2013).

Durante el proceso de diferenciación las células destinadas a formar el floema, van perdiendo sus organelos, entre ellos el núcleo. Las células de floema de gimnospermas no pueden eliminar completamente el núcleo, pero éste no es funcional y se encuentra súperempacado y adherido a la pared celular, “para que no estorbe al flujo de solutos”. El único organelo que conserva su funcionalidad íntegra es la membrana (Jensen *et al.*, 2012).

El floema está formado por dos tipos de células (Figura 2). El primer tipo de célula, de la cual ya se había hablado con anterioridad, es el elemento criboso que pierde su núcleo durante la diferenciación, y el segundo tipo es la célula acompañante, la cual mantiene su integridad y se comunica con el elemento criboso por medio de poros celulares llamados plasmodesmos. Por medio de ellos la célula acompañante envía al elemento criboso las moléculas que actuarán en la comunicación a larga distancia; entre esas moléculas está el RNAm, ya que recordemos que el elemento criboso no posee núcleo y por ende no puede sintetizar RNA.

INTRODUCCIÓN

Aunque el floema abarca desde la región subapical del meristemo del brote hasta la raíz, las cribas que separan a las células no permiten que la tensión superficial persista, de tal manera que el flujo de solutos no necesariamente va contra la gravedad, sino que el desplazamiento de ellos se rige más por un diferencial de gradiente de concentración (Sevato *et al.*, 2002).

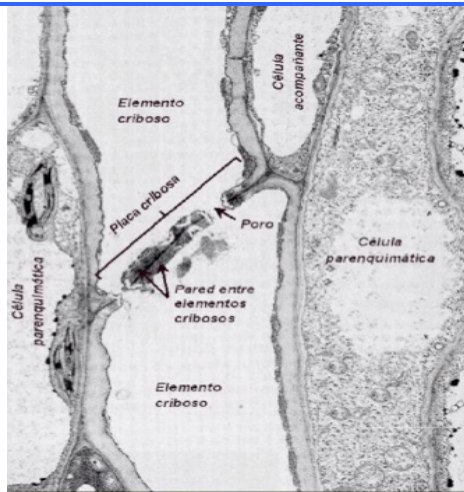


Fig. 2a.

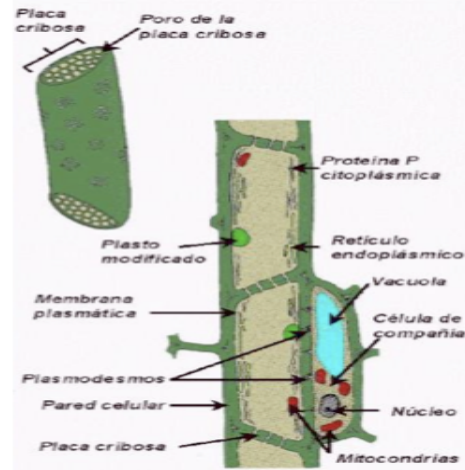


Fig. 2b

Figura 2.- Estructura del floema. Figura 2a. Micrografía electrónica de corte longitudinal del elemento criboso. 2b. Representación del elemento criboso del floema (Tomado de Wikipedia).

Los elementos cribosos del floema no solo tienen funciones mecánicas, sino también bioquímicas, por ejemplo, son elementos reguladores del tránsito de solutos, es decir no permiten el libre tránsito de cualquier molécula, sino que ésta para poder desplazarse libremente en el floema, debe tener ciertas características; la primera condición es que sea de bajo peso molecular; aunque también circulan moléculas de alto peso molecular en él, pero éstas tienen un radio de Stokes relativamente bajo y además se valen de un mecanismo especial para poder transitar; pueden aumentar el diámetro de exclusión de los plasmodesmos (Ueki y Citovsky 2014).

3.1.3.- Funciones fisiológicas donde interviene el floema.

Se ha comprobado que el floema interviene directamente en múltiples procesos fisiológicos, cuyas señales de iniciación o regulación se producen en tejidos distantes a los tejidos efectores. Como el floema abarca desde las hojas fotosintéticamente activas hasta los meristemos en crecimiento apicales y de raíz (Figura 3), la inmensa mayoría de las señales que hay en él, provienen de las hojas.

INTRODUCCIÓN

3.1.3.1.- Floración: El primer tejido en percibir el estrés hídrico es la raíz, y cuando la planta es sometida a estrés hídrico, tiene una floración prematura. Lo cual significa que de alguna manera mantienen comunicación y ésta se da por medio del xilema y floema. En condiciones normales son las hojas las que determinan el momento de la floración, eso aunado a un programa genético que determina las condiciones bajo las cuales se debe llevar a cabo; por ejemplo las violetas africanas necesitan el estímulo de estrés hídrico para poder florecer, mientras que los tulípanes necesitan temperaturas cercanas a 0°C (Colasanti y Sundaresan, 2000; Blázquez *et al.*, 2003).

3.1.3.2.- Respuesta a distintos tipos de estrés. Se ha observado que al someter a una sola hoja fotosintéticamente activa a radiación ultravioleta, en toda la planta se observa una sobreexpresión de pigmentos involucrados a la resistencia a la luz UV, tales como xantofilas y xantocianinas, sin embargo cuando es un meristemo en desarrollo el tejido sometido a la radiación UV, no se observa la sobreexpresión de pigmentos.

Lo mismo se observa en el ataque por herbívoros, cuando las hojas fotosintéticamente activas detectan que son comidas por insectos, producen y acumulan peróxido de hidrógeno, lo cual las hace poco apetecibles a los insectos; asimismo, producen el compuesto volátil metil jasmonato, que induce respuesta de defensa contra herbivoría. Esta respuesta también es sistémica. Algunas plantas son capaces de atraer a los depredadores naturales de los insectos que atacan a las plantas. Siendo las avispas las que más rápidamente responden a las sustancias liberadas por las plantas cuando son atacadas. En el caso particular de las orugas, éstas son ovopositadas por las avispas y la larva de la avispa se alimenta de la oruga, hasta llega a la madures. Se ha observado que también las avispas del genero *Tamarixia* logran encontrar por medio de sustancias químicas liberadas por las plantas, a las ninfas de los psílicos en los cuales completan su ciclo de vida; aunque no se ha identificado la naturaleza química de estas sustancias.

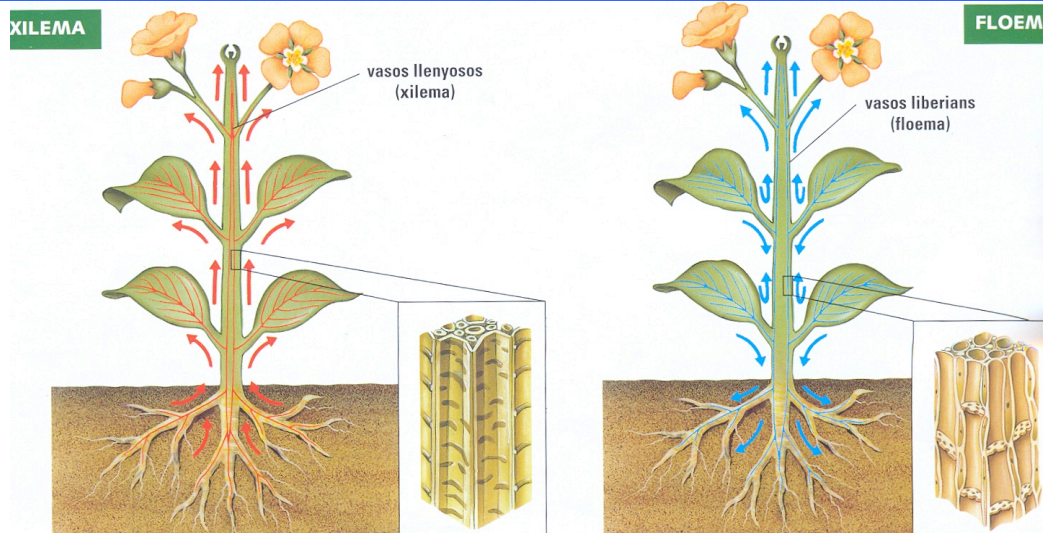


Figura 3.- Transporte de señales en el floema. En la figura se aprecia que el xilema es básicamente unidireccional (de la raíz a las hojas); mientras que el floema puede ir de las hojas productoras a las raíces, y también de las hojas productoras a los meristemos en crecimiento. A lo largo de la vida de la hoja, el floema va cambiando de dirección, pues en hojas en crecimiento, es principalmente aferente; mientras que en hojas ya maduras es principalmente eferente (tomado de www.escuelapedia.com)

3.1.3.3.- Silenciamiento génico postranscripcional,

Al ser transformadas las plantas con promotores fuertes tal como el 35S del virus del mosaico de la coliflor, se esperaba que éstas expresaran los genes de manera abundante, sin embargo no se observó eso, sino que las plantas transformadas no presentaban síntomas de haber sido transformadas. Esto llevó al análisis delicado del mecanismo molecular por lo cual las plantas transformadas no expresaban los transgenes y se reveló que el mecanismo principal por el cual esto se lleva a cabo, en el cual se degrada el RNA que es reconocido como “endógeno”; sospechando que este mecanismo fue desarrollado por primera vez en la naturaleza como defensa ante virus (Vance y Vaucheret, 2001).

El silenciamiento se lleva a cabo por pequeños RNAs que tienen entre 21 y 25 nucleótidos que generalmente provienen del RNA a silenciar de manera post-transcripcional (PTGS), este mecanismo también sirve para regular la expresión de los propios RNAs de planta (Hamilton y Baulcombe, 1999). Una de las moléculas más importantes en este proceso son las proteínas DICER, que se encargan de cortar de manera específica el RNA de doble cadena (dsRNA), el cual es resistente a las RNAsas más abundantes. Con ello se forman pequeños fragmentos que atraen a las proteínas ARGONAUTA que agilizan la degradación del RNAm (Aigner, 2006).

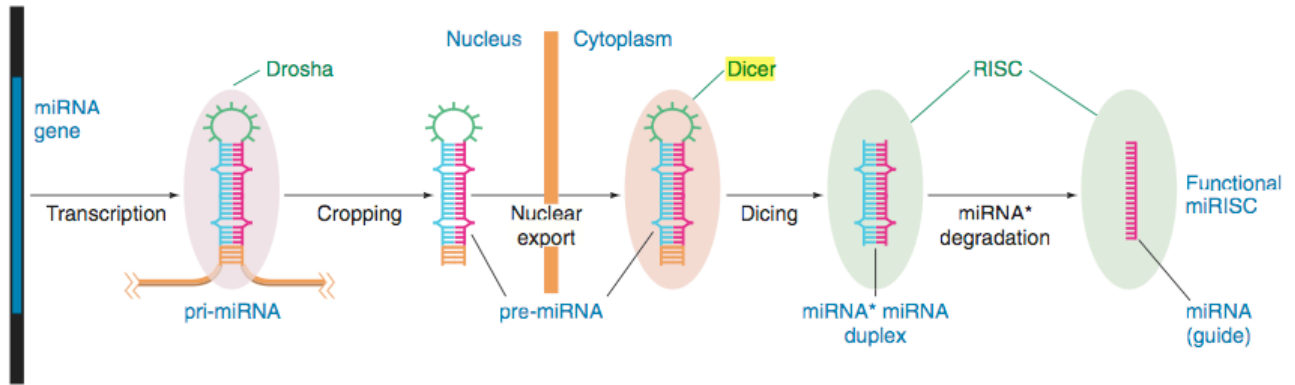


Figura 4. Silenciamiento génico postranscripcional. Modelo que representa el silenciamiento génico postranscripcional y su propagación (Tomado de Hartwell, Genetics 4th. Edition).

3.1.3.4.- Transporte de virus en plantas.

Los virus y otros patógenos de plantas tales como bacterias de los géneros *Xanthomonas* y *Ralstonia* utilizan el sistema vascular de las plantas para desplazarse a nivel sistémico. En el caso de infección por bacterias, solamente en los casos más severos de infección se alcanza el sistema vascular, comprometiendo de este modo, casi siempre de manera irreversible a la planta. Pero en el caso de infección por virus la entrada del patógeno al sistema vascular es un paso vital para una infección sistémica que no necesariamente compromete la planta. Los virus, que en su mayoría dependen de vectores de entrada a la planta, los cuales son principalmente psílidos o áfidos, necesitan llegar a floema para infectar a nivel sistémico la planta. La infección por virus a nivel sistémico, a diferencia de la mayoría de la que se da por bacterias, puede ser asintomática en algunos casos. Los áfidos y psílidos se alimentan directamente del sistema vascular, por lo que a los virus y bacterias transmitidos por ellos, les es relativamente fácil colonizar el floema.

Los virus de planta no cuentan con mecanismos de movilidad para desplazarse a grandes distancias, por lo que dependen directamente del sistema vascular para hacer infección sistémica y se mueven a través de él de manera pasiva. Las bacterias, que en su mayoría cuentan con mecanismos para desplazarse a larga distancia si bien, no necesitan utilizar el sistema vascular, muchas de ellas tienen preferencia por habitar en él, tal como es el caso de fitoplasmas, micoplasmas y *Candidatus liberibacter*.

INTRODUCCIÓN

Los virus al desplazarse en el floema de manera pasiva tienen que pasar a través de los plasmodesmos, para lo cual poseen proteínas que se encargan de aumentar el diámetro de exclusión de los plasmodesmos, el cual es nominalmente de 500 Da (Zambryski *et al.*, 2000, Gilbertson *et al.*, 2001). Estas proteínas virales son muy parecidas a proteínas propias de las plantas que son sintetizadas con estos mismos fines, las cuales se encuentran en savia (Balachandran *et al.*, 1997). Es necesario que los plasmodesmos permitan el paso de moléculas que sobrepasan por mucho el diámetro de exclusión habitual, para que los mensajeros sintetizados en la célula acompañante puedan llegar desde el ápice hasta las raíces y lograr una comunicación integral (Lucas *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 2001). El flujo de RNAm a través de floema es muy intenso, los meristemos apicales son muy ricos en estos transcritos (Figura 5), y se desconoce la función de esos transcritos (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

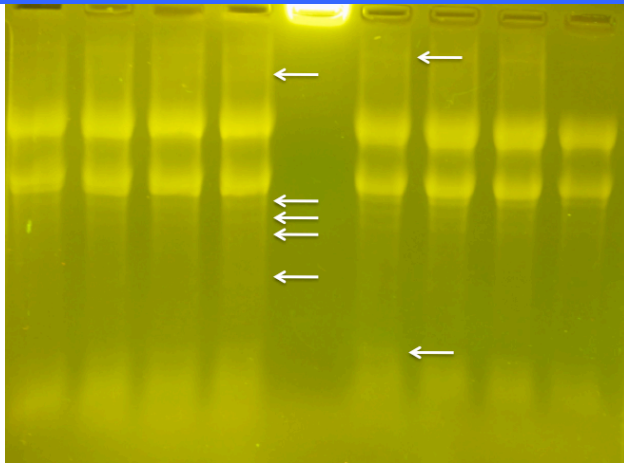


Figura 5. Electroforesis de RNA total de meristemo apical de calabaza. En el gel pese a que se presenta mucha contaminación de RNA ribosomal procedente de las células cortadas, se aprecia que hay muchos mensajeros abundantes (marcados con las flechas blancas). Algunos de los cuales van desde las 200 bases hasta las 10000 bases, aproximadamente.

3.1.3.5.- Intercambio de material genético entre células de injerto.

En 1999 mediante el uso de la técnica de homoinjertos y heteroinjertos, fue comprobado que muchas de las macromoléculas en floema presentes en el injerto son sintetizadas en el portainjerto. Esto fue hecho en plantas de calabaza y en plantas de pepino, haciendo homoinjertos pepino/pepino, calabaza/calabaza y un heteroinjerto pepino/calabaza (Xoconostle-Cázares, *et al.* 1999), al hacer perfil electroforético de los injertos, observaron que el perfil electroforético del pepino injertado en calabaza deja de ser el habitual de pepino y cambia drásticamente para parecerse al de calabaza (Figura 6).

INTRODUCCIÓN

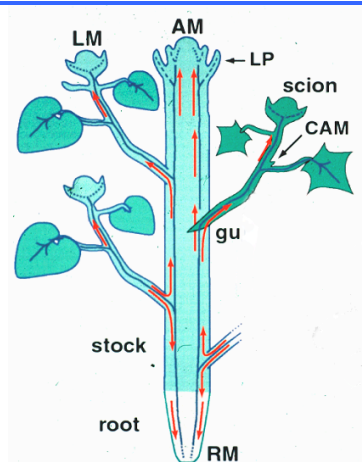


Fig. 6a.

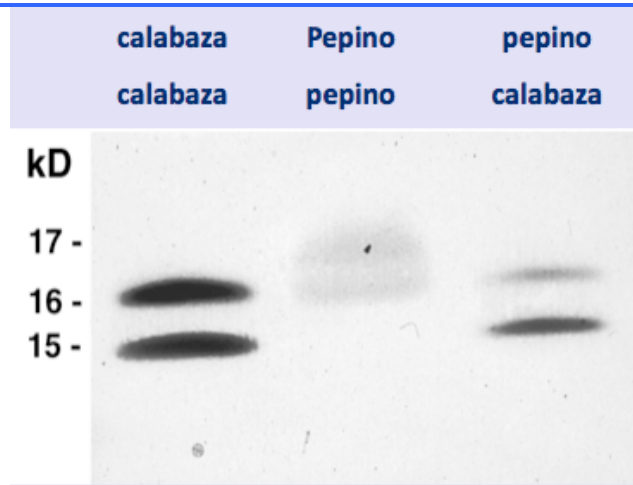


Fig. 6b.

Figura 6. Macromoléculas viajando del portainjerto al injerto. Figura 6a. Vista del heteroinjerto de pepino en calabaza. Figura 6b. Perfil electroforético de proteínas de floema en homoinjertos calabaza/calabaza, pepino/pepino y del heteroinjerto pepino/calabaza.

Otra evidencia de que las células del injerto y del portainjerto son capaces de intercambiar macromoléculas, entre ellas material genético, la encontraron Stegemann y Bock (2009); cuando injertaron plantas de tabaco con distintos marcadores moleculares (GFP y YFP) y de resistencia sobre plantas silvestres, observaron que las células cercanas al injerto sufren intercambio de estos marcadores moleculares (Figura 7). El mecanismo mediante el cual ocurre el intercambio no ha sido identificado, además, las células del injerto sufrían transformación genética, siendo capaces de sintetizar las proteínas reporteras del portainjerto; se desconoce si es movimiento de DNA directamente o es por medio de un mediador de RNA.

Stegemann y Bock no concluyen de manera tajante que las proteínas GFP y YFP viajaron en el floema o bien lo que se desplazó fue el transcrito y éste posteriormente se tradujo a proteína en células distantes, pues mediante Northern blot ellos detectan que los mensajeros tienen la capacidad de viajar del portainjerto al injerto (Figura 8), tal como había sido demostrado previamente en 1999 por Ruiz-Medrano *et al.*, que el floema transporta RNAm. Pero aun se desconoce hasta la fecha si el RNAm que viaja en floema se traduce en tejidos distantes y luego se degrada o bien se recombina con el DNA genómico de la planta posterior a su retrotranscripción, y lleva a cabo una transformación de las células receptoras. Se sospecha que esto último se lleva a cabo con ciertos mensajeros de floema, es decir que puedan recombinar con promotores más fuertes que lleven a cabo la sobreexpresión de dichos genes

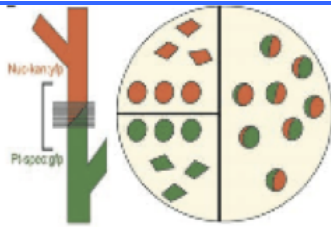


Figura 7a.

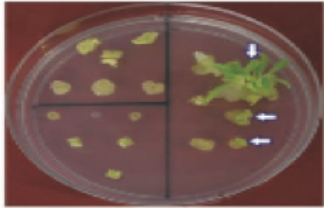


Figura 7b.

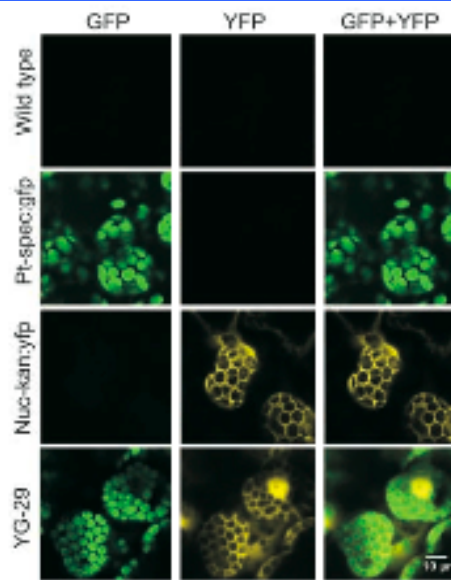


Figura 7. Plántulas intercambian marcadores moleculares en injertos de tabaco. Figura 7a. Esquema de cómo se realizó en injerto en plantas de tabaco y posteriormente las células del injerto fueron cultivadas en caja petri para su posterior regeneración a planta entera. Figura 7b. Caja petri conteniendo células del injerto a partir del cual se generan plántulas. Figura 7c. Células cercanas al injerto observadas bajo microscopio confocal, mostrando que hubo entre ellas intercambio de marcadores moleculares (GFP y YFP). Tomado de Stegemann y Bock (2009).

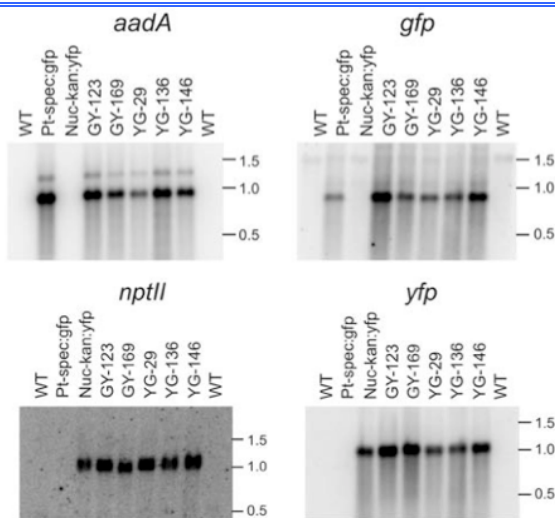


Figura 8. Northern blots de distintas clonas de los injertos de tabaco. En la Figura se evidencia que el RNAm de distintos mensajeros pudo viajar del portainjerto al injerto. Entre los mensajeros detectados están los dos genes reporteros YFP y GFP. De Stegemann y Bock (2009).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte en referencia a RNAs presentes en floema, se han logrado identificar más de 1200 RNAs, siendo éstos miRNA, siRNA, RNAm, con distintas funciones celulares (Yoo *et al.*, 2004; Lough y Lucas, comunicación personal); por otra parte se puede apreciar la abundancia de proteínas en floema mediante geles de proteínas tal como lo muestra la Figura 9 (Lin *et al.*, 2009). A pesar de este hecho, se desconoce cual es la función del transporte de RNAs en savia; es actualmente una incógnita si dichos RNAs son internalizados en tejidos blanco para traducirse en ribosomas activos o forman parte de un sistema de regulación de la expresión génica (Yoo *et al.*, 2004). Pero cabe la posibilidad de que algunos de ellos estén involucrados en el mecanismo mediante el cual Stegemann y Bock observaron el intercambio de información genética entre células del injerto y del portainjerto.

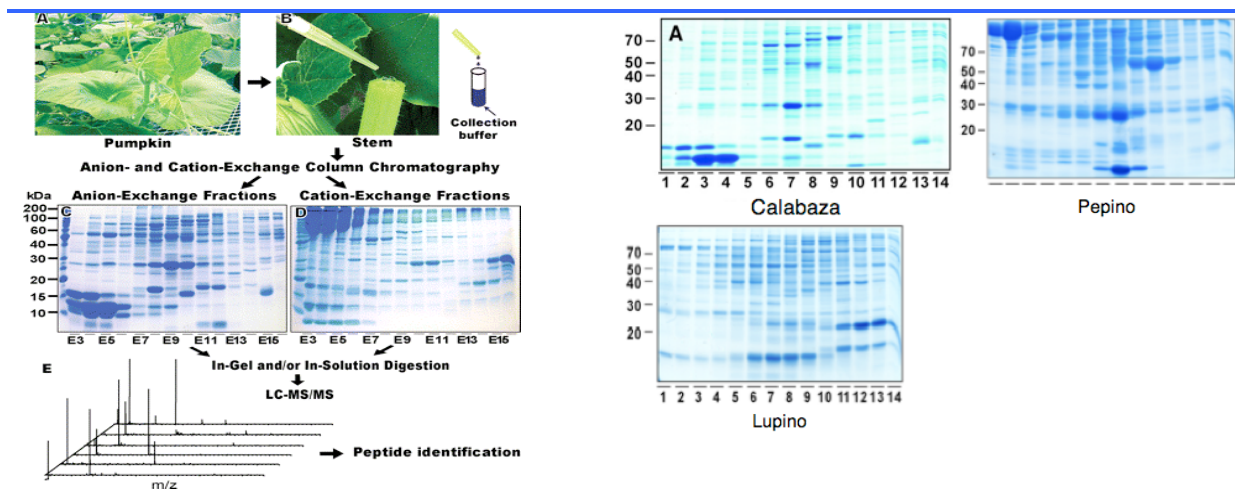


Figura 9. Gel de proteínas de floema de distintas dicotiledóneas. Se lleva a cabo un tamizado mediante el uso de resinas de intercambio iónico y aniónico y las fracciones son corridas en gel de poliacrilamida. Figura 9a. Proceso de obtención de los geles de proteínas de floema. Figura 9b. Vista de la riqueza de proteínas contenidas en la savia de distintas dicotiledóneas.

3.1.4.- Importancia de la regulación del transporte en plantas.

En las plantas se han encontrado evidencias de que señales viajan de un lugar a otro por medio del tejido vascular, pero es más en el floema que xilema. Tales señales se ven involucradas en fenómenos como respuesta de defensa a patógenos, distribución de nutrientes, inducción de la floración, dominancia apical, etc. En la respuesta a patógenos por parte de las plantas se han propuesto hormonas vegetales y otras moléculas relativamente pequeñas como señales, pero evidencias más recientes sugieren que proteínas y ácidos nucleicos podrían también serlo, considerando el transporte de virus dentro de plantas por floema y la propagación del silenciamiento génico postranscripcional (Ruiz-Medrano *et al.*, 2001).

INTRODUCCIÓN

El ácido salicílico es capaz de inducir genes de defensa en hojas no infectadas, pero no es la señal móvil misma, aunque esto aun no es concluyente. Experimentos recientes han demostrado en *A. thaliana* que una proteína de unión a lípidos es necesaria para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida, lo que podría sugerir que las señales móviles son también de naturaleza lipídica (revisado por Xu y Dong, 2013). Por otra parte, el daño mecánico por insectos activa genes de inhibidores de proteasas, altamente tóxicos para éstos. Señales transportadas en el floema también inducen estos genes en hojas intactas (Xu y Dong, 2013). En algunas especies se ha encontrado que un péptido sintetizado en la célula acompañante, la sistemina, es la señal transportada (Lough y Lucas, 2006). La presencia de una variedad amplia de proteínas ayuda a la coordinación del metabolismo, del desarrollo, y de la respuesta de la defensa. Se ha sugerido que los virus de la planta son transportados de manera pasiva por flujo a granel. Un análisis extenso de la GFP expresada en células acompañantes reveló se movió de manera no selectiva en los tubos de floema indicando que también se mueve por flujo de masas (Zambryski *et al.* 2000). Sin embargo, debe considerarse que GFP no es el mejor control, en primer lugar por su estructura cilíndrica que le puede permitir moverse con cierta facilidad a través de plasmodesmos; y, en segundo lugar, se ha demostrado que cuando se expresa en célula acompañante pero controlada su expresión por un promotor más débil (*rolC*, en lugar de *SUC2* como en el caso ya citado) no se observó movimiento al elemento criboso (Lalonde *et al.*, 2003).

3.2.- GERALIDADES DE LA CALABAZA

3.2.1.- Características físicas de la calabaza

La calabaza (*Cucurbita maxima*) es una planta herbácea anual cultivada por su fruto, flor y semilla. Es de tallos flexibles y trepadores, tiene hojas cordiformes, pentalobuladas, de gran tamaño y nervaduras bien marcadas; presenta abundante pilosidad en hojas y tallo. Las flores son amarillas, de pétalos carnosos, monoicas; las flores pueden ser masculinas o femeninas (Figura 10), siendo mucho más abundantes las flores masculinas que las femeninas, que en verano puede casi no tener flores femeninas, las cuales tienen inducción por frío. El fruto es un tipo de baya llamada pepónide; presenta gran variación (polimorfismo); puede ser elongado o esférico, de color verde a naranja intenso (Esquinas-Alcázar, 1983).

La pulpa es de color amarillo-anaranjado, densa, de textura firme y de sabor dulce. La flor y el fruto de *C. maxima* se consumen como verdura; el fruto se conserva, en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad, hasta seis meses, es rico en beta-caroteno y glucosa.

INTRODUCCIÓN



Figura 10a. Flor masculina de *C. maxima*



Figura 10b. Flor femenina de *C. maxima*

Figura 10. Flores de *C. maxima*. Véase que la Figura 10b la flor muestra una protuberancia correspondiente al ovario que posterior a la fecundación, dará origen al fruto.

La calabaza contiene en su interior numerosas semillas ovales, convexas, lisas, de 2 a 3 cm de largo, las cuales a su vez contienen una pulpa blanca y comestible. Es originaria de América, donde se desarrolla de forma silvestre en centro y Sudamérica. Hoy se cultiva extensamente en regiones templadas y subtropicales de todo el mundo. Prefiere suelos ligeros, silíceos, bien drenados y con mucha humedad; no resiste heladas ni sequías. Se cosecha alrededor de seis meses después de la plantación.

Las plantas se clasifican por su tipo de fotosíntesis en C3, C4 y CAM. La calabaza es una planta tipo C4. Las plantas C4 y CAM han desarrollado una estrategia de fijación de CO₂ que les permite minimizar las pérdidas de agua por transpiración, y esto es realizando la fase oscura de la fotosíntesis durante la noche. Además de que cuentan con un mecanismo más eficiente para canalizar el CO₂ hacia la RuBisCO. Asimismo han desarrollado una anatomía particular en las hojas puesto que no sólo las células del mesófilo presentan cloroplastos, como en el metabolismo de las plantas C3, sino que estos organelos también están presentes en las células de la vaina de los haces vasculares. En lugar de fijar directamente el CO₂ en el ciclo de Calvin como lo hacen las C3, las plantas C4 fijan el CO₂ uniéndolo al fosfoenol piruvato y formando un ácido orgánico de cuatro carbonos, el ácido oxalacético, y tienen la capacidad de regenerar el CO₂ en los cloroplastos de las células de la vaina. Estas células utilizan el CO₂ para sintetizar carbohidratos por la vía clásica C3. Para este proceso, los estomas están abiertos durante la noche, reduciendo así la pérdida de agua por transpiración.

3.2.2.- Estudios Bioquímicos y fisiológicos en calabaza

C. maxima hibrida con facilidad con otras especies de *Cucurbita*, aún con otros géneros afines. Desde el punto de vista básico, la calabaza representa un modelo para el estudio del tejido vascular en plantas, ya que las cucurbitáceas se pueden obtener grandes cantidades de exudados, a diferencia de plantas mucho más estudiadas como *Arabidopsis thaliana* donde esto no es posible. Lough y Lucas (2006) han logrado aislar del floema de calabaza proteínas y RNAm, también han logrado comprobar que las macromoléculas que transporta el floema de calabaza son sintetizadas en la célula acompañante, translocadas a tubos cribosos maduros y transportadas a larga distancia a tejidos consumidores, donde se especula que son tejidos blanco para dichas señales.

De las proteínas que han sido analizadas en el floema se han encontrado que tienen homología con proteínas con funciones antioxidantes, unión a RNA, traducción, reguladores del transporte de proteínas y RNA, movimiento de vesículas, proteólisis, entre otras (Lin *et al.*, 2009). A pesar de esta ventaja, la secuenciación de su genoma no se ha realizado y tampoco ha sido transformada de manera estable. Sin embargo, se cuenta con la proteómica y transcriptómica del floema de la variedad de calabaza *Big Max* (Sanjur *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2009). También se ha caracterizado el uso de codones de *C. maxima*, el cual es de vital importancia conocer para expresar proteínas transgénicas (Figura 11).

Cucurbita maxima [gbpln]: 65 CDS's (24707 codons)											
fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])											
UUU	20.3	(501)	UCU	12.7	(313)	UAU	12.3	(304)	UGU	7.3	(181)
UUC	26.5	(654)	UCC	15.6	(386)	UAC	15.7	(389)	UGC	7.9	(194)
UUA	9.7	(239)	UCA	10.2	(253)	UAA	1.6	(39)	UGA	0.8	(20)
UUG	24.3	(600)	UCG	9.8	(241)	UAG	0.2	(6)	UGG	16.6	(410)
CUU	17.8	(441)	CCU	14.5	(359)	CAU	14.6	(361)	CGU	6.6	(162)
CUC	17.6	(434)	CCC	8.9	(221)	CAC	11.9	(295)	CGC	5.6	(139)
CUA	7.1	(176)	CCA	14.9	(369)	CAA	21.0	(518)	CGA	6.6	(162)
CUG	12.7	(313)	CCG	10.0	(246)	CAG	14.2	(352)	CGG	5.1	(125)
AUU	24.3	(600)	ACU	13.8	(340)	AAU	20.2	(498)	AGU	8.3	(205)
AUC	20.2	(498)	ACC	11.7	(289)	AAC	26.8	(661)	AGC	12.0	(296)
AUA	12.4	(307)	ACA	8.3	(204)	AAA	27.7	(684)	AGA	16.9	(417)
AUG	24.7	(611)	ACG	6.2	(153)	AAG	38.6	(954)	AGG	12.2	(302)
GUU	22.8	(563)	GCU	24.2	(598)	GAU	31.0	(765)	GGU	18.0	(445)
GUC	13.6	(337)	GCC	16.9	(417)	GAC	25.2	(623)	GGC	16.4	(406)
GUA	7.6	(188)	GCA	15.5	(384)	GAA	35.1	(867)	GGA	22.1	(547)
GUG	22.0	(543)	GCG	10.6	(261)	GAG	39.8	(984)	GGG	14.4	(357)
Coding GC 47.30% 1st letter GC 52.45% 2nd letter GC 38.05% 3rd letter GC 51.39%											

Figura 11. Uso de codón de *C. maxima*

INTRODUCCIÓN

La transformación de plantas mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes* resulta de transferir un fragmento del plásmido Ri (*Root inducing*) a las células de las plantas causando la proliferación de raíces (“*hairy roots*”). Aunque *A. rhizogenes* es infeccioso para gran cantidad de dicotiledóneas diversas especies de importancia agrícola no han podido ser transformadas a la fecha. En el caso de Cucurbitaceae, previos estudios (Katavic *et al.*, 1991; Smarrelli *et al.*, 1986) reportan dificultades para realizar la transformación estable de especies como *C. pepo* L. y *C. maxima* Duch., infectados con *A. rhizogenes* variedades ATCC 15834, NCPPB 8196 y NCPPB 2659. Por lo que lograr la transformación exitosa de la calabaza abriría las puertas a nuevos estudios para inferir el papel de múltiples macromoléculas que se desplazan en el floema.

3.3.- TRANSFORMACION GENETICA

3.3.1.- Generalidades de la transformación de células.

Se dice que las células son transformadas cuando se les introduce material genético, al hacer esto las células adquieren alguna característica. Este fenómeno ocurre en la naturaleza sin la intervención del hombre, y se puede reproducir *in vitro*. Las distintas técnicas de transformación se dividen en directas, induciendo la permeabilidad de la célula al DNA (mediante electroporación, agentes químicos, microláser, microinyección, ultrasonidos o bombardeo), e indirectas mediante el uso de vectores tanto biológicos (*Agrobacterium*, virus) como no biológicos (liposomas).

La transformación tiene la finalidad de que las células transformadas incorporen y expresen una secuencia extraña de DNA dentro de su genoma. Más específicamente, el sistema de transformación debe permitir:

- Introducción de la (s) secuencia(s) e integración estable al genoma
- Selección eficiente de las células transformadas
- Regeneración completa de las células que expresen los genes deseados.

El éxito de un método reside en la obtención de muchas células regenerables, la optimización del modo de transferencia y las técnicas de selección y regeneración (Chen *et al.*, 2004).

3.3.2.- Técnicas de transformación directa

Las técnicas de transformación directa se vuelven ineficientes entre mayor es el grosor de la pared celular; por lo que raramente se han aplicado en tejidos leñosos. La pared celular dificulta el paso de moléculas de más de 4.9 Kb, por lo que habitualmente estas técnicas se aplican sobre protoplastos o bien sobre células cuya pared ha sido parcialmente digerida; por ello las monocotiledóneas, las legumbres y las plantas leñosas, fueron anteriormente considerados recalcitrantes a la transformación y que carecían de la capacidad biológica de ser transformadas. Sin embargo todo es cuestión de desarrollar las técnicas adecuadas para cada especie, ya que la mayoría de estas plantas han podido ser transformarse de manera estable. Un buen ejemplo es el caso del arroz (Raineri, *et al.*, 1990).

La electroporación consiste en la aplicación de un campo eléctrico a protoplastos para inducir un cambio en el potencial de membrana de la célula. Esto da lugar a la aparición de “microporos” que la hacen permeable a moléculas de gran tamaño (Fromm, *et al.*, 1987), incluso ha funcionado en células provistas de pared celular (Lindsey y Jones, 1990). La aparición de poros o aperturas en la pared y membrana celular también se puede provocar mediante la utilización del láser (Weber *et al.*, 1998) o de ultrasonidos. Otra estrategia consiste en la utilización de polietilenglicol (PEG) que es un polímero capaz de aumentar la permeabilidad de la membrana (Krüger-Lebus y Potrykus, 1987).

Otras técnicas directas no requieren el manejo de protoplastos para obtener un mayor rendimiento, como son la microinyección y la biolística. La primera consiste en la inyección de disoluciones de DNA directamente en el interior de la célula. Con esta técnica se puede llegar incluso al núcleo celular (Neuhaus y Spangenberg, 1990) y en principio sería válida en todas las especies vegetales. Sin embargo, tiene la desventaja de requerir un elevado grado de manipulación y la transformación se realiza en células individuales, lo que lo convierte en un proceso muy laborioso, que requiere una alta especialización y que consume una gran cantidad de tiempo.

El bombardeo de partículas para la introducción de DNA en las células fue introducido en 1987 por Sanford y sus colaboradores con el nombre de “biolística”. El sistema consiste en términos generales en disparar micropartículas de aproximadamente 1µm de diámetro cubiertas con DNA hacia tejidos o células. El daño celular es uno de los principales factores que dificultan la recuperación de transformantes y se observó posteriormente que tanto el trauma físico causado por el impacto del gas y el shock acústico así como la toxicidad del tungsteno contribuían a este daño celular y reducían la eficiencia de la transformación. Además el porcentaje de transformación estable es escaso, ya que la probabilidad de que el DNA se inserte en los cromosomas es bastante baja.

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las células vegetales en las combinaciones correctas de hormonas pueden ser totipotenciales y los individuos regenerados a partir del tejido bombardeado suelen ser quiméricos. La técnica fue mejorada usando partículas de oro y un acelerador de partículas con flujo de helio. Algunos problemas asociados con la biolística como método para la transformación vegetal incluyen la frecuente integración de múltiples copias de los transgenes (Sanford, *et al.*, 1993).

3.3.3.- Técnicas de transformación indirecta

Las técnicas indirectas utilizan vectores para introducir el DNA foráneo. Se pueden citar la utilización de vesículas lipídicas o liposomas en el interior de las cuales se pueden incluir las moléculas de DNA. El DNA penetra al interior celular bien por fusión entre la membrana celular y el liposoma o bien mediante un proceso de endocitosis. Esta técnica ha tenido poca aplicación debido a su baja eficiencia de transformación estable y la limitación del tamaño de la molécula de DNA (10 kb), aunque parece adecuada para transfecciones con RNAs virales.

Los virus también pueden ser utilizados como vectores genéticos los cuales son modificados mediante ingeniería genética de tal manera que tienen la capacidad de infectar, autoduplicarse y duplicar el gen o genes quiméricos que al mejorador le interesan sin causar síntomas indeseables ni pérdidas en la producción. Como ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor se ha usado para la expresión de genes foráneos en plantas (Fütterer *et al.*, 1990).

Ciertos elementos cromosómicos y extracromosómicos parecen tener la capacidad de introducir e incorporar material genético en el genoma de las células y son potenciales vectores genéticos. Se han utilizado algunos de estos elementos para transformar células animales aunque aún no se han utilizado en plantas.

Quizás la técnica más versátil y ampliamente utilizada sea la transformación mediada por *Agrobacterium*, que es un caso particular de organismo procarionte capaz de introducir un fragmento de DNA en las células vegetales e insertarlo en el genoma. Además sus genes son reconocidos y expresados por la célula eucarionte.

INTRODUCCIÓN

3.3.4.- Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

Agrobacterium es un género de bacterias capaces de infectar a un gran número de plantas, especialmente dicotiledóneas, las infecciones se pueden dar en la parte subterránea de la planta, ya sea a nivel de raíz o en la parte aérea de las plantas. Las especies más trabajadas en el laboratorio son *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*.

Agrobacterium es una bacteria Gram negativa que infecta a células vegetales dañadas generando tumores (las células vegetales pueden proliferar sin necesidad de agregarles fitoestimuladores), *A. tumefaciens* genera la condición conocida como enfermedad de las agallas de la corona mientras que *A. rhizogenes* es capaz de transformar las raíces y ocasiona que éstas crezcan de manera tumoral, por ello ambas especies se utilizan ampliamente en laboratorio para cultivo de células vegetales *in vitro* y para introducir genes específicos en las plantas, ya que la transformación genética que puede realizar es estable (Figura 12). La bacteria es capaz de modificar el metabolismo de la planta haciendo que sintetice aminoácidos modificados conocidos como opinas, que tienen la función de alimento para la bacteria ya que sólo pueden ser metabolizadas por la planta, además son específicas para cada cepa determinada, lo que les confiere una gran ventaja ecológica ya que crea su propio nicho eliminando la competencia intraespecífica.

Figura 12a.



Figura 12b.

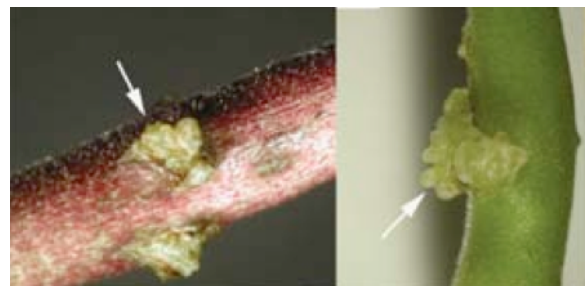


Figura 12a. Tumores vegetales formados mediante el uso de *Agrobacterium*. Figura 12a. Tumores de raíces obtenidos con *A. rhizogenes*. Figura 12b. Tumores de tallo obtenidos con *A. tumefaciens*. (Estrada-Navarrete *et al.*, (2007).

INTRODUCCIÓN

Se han observado tumores de *A. tumefaciens* bajo condiciones naturales en 643 especies de dicotiledóneas y gimnospermas (McLean, *et al.*, 1998). El género *Agrobacterium* es el único conocido capaz de transformar genéticamente una célula vegetal. Los crecimientos tumorosos son el resultado de la integración estable en el genoma vegetal de un segmento de DNA, el cual interviene en los cambios metabólicos y tiene los genes responsables de la transferencia y posterior inserción de este DNA, al cual se le ha denominado T-DNA (DNA transferido) y éste se encuentra codificado en el plásmido Ti (tumor-inducing), el cual está presente en un pequeño porcentaje de las poblaciones naturales de *A. tumefaciens*. El T-DNA contiene genes que codifican para las hormonas vegetales auxina y citocinina que funcionan como reguladores de crecimiento y son responsables del fenotipo tumoroso (Zupan y Zambryski, 1996).

El T-DNA está delimitado por bordes de 25 nucleótidos que son las secuencias reconocidas por la maquinaria de transferencia; cualquier DNA entre estos bordes será transferido al DNA de la célula vegetal, los bordes reciben los nombres de borde derecho RB (*Right Border*) y borde izquierdo LB (*Left Border*).

El T-DNA puede integrarse en diferentes lugares en el cromosoma vegetal (Stam *et al.*, 1997). Y es deseable que esta integración sea de un bajo número de copias para que no se presenten los mecanismos de silenciamiento génico. Para controlar la transcripción el T-DNA contiene secuencias eucarióticas promotoras como las cajas TATA y CAAT, así como las señales de poliadenilación de transcritos (McLean, *et al.*, 1998).

En el plásmido Ti se pueden apreciar distintas regiones que son conocidas como la región OPS y la región OPC, relacionadas con la síntesis y catabolismo de las opinas. También se encuentra la región *vir* (de virulencia) con genes que controlan la transferencia del T-DNA, y la región ONC con genes responsables de la aparición del tumor mediante el aumento de la síntesis de auxinas y citocininas que estimulan el crecimiento y la división celular. Dentro del T-DNA sólo se encuentran las regiones OPS y ONC (Figura 13).

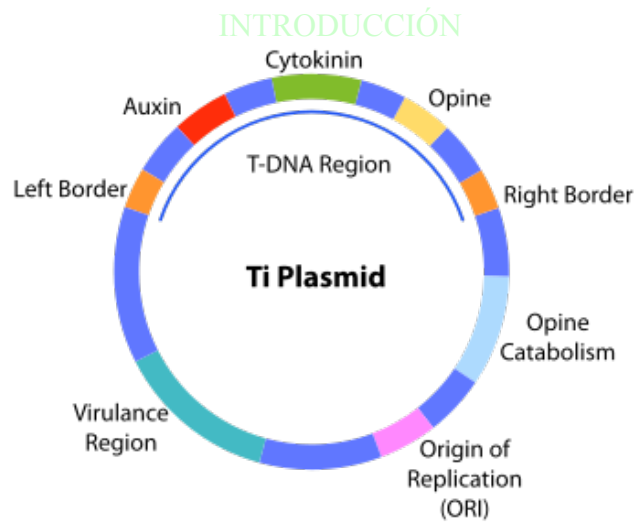


Figura 13. Plasmido Ti. (Tomado de Hartwell, Genetics 4th. Edition)

En células de tabaco transformadas con *Agrobacterium* se observó que la expresión del fenotipo tumoral permitía su crecimiento de estas células en cultivo sin la adición de fitohormonas como la auxina lo cual resultaba conveniente para la selección, en un cultivo celular, de las células exitosamente transformadas. Desgraciadamente, este carácter no permite la regeneración de plantas fértiles normales a partir de los tumores, y se hizo necesaria la creación de cepas de *A. tumefaciens* sin los genes para la síntesis de fitohormonas y su remplazo por otro gen marcador seleccionable (Braun y Wood, 1976). La maquinaria genética y bioquímica que interactúa en el proceso infección de *Agrobacterium tumefaciens* es muy complejo y no solo depende la bacteria sino también participan proteínas y genes de la planta, este proceso se esquematiza en la Figura 14.

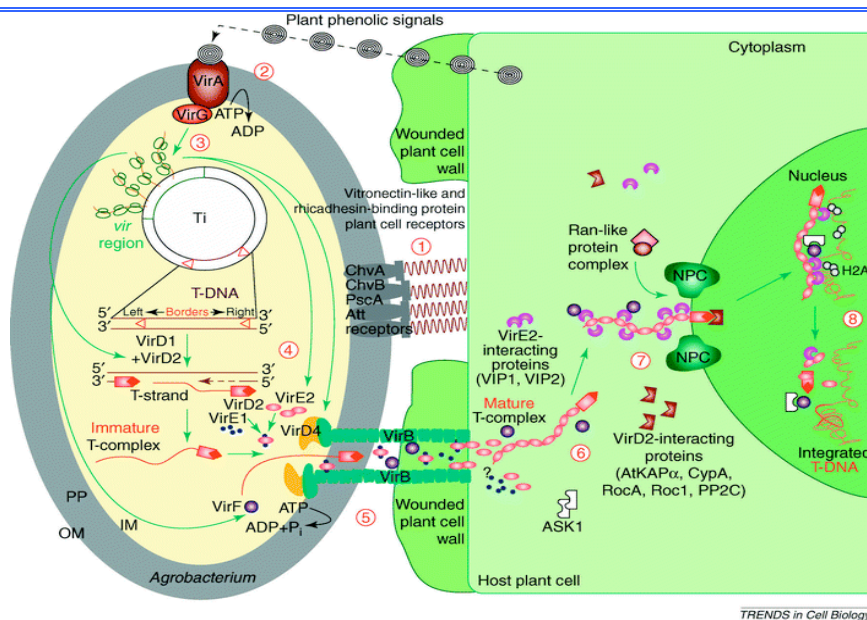


Figura 14. Maquinaria Bioquímica y Genética involucrada en la infección de *A. tumefaciens* silvestre. (Tzfira y Citovsky 2002)

INTRODUCCIÓN

Un gen marcador construido por Fraley y colaboradores en 1983, de la compañía Monsanto, es el de la neomicina fosfotransferasa II (*NPTII*) unida en ambos extremos a las regiones regulatorias 5' y 3' del gen de la nopalina sintetasa (NOS), proveniente del plásmido Ti, el cual se expresa de manera constitutiva en la células de las plantas superiores. El gen *NPTII* provee a las células vegetales de resistencia contra el antibiótico kanamicina, lo cual resolvió el problema de contar con un marcador para la selección de las células transformadas. En el caso del arroz y otras gramíneas se utiliza el gen de la higromicina fosfotransferasa (HPTII), de resistencia a la higromicina, debido a la alta resistencia natural a la kanamicina de las células bajo cultivo (Rainieri *et al.*, 1990). Con este avance los investigadores de Monsanto lograron regenerar plantas completas a partir de células de petunia y tabaco a las cuales se les introdujo el gen promotor (p) NOS-*NPTII*-terminador (T) NOS, que fueron capaces de reproducirse y producir semillas viables que heredaron el gen de manera mendeliana. El plásmido con los genes *vir* se denomina plásmido “asistente”. Hoy en día los vectores de *Agrobacterium* usados para la transformación de plantas son del tipo denominado *vectores binarios*, debido a que, a diferencia de los *vectores cointegrados*, las secuencias a ser transferidas al genoma de la planta están en un plásmido separado de los genes de la región *vir* (McLean, *et al.*, 1998). El uso de los vectores cointegrados está limitado por las posibles secuencias de recombinación para la cointegración de las secuencias deseadas en el plásmido Ti (Bevan, *et al.*, 1984). La región *vir* consta de casi 20 genes (Tabla 1), los cuales están divididos en varios operones que juegan distintas funciones en el proceso de infección (Zupan 1995 y McLean, 1998).

Tabla 1. Función de los genes *vir*.

Gen.	Función.
<i>VirA</i>	Codifica para proteínas que regulan los genes <i>vir</i> . Es receptor de los compuestos fenólicos.
<i>VirB</i>	Determina el sistema de transferencia conjugativo
<i>VirC</i>	Estimula la formación de tumores.
<i>VirD2</i>	Se une covalentemente a la T-DNA en su extremo 5' y determina la transferencia ya que tiene una secuencia de localización nuclear en su C-terminal.
<i>VirE2</i>	Recubre al T-DNA para protegerle de nucleasas durante el trayecto al núcleo de la célula vegetal.
<i>VirF</i>	Viaja independiente al T-DNA e incrementa la eficiencia de transformación.
<i>VirG</i>	Codifica para proteínas que regulan los genes <i>vir</i> activándolos, después de que <i>virA</i> se ha fosforilado en un residuo de aspartato.

INTRODUCCIÓN

Además de los genes bacterianos incluidos en el plásmido, para que la bacteria sea capaz de infectar las células vegetales, son necesarios genes cromosómicos de virulencia *chv*, implicados tanto en el movimiento quimiotáctico bacteriano como en la unión de la bacteria a receptores específicos de la célula vegetal. Para su uso la bacteria es desarmada por delección de la región *ONC* y las regiones *OPS* y *OPC*. De esta manera obtenemos un plásmido Ti no oncogénico que mantiene la capacidad de transformación con el gen o los genes de interés entre los bordes del T-DNA.

Por su parte *A. rhizogenes* contiene un plásmido llamado Ri que induce la formación de raíces por lo que su utilización con especies leñosas difíciles de enraizar es de gran interés. Los genes implicados en esta inducción son *rol A*, *rol B* y *rol C*, situados en el T-DNA, *rol B* parece ser el más importante en el proceso de enraizamiento. En el caso de transformación mediada por *A. rhizogenes* se suele utilizar el plásmido Ri sin desarmar y, además, se introduce otro plásmido con los genes foráneos entre los bordes reconocidos por la maquinaria de transferencia. En este caso la región *vir* actúa tanto en *cis* como en *trans*, es decir, a la célula vegetal son transferidos tanto el T-DNA de *A. rhizogenes* como los genes quiméricos. El gen bacteriano *ipt*, situado en el T-DNA, está implicado en la síntesis de citocininas. Provoca un aumento en los niveles endógenos de éstas citocininas y reduce la dominancia apical, haciendo que la planta tenga un aspecto más achaparrado. Esto da la posibilidad de obtener árboles más pequeños, más ramificados y con igual o mayor producción frutícola, optimizando así la relación producción-superficie cultivada. Este gen ya ha sido introducido en melocotonero con buenos resultados (Smigocki y Hammerschlag, 1991).

La transformación con *A. rhizogenes*, ó bien con *A. tumefaciens* portando el gen *rol B* en un vector binario, asiste la introducción de genes que incrementan la síntesis de citocininas que genera fenotipos que enraizan más fácilmente (Rugini y Mariotti, 1991).

Los procedimientos de transformación con *Agrobacterium* siguen los mismos pasos básicos generales, la bacteria puede ser inducida para la transformación con el uso de inductores de genes *vir* tales como la acetosiringona o extractos de tejidos dañados. Para verificar que las células obtenidas al final del proceso han sido transformadas de manera estable no basta con asumir que las que han sobrevivido el proceso de selección con antibióticos es porque integraron los genes deseados en el genoma. Siempre existe la posibilidad de protección cruzada por productos microbianos de bacterias contaminantes o de la selección de mutantes resistentes al agente de selección. Se requieren pruebas genotípicas a través de un análisis Southern utilizando sondas para los genes introducidos ó se puede confirmar analizando por PCR (Rao y Rohini, 1999).

INTRODUCCIÓN

Se requiere además una prueba fenotípica que muestre expresión estable de los genes introducidos y en muchos casos se utiliza el gen “reportero” de la β -glucuronidasa o GUS (*uidA*) con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), para el caso de plantas, el cual puede ser detectado con medios espectrofluorofotométricos o histoquímicos. Se asume que a la hora de aplicar el método con fines prácticos, el gen reportero puede ser reemplazado por un gen de interés económico o científico. (Blanco *et al.*, 1982)

3.4.- GENES REPORTEROS.

3.4.1.- Generalidades de proteínas utilizadas como reporteras de la transformación. En un ensayo de transformación son muy pocas las células que llegan a ser transformadas; y con los genes marcadores es posible reconocerlas y seleccionarlas. Los genes marcadores se introducen junto con el gen quimérico que deseamos expresar en la planta. Hay dos tipos de marcadores, de selección e informadores.

3.4.2.- Marcadores de selección. Confieren ventaja a las células transformadas frente a las no transformadas en un medio selectivo. El agente selectivo suele ser un antibiótico o un herbicida. Dentro de estos genes el más utilizado es el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia frente a antibióticos de la familia de los aminoglicósidos, como la kanamicina, mediante la fosforilación del antibiótico. Son menos los casos en que se utiliza el gen de resistencia a higromicina (*hpt*) o el gen de resistencia al herbicida Basta. Teóricamente, la adición al medio de la sustancia tóxica es suficiente para la selección de las células transformadas, estableciendo previamente la concentración de dicha sustancia que inhibe la regeneración para cada una de las especies, variedades o tipo de explante correspondientes. (Miki y McHugh, 2004).

3.4.3.- Marcadores de información. Proveen a la célula que los ha incorporado una característica que la hace distinguible de las demás. Suelen ser genes que codifican para enzimas que actúan sobre sustratos cromogénicos o fluorogénicos de tal manera que cuando añadimos el sustrato al medio podemos identificar las células transformadas visualmente. El más usual es el gen que codifica a la β -glucuronidasa aislado de *E. coli*, que hidroliza β -glucurónidos. Si incubamos las células con el sustrato incoloro 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc) aparece un precipitado azul sobre las células transformadas. Con esta enzima también se puede usar el sustrato 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (4-MUG) el cual al ser hidrolizado forma un compuesto fluorescente, 4-metilumbeliferona (MU), que se puede medir por fluorimetría. Existen muchos marcadores de información y de selección, como se muestra en la Tabla 2 (Vancanneyt *et al.*, 1990. Shimomura *et al.*, 2000).

INTRODUCCIÓN

Tabla 2.- Genes marcadores más comúnmente utilizados.

	Nombre	Siglas
Resistencia a antibióticos	Kanamicina fosfotransferasa	APH(3')II
	Higromicina fosfotransferasa	HYG
	Gentamicina acetiltransferasa	GENT
	Neomicina fosfotransferasa	NPT II
	Estreptomicina fosfotransferasa	STR
	Resistencia a bleomicina	BLE
Inhibidores metabólicos	Dihidrofolato reductasa	DHFR
	EPSP sintasa	EPSPS
	Acetolactato sintasa	ALS
	Bromoxynil nitrilasa	BNR
	Fosfinotricina acetiltransferasa	PAT
Actividad enzimática	Nopalina sintasa	NOS
	Octopina sintasa	OCS
	Cloranfenicol acetiltransferasa	CAT
	β -glucuronidasa	GUS
	β -galactosidasa	LAC
	Luciferasa bacteriana	LUX
	Luciferasa de luciérnaga	LUC
	Proteína amarilla fluorescente	YFP
Proteína verde fluorescente	GFP	

Otro marcador relativamente nuevo es la proteína verde fluorescente, GFP. Este gen proviene de la medusa *Aequorea victoria* y codifica una proteína que al ser excitada con luz azul o ultravioleta emite una fluorescencia verde. Este sistema permite detectar las células transformadas de una manera no destructiva y sin necesidad de añadir ningún sustrato al medio (Shimomura *et al.*, 2000). Los genes marcadores no se expresan en la bacteria, de lo contrario sería imposible detectar si la expresión del gen se debe a células del material vegetal o a la expresión de la proteína en *Agrobacterium*.

Para que GFP sea un buen marcador debe ser imposible que lo exprese *Agrobacterium*, para ello se recurre a distintas estrategias, por ejemplo, introducir un intrón en el gen de tal manera que sólo puede expresarse correctamente en una célula eucariota, ya que la bacteria carece del sistema de maduración de RNAm necesario para la eliminación de dicho intrón. Otra posibilidad es poner los genes bajo el control de un promotor específico de eucariotas como son el CaMV 35S. Estos promotores pueden ser constitutivos, es decir, la proteína que está bajo su control se expresa continuamente, o bien pueden ser inducibles, de tal manera que el gen sólo se expresará en unas determinadas condiciones, como pueden ser un sustrato específico, un aumento de la temperatura o un cambio en el pH.

INTRODUCCIÓN

Aunque con los marcadores genéticos se seleccionan las células y los individuos que han sido transformados, para disponer de una prueba definitiva de la integración de los transgenes se utilizan técnicas moleculares como la PCR y especialmente la prueba de hibridación molecular Southern blot. Si estas pruebas son positivas, la integración de los transgenes en el genoma de la planta se ha producido sin lugar a dudas.

3.4.4.- Generalidades de GFP.

La proteína verde fluorescente (GFP *Green Fluorescent Protein*) fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* por Osamu Shimomura en 1962. A partir de unas 50,000 medusas se lograron aislar solo décimas de gramo de proteína. Este bajo contenido de proteína se debe a que la medusa vive en casi total oscuridad y su cuerpo es prácticamente transparente, por lo que requiere de muy pocas cantidades para hacer que su cuerpo fluoreszca. Además la medusa tiene otra proteína en su cuerpo, la aequorina, que es una proteína bioluminiscente y emite en el espectro visible de color azul; es esta proteína la que da la bioluminiscencia a la medusa ya que la GFP fluoresce ante su luz emitida (Shimomura *et al.*, 2000).

El gen de GFP fue aislado en 1990 por Douglas Prasher y esto permitió su uso en biología molecular. Después se obtuvo de manera recombinante al ser expresada en *E. coli*. Desde entonces se ha logrado la producción “masiva” de esta proteína, obteniendo en un litro de medio de cultivo la cantidad de proteína que Shimomura obtuvo con 50,000 medusas; Desde entonces se le han hecho mutaciones para obtener distintas gamas de colores que son expresables tanto en procariotes y eucariotes (Figura 15).

La GFP no requiere gasto energético para su actividad, la expresión del gen depende únicamente de la disponibilidad de oxígeno molecular, es fotoestable, tolera la fusión con otras proteínas y se detecta fácilmente bajo el microscopio. Esto le valió diversas aplicaciones como marcador. Por ejemplo, Chytilova *et al.* crearon plantas de *A. thaliana* transformadas con una señal de localización nuclear vegetal, el gen de la GFP y *uidA*, este último agregado para aumentar el tamaño de la proteína quimérica y evitar su movimiento a través de los poros de la membrana nuclear. Se usaron dos tipos de promotores, el 35S del CaMV y los promotores KAT1 y CoYMV, específicos para ciertos tejidos. Las plantas transformadas eran normales en apariencia, desarrollo y fertilidad. El fenotipo resultante permitió realizar estudios *in vivo* de la forma y movimiento nuclear, la división celular y las actividades transcripcionales de los dos tipos de promotores usando microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal de rastreo de láser (Chalfie *et al.*, 1994).

INTRODUCCIÓN

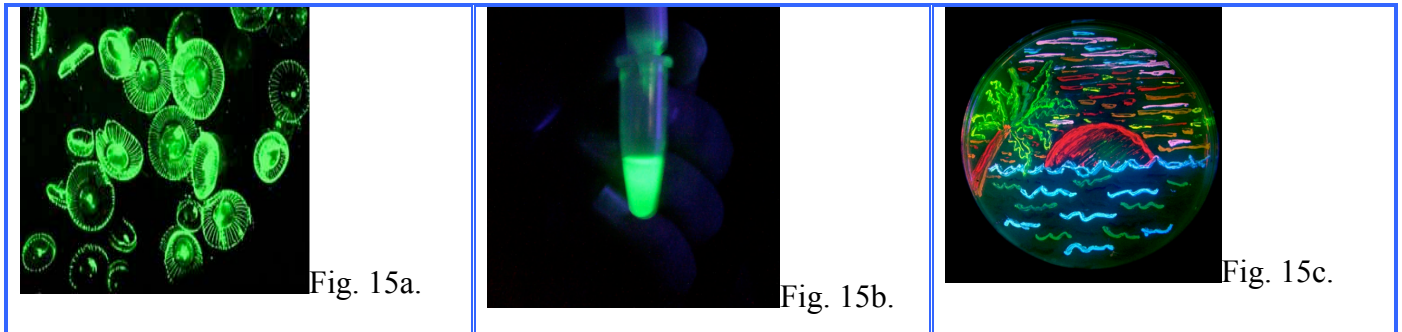


Figura 15. Expresión de GFP. Fig. 15a. La medusa *Aequoria victoria*. GFP tiene la cualidad de absorber en 488 nm, que corresponde al color azul, y este esta longitud de onda donde el humano tiene menor capacidad de captar la luz, y hemite en 507 nm siente esta frecuencia a la cual el ojo humano tiene mayor sensibilidad a la luz. Por ello como se muestra en la Fig. 15b. (Vista de la proteína pura ante luz azul) en una aparente oscuridad casi total, la proteína emite mucha luz, pero esto es aparente, ya que la abundancia relativa de fotones es la misma para la azul que para la verde, nuestra capacidad de percibir los colores da este efecto. Fig. 15c. Células de *E. coli* expresando distintas proteínas fluorescentes derivadas del GFP. (Shimomura *et al.*, 2000, Prasher *et al.*, Chalfie *et al.*, 1994).

Pese a lo provechoso que fue obtener la EGFP, era deseable contar con otros colores de proteínas para ser usados de manera simultánea, por ello, para obtener más variedades de proteínas fluorescentes se recurrió a la modificación de la estructura primaria de la GFP, y ahora se tienen de distintos colores como la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*), y la BFP (*Blue Fluorescent Protein*). La diferencia de color entre estas proteínas es básicamente una mutación puntual en el sitio cromóforo, ya que su estructura tridimensional es prácticamente la misma (Tabla 3).

Sin embargo estas nuevas proteínas también fueron modificadas para que tuvieran mayor tiempo de emisión, y se obtuvieron las proteínas mejoradas como la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), la EBFP (*Enhanced Blue Fluorescent Protein*), la ECFP (*Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) y la EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), que tienen prácticamente el mismo espectro de emisión que las proteínas que les dieron origen (Figura 16), pero su tiempo de emisión es mayor y son producto de mutaciones puntuales. La EGFP se encuentra en forma de monómeros de 29 kDa (265 aminoácidos), tiene sus máximos de emisión y absorción en $Ex / Em = 489 / 509$ nm que son idénticos a la nativa. Los anticuerpos anti-GFP también son capaces de reconocer la EGFP y a las otras variantes de GFP. También se le ha dado gran aplicación en otros análisis tales como Western blot, citometría de flujo, microscopía fluorescente, microinyección, etc.

INTRODUCCIÓN

Tabla 3: Tipos de proteínas fluorescentes. **(Tomado del PDB)**

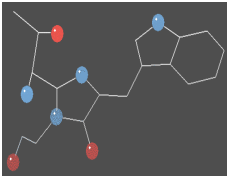
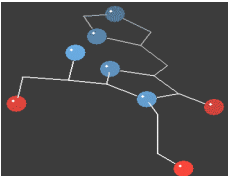
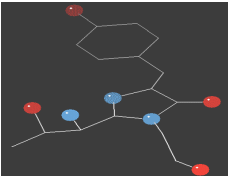
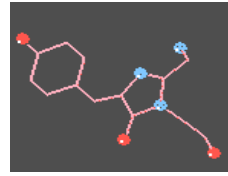
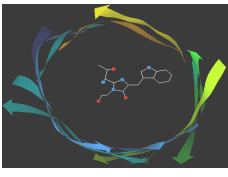
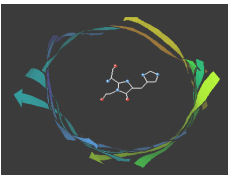
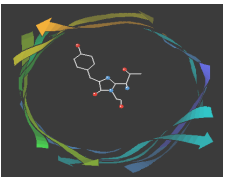
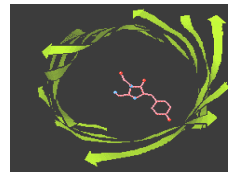

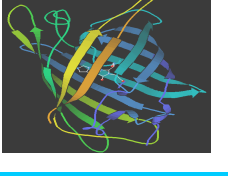

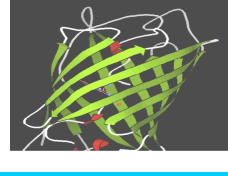
Color de la proteína fluorescente				
	Violeta	Azul	Verde	Amarillo
Nombre común	CFP	BFP	GFP	YFP
Clave del PDB	1cv7	1bfp	1ema	1yfp
Grupo cromóforo				
Barril b y grupo Cromóforo				
Estructura tridimensional				

Figura 16: Espectros de excitación y emisión de las distintas proteínas fluorescentes mejoradas.

(Miyawaki *et al.*, 2005)

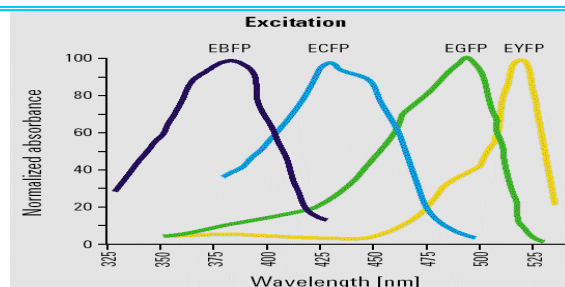


Figura 16a. Espectro de excitación de las distintas proteínas fluorescentes mejoradas.

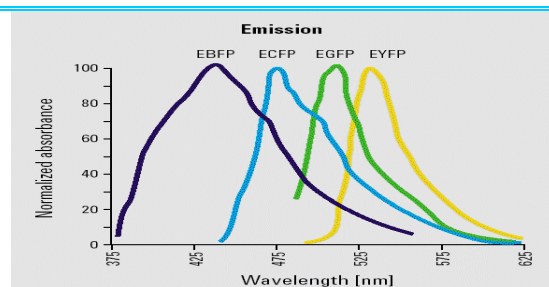


Figura 16b. Espectro de emisión de las distintas proteínas fluorescentes mejoradas..

Debido a la facilidad relativa para observar GFP se le encontraron rápidamente aplicaciones para observar microestructuras en células animales, pues simple y sencillamente es lo único que fluoresce bajo el microscopio cuando se observan células expresando este gen (Figura 17a). Sin embargo en células vegetales hay múltiples complicaciones.

INTRODUCCIÓN

Las primeras plantas que fueron transformadas con GFP, no la expresaban; el análisis de la secuencia encontró que debido al uso de codones, las plantas no poseen los mismos codones que la medusa y por ello no había tRNA para lograr una traducción completa. Esto se solucionó modificando la secuencia del DNA, para que estar adaptado al uso de codones de plantas. En el marco abierto de lectura no solo encuentras el uso de codón, sino que también los intrones no son iguales los que reconocen las plantas y los animales. Actualmente la EGFP que se usa en plantas y en animales ya trae estas modificaciones para que se puedan expresar sin problemas en cada célula donde se introduce y cada vector comercial debe especificar para que variedad de organismos es apto su uso.

El segundo problema es que en plantas casi todas las estructuras son fluorescentes, desde la pared celular que contiene celulosa y absorbe en violeta e índigo y emite en azul, hasta los pigmentos antioxidantes y fotosintéticos que absorben en casi toda la gama de luz visible y emiten la inmensa mayoría en rojo (Figura 17b) pues es ahí donde las clorofilas tienen su máximo de absorción. Por ello es necesario que cuando se observe la EGFP en plantas se haga con el uso de microscopía confocal para separar las distintas longitudes de onda en las cuales una muestra puede emitir, cuando esto se lleva a cabo correctamente se puede el color rojo correspondiente principalmente a la clorofila y el verde de la EGFP por separado en las muestras como se ve en la Figura 17c.

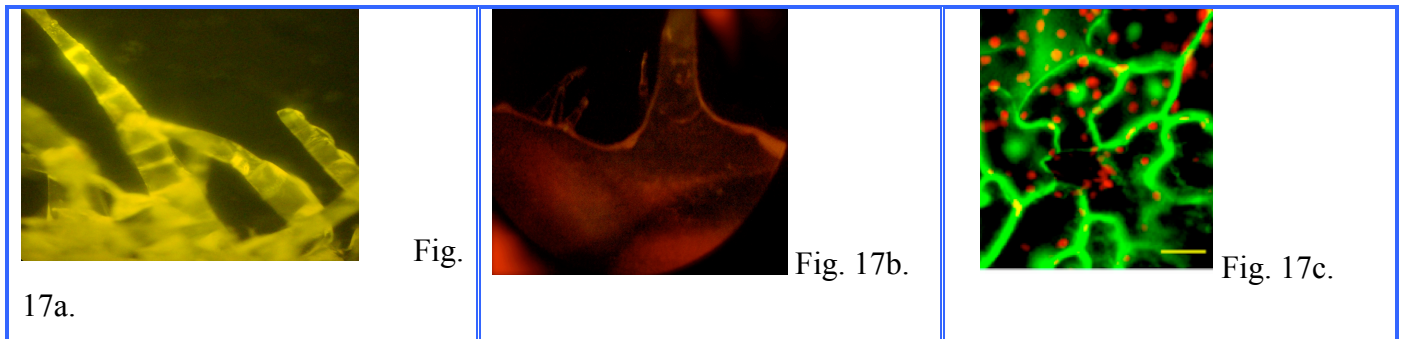


Figura 17. Imágenes de GFP y clorofila. Fig. 17a. Tricomas GFP. Fig. 17b. Imagen de la clorofila en tricomas silvestres. Figura 17c. Imagen de GFP y clorofila. **(Tomado de Stegemann y Bock 2009)**

Asimismo si no se lleva a cabo la observación de GFP con el equipo adecuado, se pueden tener falsos positivos (Figura 18). Por ello es preferible utilizar para su observación el microscopio multifotónico que es más sensible y puede separar longitudes de onda separadas entre sí por 5nm. Mientras que el confocal al trabajar con filtros de luz, no puede separar longitudes de onda, sino solo filtrar las que pudieran dar lugar a errores en la observación antes de que éstas ondas lleguen a la muestra, una vez que se ha dado la interferencia, el microscopio confocal poco puede hacer para corregir el falso positivo.

INTRODUCCIÓN

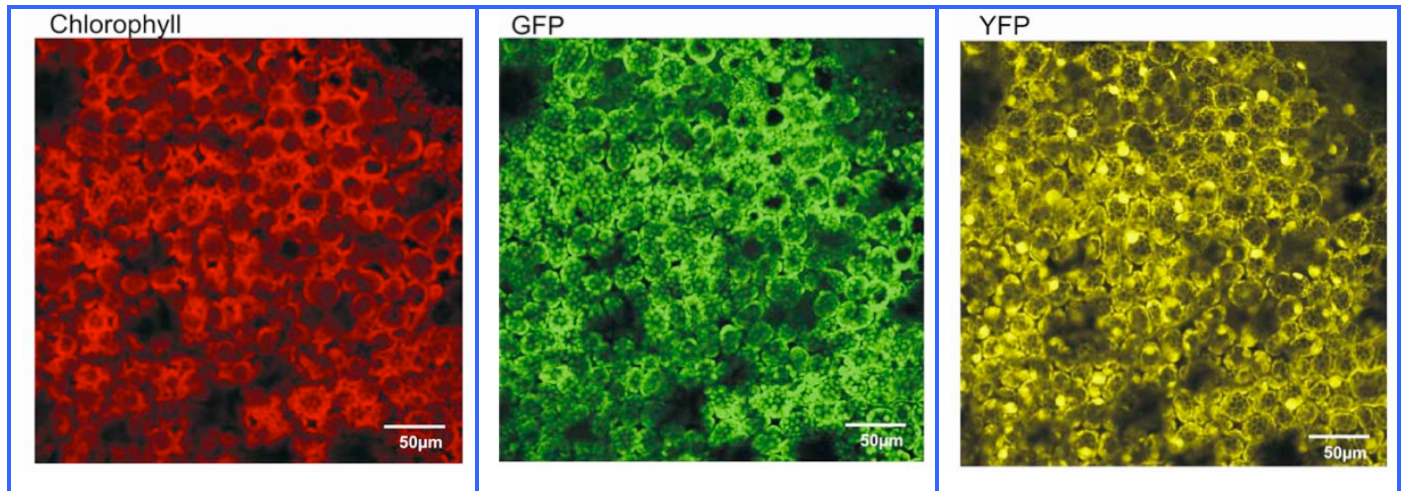


Figura 18: Vista de tejido de tabaco expresando GFP y YFP. Puede observarse que los sitios donde se emite el color rojo de la clorofila, el verde de la GFP y el amarillo de la YFP son prácticamente los mismos. Esto debido a que el microscopio confocal usado no poseía la sensibilidad necesaria para separar los espectros. (Tomado de Stegemann y Bock, 2009).

Es imposible determinar el canal real por el cual se da la emisión, ya que las plantas pueden emitir en todo el espectro visible (Figura 19). El microscopio multifotónico posee varios tipos de láser y varios tipos de filtros y no solo puede filtrar las ondas que pueden dar lugar a falsos positivos, sino que puede separar ondas de similar frecuencia y mostrar solo en una frecuencia deseada, lo cual permite que se detecten simultáneamente varios canales.

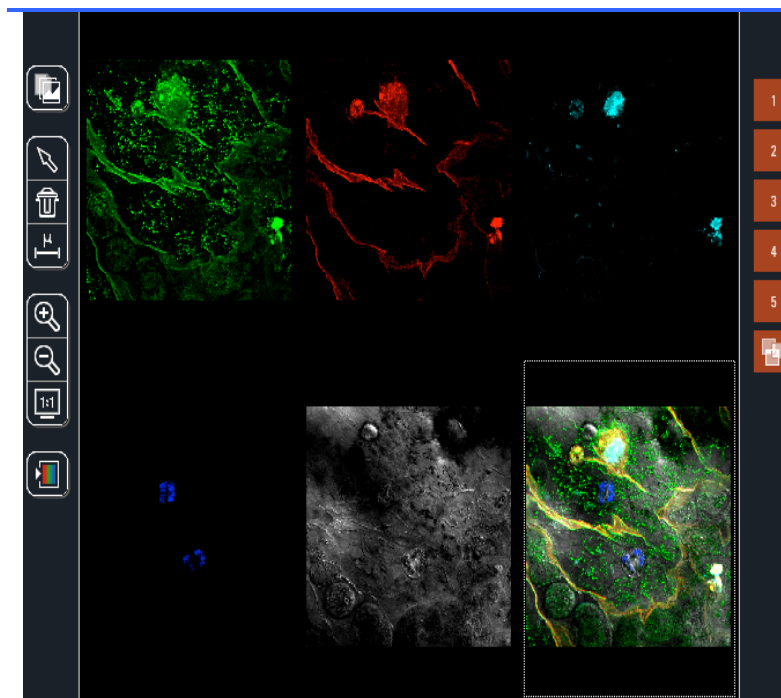

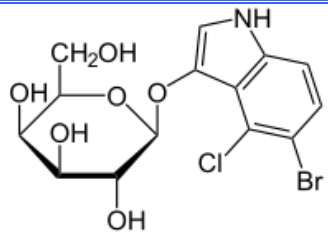



Figura 19. Corte de pétalo de flor de calabaza visto en microscopio multifotónico. En el primer cuadrante es transmisión en la región del verde (autofluorescencias), seguido de la región roja (clorofila), ultravioleta, azul (Pigmentos antena), campo claro y finalmente el solapamiento de todos

INTRODUCCIÓN

3.4.5.- Generalidades de la β -glucuronidasa.

La β -glucuronidasa (GUS) es miembro de las glicosidasas; su función es el rompimiento de complejos que tengan carbohidratos. Suele formar dímeros o tetrámeros (Figura 20a). El gen que codifica para la enzima se llama *uidA*; y es un gen reportero muy utilizado en plantas y bacterias para evidenciar de manera rápida la transformación y puede utilizar como sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) cuya estructura se muestra en la figura 5b. Este sustrato al ser hidrolizado, produce un compuesto (indolil) que es un precipitado insoluble, color índigo (Figura 20c). En plantas para su fácil visualización se lleva a cabo la decoloración del tejido.

		
Figura 20a.- Tetrámero simétrico de la β -glucuronidasa.	Figura 20b.- Estructura del X-gal.	Figura 20c.- Planta de <i>Arabidopsis</i> expresando GUS
Figura 20.- Detalles de la β -glucuronidasa.		

3.5.- Proteínas involucradas en el transporte de macromoléculas en floema

En homoinjertos no se ve modificado el perfil electroforético de las proteínas que se encuentran en el floema; mientras que cuando se hacen heteroinjertos, el perfil electroforético del injerto tiende a parecerse al portainjerto, lo cual indica que macromoléculas presentes en el floema del injerto son sintetizados en células del portainjerto fotosintetizador; esto ha servido de modelo de estudio del movimiento de macromoléculas (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999). Se tiene la suposición que tanto proteínas como RNA son capaces de transportarse desde sus lugares de síntesis en células distantes del portainjerto hasta el injerto. En las plantas se han encontrado evidencias de que señales viajan de un lugar a otro por medio del tejido vascular, pero estas señales móviles se han caracterizado más en el floema.

INTRODUCCIÓN

Las señales que viajan en floema se ven involucradas en fenómenos tales como la respuesta de defensa a patógenos, distribución de nutrientes, inducción de la floración, dominancia apical, etc. En la respuesta a patógenos por parte de las plantas se han propuesto hormonas vegetales clásicas y otras moléculas relativamente pequeñas como señales, pero evidencias más recientes sugieren que proteínas y ácidos nucleicos podrían también serlo, considerando el transporte de virus dentro de plantas por floema y la propagación del silenciamiento génico postranscripcional (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

Otras macromoléculas que podrían ser señales que se transportan por el floema son lípidos y péptidos como la γ -sistemina, en el caso de respuesta de defensa contra patógenos (Lough y Lucas, 2006; Fu y Dong, 2013; ver sección anterior).

3.5.1.- Generalidades de la CmPP16.

Se han encontrado macromoléculas en floema con propiedades informacionales, tales como RNAm y proteínas como CmPP16 lo que sugiere que éstas podrían constituir también señales que intercomunican tejidos distantes. El estudio del transporte de virus dentro de plantas ha apoyado dicha noción. CmPP16 es una proteína que se une inespecíficamente a RNAm y lo puede transportar a través del floema distancias considerables (Xoconostle-Cazares *et al.*, 1999).

La proteína de movimiento CmPP16 aislada de floema de calabaza debe las siglas Cm al nombre de la especie vegetal de la que fue aislada (*Cucurbita maxima*), PP del inglés Phloem Protein y además pesa 16 kDa. Esta proteína parece tener funciones reguladoras, puede unir RNA independientemente de su secuencia y transportarlo de una célula a otra a través de plasmodesmos (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999). Esto sugiere que existe RNAm desplazándose en el floema. Efectivamente, la savia de floema contiene una gran variedad de RNAs, algunos de los cuales codifican proteínas que potencialmente regulan el desarrollo de plantas (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

CmPP16 fue descrita al identificarse proteínas en savia de floema de calabaza. Para entrar a esta corriente del floema, una molécula debe pasar a través de canales estrechos que alimentan a determinadas células llamados tubos cribosos. Los canales son demasiado pequeños para dejar pasar moléculas grandes, pero los virus se las arreglan para mediar el movimiento usando proteínas de movimiento viral. Se supuso que las proteínas de movimiento viral estaban imitando proteínas endógenas que hacen lo mismo en la planta. Para encontrar proteínas (cuya existencia era aun hipotética), se usaron anticuerpos específicos para diferentes proteínas de movimiento viral. Después se detectó la proteína y posteriormente el RNAm que la codifica en los elementos cribosos, que por sí solos no tienen núcleo y por lo tanto no producen

INTRODUCCIÓN

RNA_m o maquinaria para hacer proteínas. Esto sugería que tanto la proteína como el RNA_m se habían transportado de las células adyacentes de la calabaza. Para probar la idea, se inyectaron CmPP16 y una variedad de moléculas de RNA_m dentro de células de plantas y se encontraron dichas moléculas en células vecinas. Finalmente, mediante el injerto de una planta de pepino en una calabaza, se demostró que CmPP16 y su RNA_m podían viajar grandes distancias ya que se trasladó al pepino injertado (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999).

Existe selectividad en el transporte de macromoléculas en el floema; ya que al introducir directamente CmPP16 en floema de arroz (*Oryza sativa*) por medio de estiletes de áfidos, ésta se mueve larga distancia (Aoki *et al.*, 2005). Se ha demostrado que ciertos RNAs juegan un papel la regulación del desarrollo de órganos y tejidos a distancia, aunque el papel de CmPP16 aún no está definido. El análisis detallado del movimiento de las proteínas CmPP16-1 y CmPP16-2 reveló que no siguieron simplemente la dirección del flujo de floema sino que se mueve preferencialmente a la raíz (Aoki *et al.*, 2005).

CmPP16-1 interactúa recíprocamente con proteínas específicas incluyendo el factor de traducción eucariótico 5A, y la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) que regula proliferación y desarrollo en eucariontes (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). CmPP16-2 obra recíprocamente con las mismas proteínas, pero su movimiento a la raíz posiblemente se regula positivamente por la presencia de estas proteínas.

3.5.2.- Generalidades de la proteína KNOTTED.

Los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo el desarrollo y la diferenciación de las células del meristemo para la formación de órganos, son poco conocidos. Sin embargo a través de mutaciones naturales o inducidas es posible conocer un poco del mecanismo mediante los cuales esto sucede. Hake en 1989 observó que mutaciones dominantes en un gen que denominaron *KNOTTED-1* inducían alteraciones en el desarrollo de las hojas de maíz (es dominante porque *KNOTTED-1* se expresa en cambium, lugar donde la silvestre no presenta expresión); este gen fue clonado e integrado a un sistema de transposición, para inducir transposición en la progenie; y todos los alelos diferentes hallados eran distintos unos de otros. Después Vollbrecht *et al.* (1991) demostraron que *Knotted-1* es una proteína con homeodominio (Figura 21); esto fue la primera vez que se encontraba una proteína vegetal que podía ser asociada a la super familia de genes homeóticos, reguladores maestros del desarrollo. Muchos genes homeóticos de animales juegan un papel muy importante en su desarrollo, incluyendo los patrones de diferenciación de los embriones en insectos y en vertebrados, así como el destino de muchas células en la formación de tejidos (McGinnis y Krumlauf, 1992).

INTRODUCCIÓN

El análisis molecular de varios mutantes dominantes de *KNOTTED-1* mostraron que estas mutaciones son causadas por cambios en porciones del gen que no codifican para proteína. El alelo *KNOTTED-1-O* es causado cuando las secuencias se duplican en tándem (Veit *et al.*, 1990).

Las mutaciones en los intrones (regiones no codificantes), muestran alteraciones en los patrones de expresión, lo cual sugiere que los intrones están involucrados en la regulación del gen; y eso puede hacer que se exprese de manera ectópica en maíz (Hake *et al.*, 1992). También se encontró que la proteína *KNOTTED-1* es capaz de unir su propio RNA, y viajar a través de plasmodesmos; con ello es capaz de alterar el destino celular, que está dado principalmente por la posición más que por el linaje; *KNOTTED-1* demostró ser un factor influyente en el destino celular (Lucas *et al.*, 1995).

3.6.- Cambios fisiológicos en las plantas durante la sequía.

De entre los tipos de estrés a los que se enfrentan las plantas uno de los más importantes es el estrés hídrico. Existen muchos mecanismos por los cuales las plantas pueden hacer frente a este estrés. Siendo la resistencia a la sequía el mecanismo por el cual una planta es capaz de sobrevivir a un periodo prolongado de déficit hídrico, disminuir sus funciones fisiológicas y posteriormente recobrarlas al término de este periodo. Mientras que la tolerancia a sequía consiste en soportar cierto nivel de déficit hídrico y por un tiempo relativamente corto si se le compara con la resistencia a sequía y aunque pueden mantener sus funciones fisiológicas a bajos potenciales de agua, presentan un limitado desarrollo (Ramanjulu y Bartels, 2002). Desarrollar el mecanismo de resistencia involucra cambios anatómicos específicos de algunas pocas especies tales como las plantas de resurrección (Figura 21), que puede entrar en una inactividad total sobreviviendo a una desecación casi total y es capaz de restablecer todas sus funciones en pocas horas al estar en abundancia de agua; las numerosas modificaciones anatómicas que tienen estas plantas hace imposible de transferir esta estrategia natural a plantas de interés agrícola.



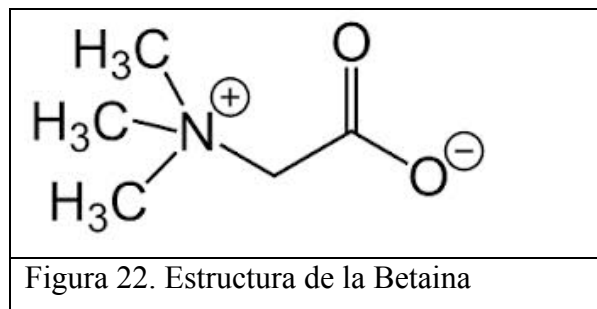
Figura 21.- La planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en sus distintas fases. A- Cuando es sometida a estrés hídrico severo y cuando se encuentra recuperada de ese estrés (B).

INTRODUCCIÓN

La tolerancia, puede involucrar mecanismos relativamente simples y fáciles de aplicar como la acumulación de agua u osmolitos o responder de manera más rápida a los estímulos de déficit hídrico, entre otras adaptaciones a nivel bioquímico, fisiológico y a nivel molecular, aunque también puede involucrar cambios anatómicos (Xoconostle-Cazares *et al.*, 2010). Otra estrategia empleada por las plantas consiste en evitar la pérdida de agua por transpiración mediante el cierre de estomas, dicho proceso es regulado por el ácido abscísico.

Los estomas son células altamente especializadas que participan en el intercambio gaseoso y pueden representar una importante vía de pérdida de agua; la adaptación a la sequía consiste en el cierre de éstos durante el estrés (Blum, *et al.*, 1996). Esta adaptación implica la acumulación de gases como CO₂ con una marcada disminución en la fotosíntesis (Bohnert y Sheveleva, 1998). El resultado es un desequilibrio energético en general, en el que el flujo neto de electrones se produce hacia el oxígeno, dando lugar a especies reactivas de oxígeno e incremento en los procesos oxidativos (Levine, *et al.*, 1999).

Una adaptación bioquímica común es el ajuste osmótico, que es resultado de la síntesis de nuevos metabolitos, en su mayoría osmolitos. Todos los osmolitos son sustancias altamente solubles en agua que poseen una gran esfera de solvatación cuando tienen alta disponibilidad de agua, mientras que cuando la tensión de agua disminuye, dejan disponible gradualmente agua. La acumulación masiva de estas moléculas permite que se tengan disponibles grandes cantidades de agua para mantener los procesos fisiológicos. Algunas de éstas moléculas son aminoácidos modificados, azúcares, polialcoholes y en casos específicos de algunas plantas se tienen también proteínas; uno de los osmolitos más comunes es la betaína (Figura 22). Para poder ser acumulables en grandes cantidades y poder conferir tolerancia a sequía, los osmolitos deben cumplir con ciertas características como no ser tóxicos aun a altas concentraciones, no interferir con el metabolismo celular y no reaccionar fácilmente en condiciones fisiológicas.



INTRODUCCIÓN

Otros estudios indican que además de lo anterior deben de cumplir con otras características como mantener la turgencia y funcionar como antioxidantes para combatir las especies reactivas de oxígeno que se forman durante el déficit hídrico (Chen y Murata 2002, Bartels y Sunkar, 2005).

En los lugares donde las plantas están sometidas a estrés hídrico, difícilmente es el único estrés al que se encuentran expuestas. Dejando aun lado el estrés por insectos u otro tipo de estrés biótico, hay varios tipos de estrés abiótico que actúan en conjunto con el estrés hídrico, que juntos pueden llevar más rápido a una planta al colapso metabólico, entre estos tipos de estrés se encuentran estrés salino, frío y altas temperaturas, tal como sucede en todos los lugares áridos y semiáridos del mundo. Por ello es necesario que toleren esas condiciones las plantas destinadas a la alimentación que son cultivadas en esas regiones. Se ha logrado que mediante la aplicación externa de ABA en plántulas de arroz variedad Khao Dawk Mali 105, éstas sean capaces de mantener mas tiempo su contenido de agua, también incrementan la actividad de la sacarosa-fosfato sintetasa, que está involucrada en la acumulación de sacarosa, tanto en tejidos fotosintéticos como en heterotróficos, ya que se ha comprobado el rol de su producto como un mensajero importante en múltiples procesos (Pattanagul, 2011).

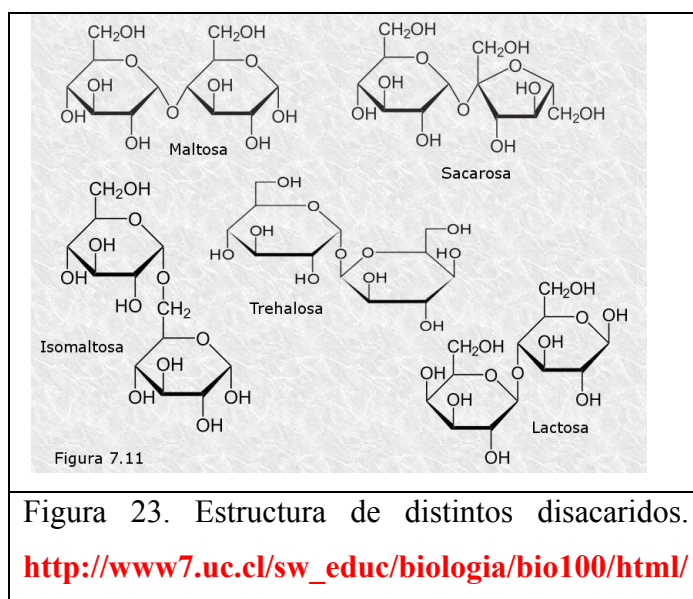
3.6.1.- Papel de la trehalosa en sequía

Los azúcares acumulados bajo condiciones de sequía son capaces de estabilizar las membranas, evitando así su fusión a altas temperaturas. Uno de los carbohidratos más importantes en la tolerancia a sequía es la trehalosa, la cual es un disacárido que se acumula bajo condiciones de sequía, además tiene funciones en desarrollo floral y embrionario, así como en el anabolismo del carbono durante la fotosíntesis (Phillips *et al.*, 2002). Pero no cualquier azúcar puede ser acumulado para obtener protección ante déficit hídrico, sino solamente los azúcares que no posean actividad reductora.

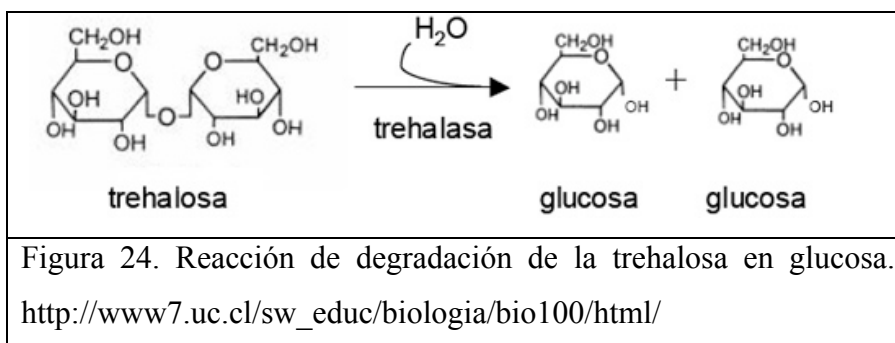
Uno de los azúcares más abundantes en la naturaleza es la glucosa y es de los primeros productos del anabolismo del carbono durante el ciclo de Calvin; sin embargo, no puede ser acumulado para que las plantas aumenten su nivel de tolerancia a estrés hídrico, debido a que es un azúcar reductor, junto con su isómero la fructosa. Ambos son reactivos en sus grupos carbonilos, teniendo un grupo aldehído y ceto respectivamente, los cuales ante la presencia de radicales libres reaccionan con otras moléculas; como resultado de estas reacciones muchas proteínas resultan glicadas y por ende pierden su funcionalidad, resultando en problemas similares en plantas a los que presentan las personas con diabetes en etapas avanzadas, esto debido a que durante el estrés hídrico se forman muchos radicales libres, cosa que en condiciones normales no ocurre.

INTRODUCCIÓN

Las plantas transportan un azúcar no reductor formado por glucosa y fructosa, que es la sacarosa para evitar daño de proteínas por la glicación inespecífica; la cual se forma al unir a estos dos azúcares reductores en su carbono carbonilo, lo cual resulta en un disacárido que no posee actividad reductora y por ende no puede glicar proteínas ante la presencia de radicales libres. De manera análoga pero magnificada, la trehalosa está formada por dos glucosas unidas en su carbono carbonilo, dando como resultado también un disacárido sin actividad reductora (Figura 23).



Se ha logrado mediante ingeniería genética que las plantas acumulen mayores cantidades de trehalosa, ya sea por sobreexpresión de los genes que llevan acabo la ruta biosintética o bien silenciando a la trehalasa que es la enzima que se encarga de su degradación (Figura 24). Estos experimentos han dado como resultado que las plantas sean más tolerantes a sequía, frío y salinidad (Wu y Garg, 2003). Resultados similares se han obtenido mediante la sobreexpresión de las proteínas LEA (Xiao *et al.*, 2007).



3.6.2.- Papel de las proteínas LEA durante la sequía.

Otra molécula muy importante presente en las membranas de células animales es el colesterol, que a bajas temperaturas es capaz de mantener a la membrana fluida y a altas temperaturas es capaz de evitar que se fusionen las membranas. Por ello los animales sometidos a muy altas o muy bajas temperaturas tienen al colesterol en mayor concentración en membrana que animales de clima templado. Por otra parte, las plantas no poseen colesterol o bien lo tienen algunas especies en tan baja concentración que no funciona como estabilizante, por ello requieren de otras biomoléculas que estabilicen la membrana o bien ayuden a mantener los niveles hídricos, es ahí donde entran en juego proteínas especializadas tales como las LEA. En el comienzo del estrés hídrico las plantas comienzan a sintetizar proteínas que tienen la función de proteger la membrana, también en la adquisición de agua e iones, así como su transporte. A diferencia de los carbohidratos durante la sequía que retienen por absorción moléculas de agua y que posteriormente dejan libre conforme avanza el estrés hídrico, las proteínas pueden transportar agua desde fuera de la membrana y transportarla al citosol, tal como lo hacen las aquaporinas. Se ha visto que entre las proteínas que comienzan a sintetizarse en el estrés hídrico se encuentran también las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), que fueron descritas por primera vez por acumularse en embriones (Dure *et al.*, 1981). Éstas, que generalmente se encuentran a niveles basales, pueden ser inducidas y expresarse a niveles altos durante estrés osmótico y sequía (Inglam y Bartels, 1996; Barrera-Figueroa *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta los dominios estructurales, se han identificado cinco grupos de proteínas LEA, formando trímeros y pentámeros con una conformación espiral, su función es coordinar el movimiento de iones durante el estrés para mantener la homeostasis el mayor tiempo posible. (Dure *et al.*, 1989). Cuando se sobre expresan por medio de transformación genética se obtienen plantas con más meristemas radiculares que las plantas silvestres, que por consiguiente son más tolerantes a la sequía (Figura 25).

INTRODUCCIÓN

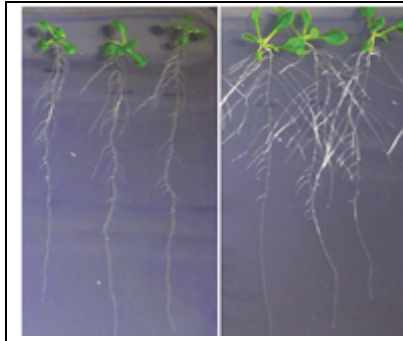


Figura 25. Efecto de sobreexpresión de proteínas LEA en plántulas de *Arabidopsis*. Tienen mayor ramificación radicular que les permite tener mayor grado de tolerancia a sequía. (Sharma *et al.*, 2013)

3.6.3.- Mediciones fisiológicas de cambios ocurridos durante el estrés hídrico.

Cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico, suceden cambios fisiológicos medibles que sirven como parámetro para determinar crecimiento, productividad, adaptación o bien, el grado de resistencia o tolerancia de una planta al estrés hídrico; entre los más importantes se encuentra Fotosíntesis Neta (Photo [=] $\text{mmol}_{\text{CO}_2}/\text{m}^2_{\text{hoja}}\cdot\text{seg}$), Transpiración (Trmmol [=] $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$), Conductividad estomática (Cond [=] $\text{mmol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$), Apertura estomática (C_i), Asimilación de CO_2 (DCO_2 [=] $\text{mmol}_{\text{CO}_2 \text{ asimilado}}/\text{mol}_{\text{aire entrante}}\cdot\text{seg}$), Turgencia, Actividad de Agua intracelular (porcentual), Agua ligada a sales, azúcares y proteínas, Actividad de agua en Suelo (porcentual), Actividad de agua biodisponible (que se maneja también como fracción de agua transpirable [porcentual]), entre otros.

3.6.3.1.- Fotosíntesis.

La fotosíntesis depende de muchos factores tanto biológicos, como químicos y físicos; entre ellos los más directos de los físicos se encuentran: Iluminación (que también involucra el tipo de luz), Cantidad de CO_2 disponible en la atmósfera (el cual a su vez va de la mano con la presión atmosférica), el flujo de aire o intercambio gaseoso.

3.6.3.1.1.- Iluminación.

Dentro de los parámetros que determinan la velocidad de crecimiento de las plantas y la tasa fotosintética se encuentra la iluminación. La luz solar no precisamente es la mejor para las plantas ya que es una mezcla de todas las frecuencias de luz visible (Tabla 4), aunque también tiene infrarrojo y ultravioleta; pero no todas las longitudes son aprovechables, las plantas tienen especial predilección por la luz visible color azul y rojo; ya que estas dos longitudes de onda son lo que pueden asimilar mayoritariamente las clorofilas a y b.

INTRODUCCIÓN

Las plantas también poseen pigmentos antena que pueden captar otras longitudes de onda y transportar esa energía a las clorofilas para que se aproveche. De hecho, la clorofila es verde porque las longitudes de onda, amarilla, verde y naranja no las capta; mas los pigmentos antena son de múltiples colores pues cada uno de ellos absorbe distintas longitudes de onda.


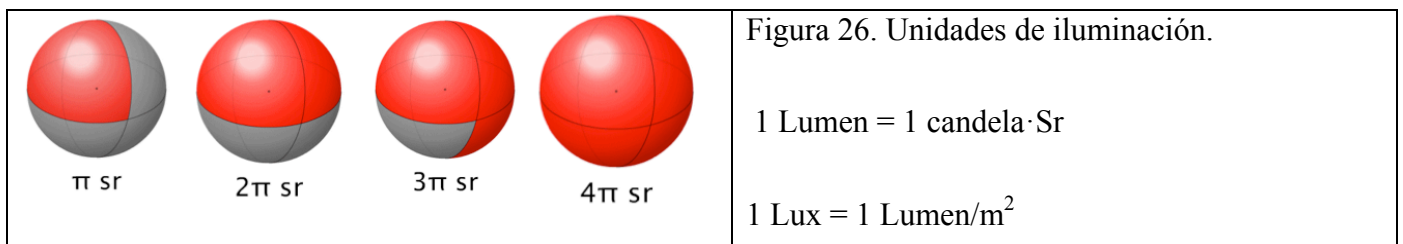
	
violeta	380–450 nm
azul	450–495 nm
verde	495–570 nm
amarillo	570–590 nm
anaranjado	590–620 nm
rojo	620–750 nm

Tabla 4. Tipos de frecuencias que componen la luz visible.

La iluminación tiene 3 escalas de medición. La más convencional es son los luxes. La primera escala de medición fue la candela (candle), que corresponde a la cantidad de luz que emite una vela; por otra parte el área superficial de una esfera se calcula multiplicando el radio al cuadrado por 4π . Cuando el radio no es un parámetro importante se dice que entonces el área es 4π estéreorradianes; y se define como un lumen la unidad de iluminación correspondiente a una candela por estéreorradian (Sr); literalmente si se ponen 4 velas juntas, cada estéreorradian recibe una candela (Figura 26).



Si se dividen las candelas por el área esférica en metros cuadrados de estéreorradianes se obtienen los luxes y son las unidades más utilizadas para describir fenómenos físicos tales como la cantidad de luz que llega a la tierra por parte del sol o la luna (Tabla 5).

INTRODUCCIÓN

Abr.	Ejemplo
50 μlx	Luz de una estrella (Vista desde la tierra)
100 μlx	Cielo nocturno nublado, luna nueva
1 mlx	Cielo nocturno despejado, luna nueva
10 mlx	Cielo nocturno despejado, cuarto creciente o menguante
250 mlx	Luna llena en una noche despejada ¹
1 lx	Luna llena a gran altitud en latitudes tropicales ²
3 lx	Límite oscuro del crepúsculo bajo un cielo despejado ³
50 lx	Sala de una vivienda familiar ⁴
80 lx	Pasillo/cuarto de baño ⁵
4 hlx	Oficina bien iluminada
4 hlx	Salida o puesta de sol en un día despejado.
1 klx	Iluminación habitual en un estudio de televisión
32 klx	Luz solar en un día medio (min.)
100 klx	Luz solar en un día medio (máx.)

Tabla 5. Iluminación en luxes que hay en distintas condiciones. La tierra recibe del sol 100Klx de iluminación, lo cual equivale a 1367 W/m².

Esta unidad es muy arbitraria pues no depende únicamente de la cantidad de energía que recibe una superficie, sino que depende también de la sensibilidad del ojo humano a la frecuencia de la luz. El ojo humano es más sensible para detectar la luz verde por sobre todas las otras frecuencias. Para otras frecuencias como el ultravioleta el ojo humano no responde. Para ello se crearon otras dos unidades de medición que son los Watts/m² y los mol_{foton}/m². Siendo estas últimas las más importantes para reportes científicos que analizan respuestas como el efecto fotoeléctrico o fisiológicas como la fotosíntesis. Ambas son equivalentes una de la otra según la Fórmula 1 (www.ee.unlv.edu/~eebag/).

$I = \frac{P \cdot \lambda}{N_A \cdot c \cdot h}$	<p>Fórmula 1: Fórmula de Avogadro-Planck-Einstein. P = Potencia de iluminación (Watt = Kg·m²/seg³) I = Intensidad de luz (moles de fotones/seg = Einsteins) c = Velocidad de la Luz (2.9979245m/seg) N_A = Número de Avogadro (6.02214x10²³ fotones/mol de fotones) h = Constante de Planck (6.626069x10⁻³⁴ Joule*seg/foton) λ = Longitud de onda (m)</p>
---	---

Para efectos de publicaciones científicas se deben reportar los datos en Einsteins/m². Por ejemplo el rango de crecimiento de Arabidosis thaliana va de 200 a 600 mmol_{foton}/m²·seg. Esto fue determinado en 1997 por *Eckardt et al.*, donde ellos encontraron que al aumentar la intensidad de luz las plantas alcanzan un crecimiento asintótico, este crecimiento va de la mano a la variedad, la línea o la mutante que se trate (Figura 27a). Las plantas una vez que han alcanzado la máxima tasa fotosintética, el excedente de luz no se logra aprovecharla (Figura 27b), teniendo la fotosíntesis un comportamiento similar al modelo de Michaelis-Menten, donde se aconseja trabajar en rangos de iluminación superiores a la media de la tasa fotosintética máxima (*Skillman et al.*, Intechopen, Chapter 3).

INTRODUCCIÓN

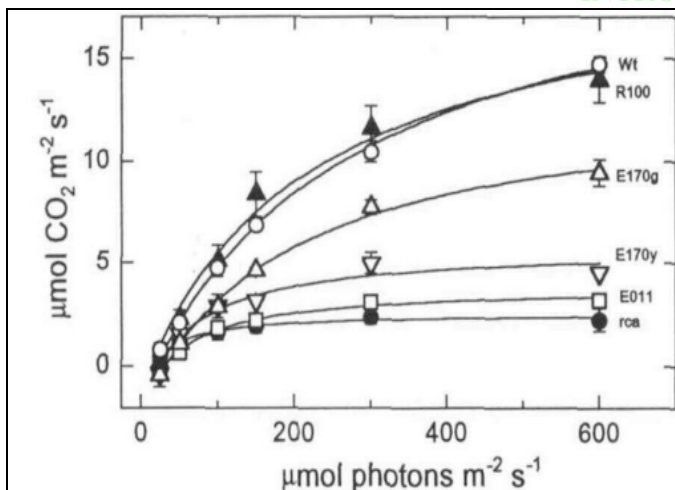


Figura 27a. Incremento de la actividad fotosintética con respecto a la iluminación.

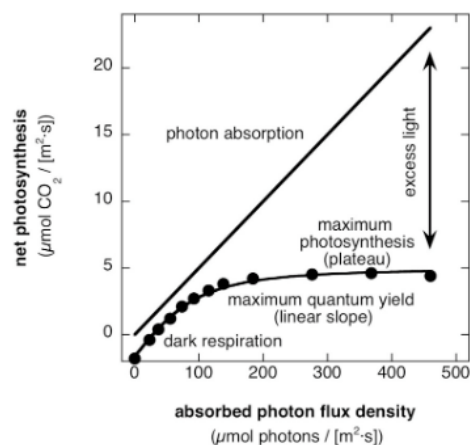


Figura 27b. Modelo tipo Michaelis-Menten en la tasa fotosintética.

Figura 27. Efecto de intensidad de iluminación en la fotosíntesis (Eckardt et al., 1997; Skillman et al.,).

Los equipos para determinar fotosíntesis generalmente trabajan en rangos desde los 50 hasta los 2500 $\text{mmol}_{\text{foton}}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$ que es a lo que trabajan la mayoría de las plantas y generalmente en la lámpara de leds, iluminan con luz roja y azul. Algunas plantas sensibles a la luz (que son principalmente C3), como *Arabidopsis* tienen fotoinhibición a intensidades superiores de 1000 $\text{mmol}_{\text{foton}}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$; aunque esto no pasa con las plantas CAM.

1.6.3.1.2.- CO₂ disponible.

Para algunas plantas tropicales C3, éste parámetro es el que impide que puedan crecer a alturas superiores a los 1000m sobre el nivel del mar, ya que la Rubisco no es tan afin al CO₂ como para asimilarlo a presiones parciales menores a 0.2 mm de Hg. Así que las C4 y las CAM llevan una ruta alterna para la fijación de CO₂. Por esta razón los equipos de medición de fotosíntesis cuentan con tanques de CO₂ para estandarizar la entrada de este al sistema de medición; o bien cuando se hacen determinaciones sin la inyección de CO₂, se monitorea el que entra y el que sale, esto mediante el uso de laser infrarrojo que es absorbido por éste gas, de esta manera se puede hacer una determinación de la cantidad que entra y sale. También se monitorea la presión atmosférica para determinar las ppm en las cuales se encuentra presente el gas.

1.6.3.1.3.- Flujo de Aire.

El flujo de aire se refiere a los Kg de aire por segundo que entran al sistema de medición. Estos dependen de la presión atmosférica, la humedad ambiental y la temperatura. De este parámetro depende la fotosíntesis de manera que a bajos flujos, el intercambio gaseoso es difícil. A altos flujos se puede reseca la hoja, bajar la temperatura o impedir el intercambio gaseoso, por lo que es necesario el hacer una curva para optimizarlo en cada tipo de planta que se trabaje.

1.6.3.2.- Transpiración.

La transpiración es la velocidad con la que la planta pierde agua mediante evapotranspiración por medio de los estomas. Se mide en $\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{m}^2_{\text{hoja}} \cdot \text{seg}$. Este parámetro varía de acuerdo a la hora del día, a la temperatura, a la disponibilidad de agua en el suelo y en el ambiente, por lo que para su medición se recomienda que se haga a la misma hora del día y antes del riego o que llueva. Indica directamente el metabolismo de la planta y su nivel de estrés.

1.6.3.3.- Conductividad estomática.

Se refiere a los moles de CO_2 que atraviesan el estoma por unidad de tiempo, va de la mano a la transpiración. Puede alcanzar valores negativos cuando hay acumulación de CO_2 intracelular debido al estrés hídrico sus unidades son $\text{mol}_{\text{CO}_2}/\text{m}^2_{\text{hoja}} \cdot \text{seg}$. Cuando esto sucede, los aparatos de medición también registran valores negativos de transpiración.

1.6.3.4.- Capacidad de retención de agua del suelo (WHC).

Del inglés *Water Holding Capacity* (WHC), se refiere a los Kg de agua que pueden ser retenidos por Kg de suelo. Se determina saturando de agua el suelo, después se deja secar en estufa a 105°C hasta que alcanza peso constante y por diferencia de pesos se calcula restándole al peso húmedo del suelo, el peso seco del suelo y a esa diferencia se le divide entre el peso seco del suelo. Entre mayor es la superficie de intercambio iónico que tiene el suelo, más alto es este valor. Para suelos rocosos, puede tener valores menores a la unidad, mientras que para suelos arcillosos puede alcanzar un valor hasta de 10 Kg agua / Kg de suelo seco.

1.6.3.5.- Humedad transpirable del suelo (FTSW).

Del inglés *Fractions of Transpirable Soil Water* (FTSW), se refiere a la humedad máxima que puede perder el suelo en las condiciones de experimentación, para su determinación, se llenan las macetas de un suelo cuyo FTSW haya sido determinado previamente y con una masa (peso seco) conocida, se satura de agua y se deja en las condiciones medioambientales en que se realizará el experimento, se pesa día tras día para llevar un registro, hasta que alcanza peso constante y la diferencia de peso entre el inicio y el final del experimento, se toma como el 100% de FTSW y se le correlaciona matemáticamente con WHC.

4.- JUSTIFICACIÓN

Debido a que se desconoce la función supracelular de las proteínas que viajan en el floema, así como la distancia que hay entre el tejido productor y el consumidor de la señal, se propone su estudio *in planta* mediante sobreexpresión en mosaicos genéticos para entender el papel de estas macromoléculas, así como los mecanismos implicados en el transporte en el tejido vascular.

5.- HIPÓTESIS

El desarrollo de un sistema de expresión quimérico para sobreexpresar genes de expresión abundante en floema, mediante el uso de *Agrobacterium*, permitirá analizar el transporte de proteínas a sus tejidos blanco y mediante el análisis de cambios fenotípicos, y por medio de estudios se podrá inferir la posible función fisiológica.

6.- OBJETIVOS

6.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de genes para proteínas de savia y su transporte a través del tejido vascular a tejidos distantes; así como su posible efecto en el desarrollo de la planta por transformación de plantas de calabaza en etapa cotiledonaria.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Implementación de un sistema de transformación de calabaza basado en el uso de *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo vectores de expresión con proteínas con capacidad de movimiento intercelular y sistémico.

Realizar la expresión quimérica de proteínas con posible función supracelular.

Realizar un análisis *in planta* de movimiento a larga distancia, fenotipo y localización en tejidos blanco a nivel subcelular.

Detección de los transgenes en los distintos tejidos blanco de la planta.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.01.- Vectores.

Se usaron 3 vectores en este trabajo. Todos ellos específicos para el uso de *Agrobacterium* y contienen los bordes izquierdo y derecho para ser reconocidos por la maquinaria intracelular de *Agrobacterium* y se lleve a cabo la transformación genética de células vegetales.

7.01.1.- Vector pCAMBIA.

El primer vector utilizado en este trabajo es el vector comercial pCAMBIA, sobre el cual no se hizo ni una manipulación, tal como fue proporcionado por el Dr. Federico Sánchez (IBT UNAM), así fue introducido en planta. Este vector cuenta con la construcción mGFP5-GUS fusionadas y traducionalmente y dirigidas transcripcionalmente por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S. El marcador de selección para el microorganismo es kanamicina, el marcador de selección para las células vegetales es Higromicina (Estrada Navarrete *et al.*, 2007). El mapa del vector se muestra en la Figura 28.

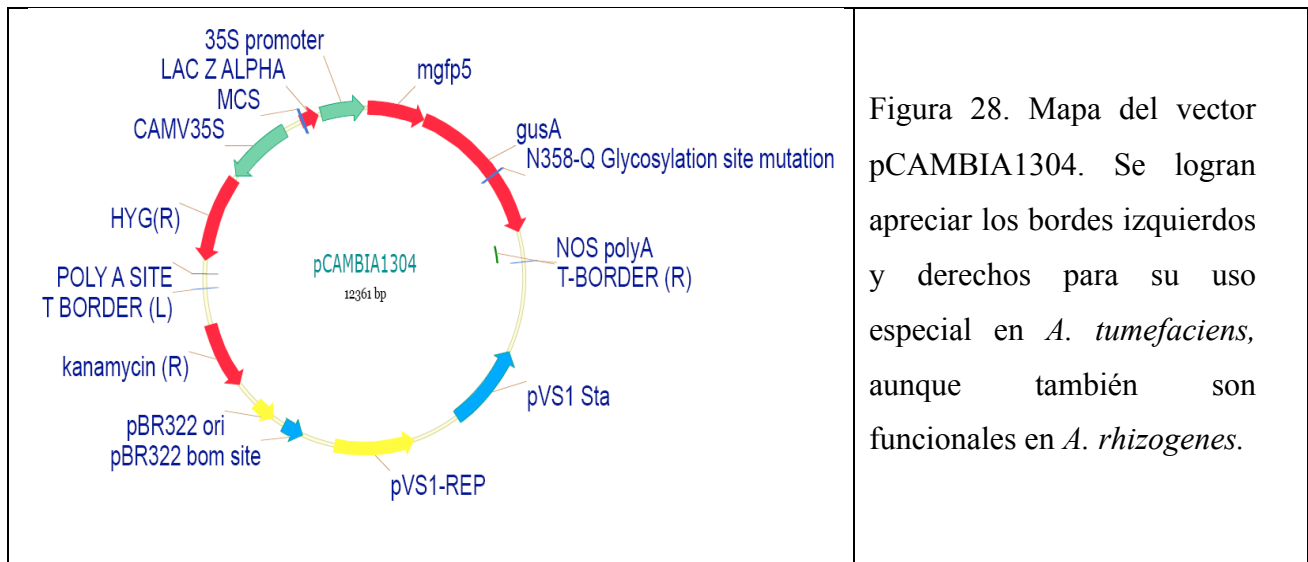


Figura 28. Mapa del vector pCAMBIA1304. Se logran apreciar los bordes izquierdos y derechos para su uso especial en *A. tumefaciens*, aunque también son funcionales en *A. rhizogenes*.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.01.1.1- mEGFP5.

Es una proteína de la familia GFP que como se mencionó en la introducción, también es apta para su uso en plantas. El subtipo “m” y “5” nos indican que se modifica postraduccionalmente por unión de ácido en su extremo amino terminal, lo cual hace que se pueda fijar fuertemente a la membrana de la célula que la produce. El marco de lectura codificante es de 725 pb. Comparte con EGFP los primeros 50 pares de bases y las últimas 200, lo cual le permite ser detectada por PCR con oligos para cualquier otra EGFP.

7.01.1.2- GUS.

La enzima β -glucuronidasa tiene un tamaño de 2200 pb. Como se encuentra fusionada a mEGFP, no tiene la capacidad de viajar de una célula a otra aunque se exprese en grandes cantidades, por lo que permite identificar con claridad qué tipo de células es quien la está produciendo, esto mediante su ensayo enzimático.

7.01.1.3- CaMV 35S.

El promotor 35S es fuerte y constitutivo, por lo que se expresa en toda la planta y en todos los tejidos; también es común que ocurra el silenciamiento de los genes que regula. Su tamaño es de 1Kb.

7.01.1.4- Kanamicina.

La enzima que confiere la resistencia al antibiótico presenta inhibición por sustrato, por lo que para cultivo líquido y en placa se recomienda que no sobrepase los 100mg/ml. Cuando se usa en combinación con otro antibiótico se recomienda que ambos se utilicen a la mitad de la concentración normal, ya que un antibiótico puede inhibir a la fosfotransferasa del otro. También se recomienda que no se tomen las colonias pequeñas que tardan más tiempo en crecer ya que pueden ser colonias satélite que crecen únicamente una vez que las células que presentan resistencia han degradado el antibiótico.

7.01.2.- Vector pBin19.

Mediante el uso de enzimas de restricción se logró introducir en el vector pBin19 (Figura 29) la construcción ProIC-KNOTTED1 (KN1)-EGFP por Ruiz-Medrano (datos no publicados), en la que la expresión de la fusión KN1-EGFP es dirigida por el promotor *rolC* de *A. rhizogenes*. Este promotor a su vez dirige expresión en tejido vascular. Esta EGFP carece de la secuencia que la retiene en retículo endoplásmico, por lo que tiene la posibilidad de desplazarse intercelularmente, precisamente porque KN1 presenta dicha propiedad. La construcción fue introducida interrumpiendo *lacZ*.

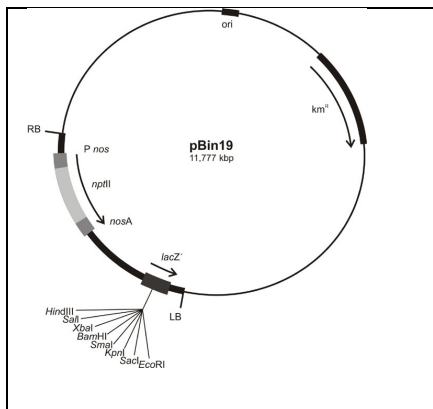


Figura 29. Plásmido pBin19 para *Agrobacterium*. El plásmido tiene un tamaño de 11.77 Kb, con la construcción se estima uno de 13.5 Kb. Presenta resistencia a kanamicina.

7.01.3.- Vector pK7FWG2.

El vector pK7FWG2 (Plant Genetic Systems, Gante, Bélgica) es un plásmido comercial que contiene un gen que codifica para una proteína tóxica para bacterias, así como las regiones de recombinación *attR1* y *attR2* que permite eliminar este gen por recombinación e insertar el gen deseado clonado en un vector de entrada. El ORF de CmPP16 se obtuvo por RT-PCR y clonado en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen). Así, usando la tecnología Gateway para vectores (Karimi *et al.*, 2002) se introdujo el gen *CmPP16* fusionado traduccionalmente a *EGFP*, bajo control del promotor CaMV 35S.

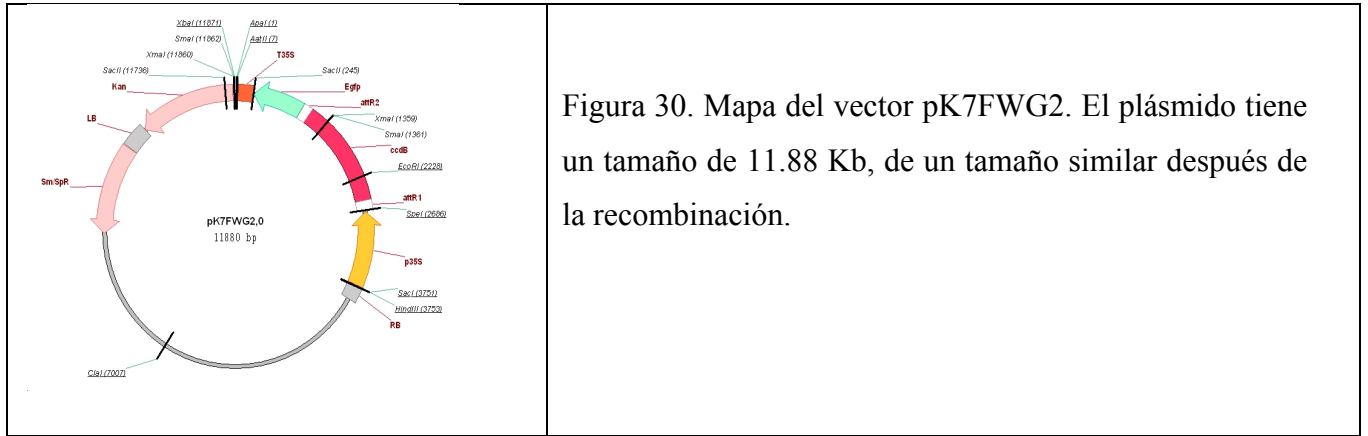


Figura 30. Mapa del vector pK7FWG2. El plásmido tiene un tamaño de 11.88 Kb, de un tamaño similar después de la recombinación.

7.02.- Cepas de *Agrobacterium*.

Los microorganismos con los que se desarrolló el trabajo fueron en primer lugar *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 (NCP2659) descrita por Estrada-Navarrete *et al.* (2007, proporcionada por el Dr. Federico Sánchez, IBT-UNAM), que se creció en medio LB. En segundo lugar *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Van Larebeke *et al.*, 1984), que fue crecido en medio YEB. Ambas cepas son productoras de Cucumopinas. A estas cepas se les introdujeron los plásmidos mediante electroporación; ambas fueron crecidas en presencia de kanamicina por 48 horas a 30°C. Quedando así seis tratamientos de prueba de las construcciones, como producto de las dos cepas multiplicadas por los tres vectores trabajados; más dos cepas son vector, una de *A. rhizogenes* y una de *A. tumefaciens*; más las plantas silvestre. Son en total 9 tratamientos.

7.03.- Material Vegetal.

Alrededor de 60 semillas por tratamiento de *C. maxima* cultivar Big Max (R. H. Shumway's, Randolph, WI), fueron desinfectadas por 2 minutos en etanol al 70% en agitación. Después se sumergieron en NaOCl al 2% por un minuto en agitación y finalmente de enjuagaron en agua destilada esteril por un minuto más. Las semillas fueron puestas en caja petri con algodón estéril y se dejaron germinar por dos semanas en oscuridad a 23°C. Posteriormente las plántulas fueron puestas en macetas pequeñas con algodón estéril y se dejaron crecer en cámara a 23°C, con 12 hr. de iluminación y 12 de oscuridad, esto por 8 días más luego fueron pasadas a macetas de 18Kg con suelo de bosque esterilizado previamente. Fueron puestas en invernadero con fotoperiodo de 12/12. Las plantas fueron regadas con solución B&D (Broughton *et al.*, 1971).

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.04.- Análisis Físicoquímicos del suelo.

Se refiere a las propiedades físicas del suelo y su influencia en la retención de agua. Los componentes típicos del suelo son arcilla, arena, limo y materia orgánica. Los componentes que retienen más la humedad son la arcilla y la materia orgánica y esto va de la mano con el tiempo que tardan las plantas en presentar el estrés hídrico.

7.04.1- Contenido de humedad

Se pesó un kilogramo de suelo húmedo, se dejó secar en estufa a 105°C, esparcido en una charola metálica sobre la cual se puso papel y se esparció de manera tal que formaba una capa de 1cm de espesor. Se deja secar hasta que alcanza peso constante.

7.04.2- Determinación de WHC (Water Holding Capacity).

Se pesan 100g de suelo previamente secado en estufa a 105°C, se pone en un cono de papel filtro en un embudo, se agrega agua hasta la saturación y un poco más como excedente, se deja drenar por 5 minutos y se pesa. Se transforma a $\text{Kg H}_2\text{O retenida} / \text{Kg de suelo}$ y se toma ese valor como el 100% de WHC y el peso seco como el 0% de WHC.

7.04.3.- Determinación de FTSW (Fractions of Transpirable Soil Water)

Se pesó un kilogramo de suelo de suelo que haya sido saturado hasta el 100% de WHC y se extiende en charolas metálicas sobre papel, de manera tal que forma una capa de 1 cm de espesor, se deja secar en condiciones de invernadero hasta que alcanza peso constante. A ese valor se le asigna el cero de FTSW y se estima que valor de WHC corresponde a éste.

7.04.4- Contenido de materia orgánica.

Se pesaron 100g de suelo que haya sido secado en estufa a 105°C, se le adicionan 100ml de peróxido de hidrógeno al 30% se pone la mezcla en un recipiente hermético, se cierra y se deja digerir por 3 días a 105°C. Después se drena, se lava 3 veces con agua estéril y se deja secar a 105°C hasta peso constante. El % de materia orgánica se calcula como la diferencia de peso antes y después de la digestión.

7.04.5.- Determinación del % de Arcilla, Limo y Arena.

Se toma una muestra de suelo cuya materia orgánica ya haya sido digerida con H₂O₂, se disgrega con mortero y pistilo hasta que no haya grumos. Se pone en probeta de vidrio, se agrega el doble volumen de agua destilada, se agita vigorosamente y se deja reposar. Lo que sedimente en los primeros 20 segundos es arena, lo que tarde hasta 5 minutos es limo y la arcilla precipitará en los siguientes días. Cuando el volumen del sedimentado sea constate y el agua clara ha finalizado la sedimentación de la arcilla, se mide el volumen correspondiente a cada fracción y se divide entre el total. Con los porcentajes obtenidos se estima en el triángulo de textura de suelo (Figura 31) el tipo de suelo al cual pertenece.

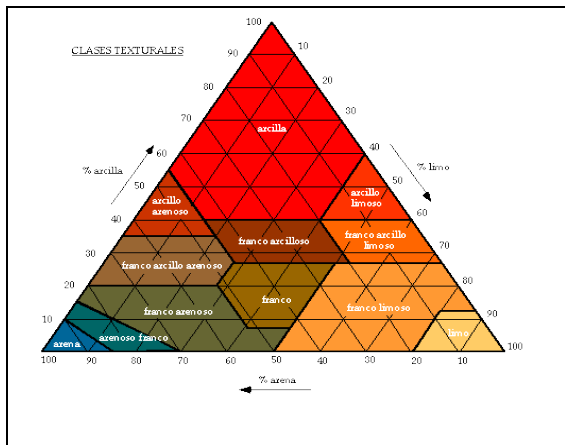
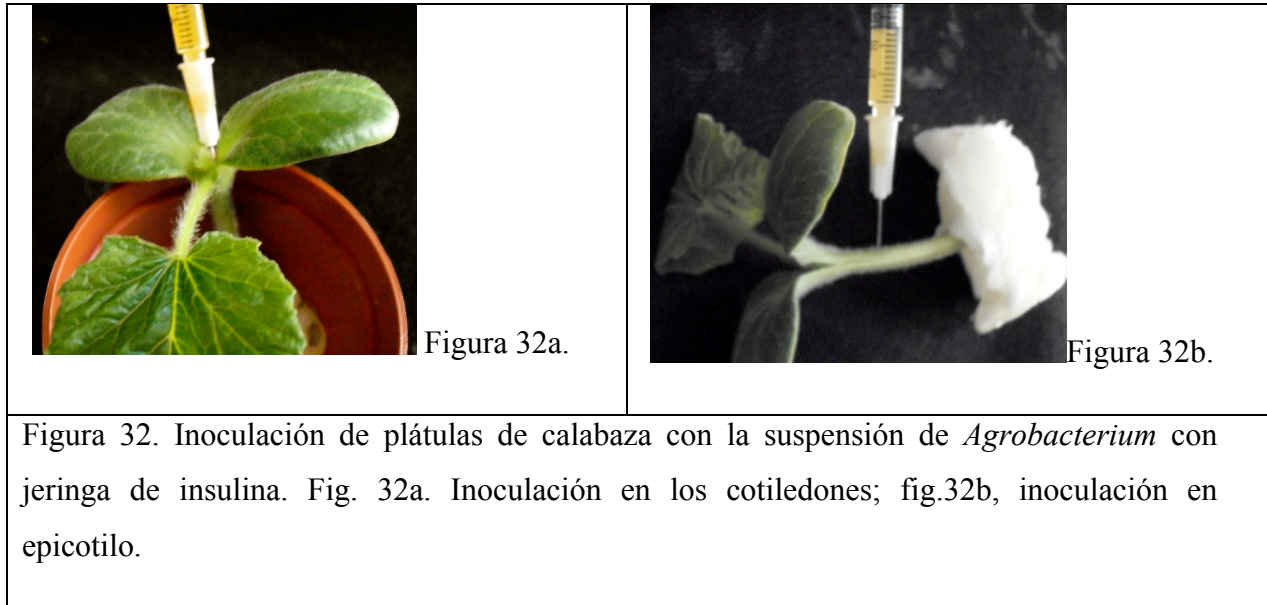


Figura 31: Diagrama de textura del suelo. Cada uno de los vértices corresponde a cada componente en estado puro. El suelo más apto para la agricultura es el suelo Franco. El suelo boscoso suele ser franco arenoso y el suelo de selva suele ser suelo arcillo arenoso.

7.05.- Inoculación con *Agrobacterium*

Se crecen las cepas de *A. rhizogenes* K599 y *A. tumefaciens* C58C1 en sus respectivos medios de cultivo sólidos a manera que forme un césped. Se colecta con espátula el crecimiento, se resuspende en medio de infiltración (50g/L sacarosa, 0.044 mM BAP, 50mL/L silwett L.77, según Clough y Bent, 1998). Para los blancos se usaron, los cultivos de *A. rhizogenes* K599 y *A. tumefaciens* C58C1 sin plásmido crecidos en sus respectivos medios de cultivo sin antibiótico. La suspensión de *Agrobacterium* se subcultivó por 4 horas en medio con acetosiringona 140mM. Posteriormente se hizo la infiltración de 50mL de la suspensión con jeringas de insulina en el tejido vascular de los cotiledones de las plantas de calabaza (Figura 32). Las plantas fueron cubiertas con una bolsa grande a manera de domo para evitar la deshidratación de las células y permitir el desarrollo de raíces adventicias y tumores dependiendo de la cepa de *Agrobacterium*. Se dejaron en las bolsas por 15 días. Se hicieron las pruebas de transformación un mes después de la inoculación.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS



7.06.- Ensayo de GUS.

La actividad de la β -glucuronidasa a nivel histoquímico se hizo por el método descrito por Jefferson *et al.*, 1984 y fue determinada un mes después de haber hecho la inoculación con *Agrobacterium*. Para ello el tejido fue infiltrado a vacío toda la noche con la solución para desarrollar la reacción enzimática a 37°C. Después se pasa a la solución para precipitar carbohidratos y también se deja una noche en ella a temperatura ambiente. Posteriormente se pasa a la solución para extraer la clorofila y se deja también toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se pasa a la solución para decolorar el tejido y se deja en ella por lo menos una noche a temperatura ambiente y esta misma solución se puede usar para conservar el tejido. Finalmente se observa al microscopio (Axiolab HBO 50/AC Zeiss Filter Set 15; Zeiss, Germany).

7.06.1.- Formulación de la solución para la actividad enzimática de la β -glucuronidasa.

- Buffer de fosfato 100mM pH=7.0
- EDTA 10mM
- 0.1% de Tritón
- Ferricianuro de potasio 5mM
- X-Gluc 2mM

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.06.2.- Formulación de la solución para cristalizar y precipitar carbohidratos.

- Etanol al 75%
- Ácido Acético 25%

7.06.3.- Formulación de la solución para extraer clorofila.

- Metanol al 75%
- Acetona al 25%

7.06.4.- Formulación de la solución para decolorar tejido vegetal.

- Fenol al 20% (m/v)
- Ácido Láctico al 20% (v/v)
- Glicerol al 45% (v/v)
- Agua destilada el 20% restante.

7.07.- Visualización de GFP.

La visualización de GFP se hizo un mes después de haber hecho la inoculación con *Agrobacterium*. Para ello se hizo una decoloración previa del tejido en solución para eliminar clorofila, dejándolo en ella por 4 días en refrigeración y luego se pone en solución para preservar. El equipo utilizado para su visualización fue el Leica TCS-SPE confocal microscope (40X and 60X objectives: ACS 1.15 IMMAN) y Leica TCS-SPE/MO-TANDEM multiphotonic microscope (20X objective: HCxPLAPO 1-blue IMM UV 0.7 N.A., Laser Tirsaph 200M 2x and 1024 x 1024 pixels), con una excitación a 480nm y su emisión a 510nm. Las imágenes fueron procesadas y tomadas por el equipo mediante el software Leica AF.

7.07.1.- Solución para eliminar clorofila para visualizar GFP.

- Etanol al 50% (v/v)
- Ácido Láctico al 10% (v/v)
- Glicerol al 40% (v/v)

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.07.2.- Solución de conservación para visualizar GFP.

- Etanol al 20% (v/v)
- Glicerol al 30% (v/v)

7.08.- Extracción de DNA y RNA.

El DNA plasmídico se extrajo mediante la técnica de miniprep. El DNA genómico se extrajo a partir de 1g de tejido de la tercera hoja después del meristemo apical, esto con el Kit DNeasy Plant (Qiagen, Hilden, Alemania); el DNA se estandarizó para su posterior uso en la PCR a una concentración de 50ng/mL, con ayuda del Nanodrop. El RNA total se extrajo mediante el Kit de RNeasy Plant (Qiagen). El RNA de savia se extrajo mediante el uso de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:25:1), en la cual se puso directamente la savia de calabaza recién extraída, se precipitó con alcohol absoluto y ácido acético 1M, se centrifugó y lavó con etanol al 70% y se resuspendió en TE.

7.09.- Análisis mediante PCR.

Del DNA extraído se tomaron 50ng para realizar las pruebas de PCRs. El control positivo fue DNA procedente de una miniprep. Los fragmentos amplificados fueron 725 pb para GFP y 200pb para uidA. El equipo donde se llevó a cabo fue el T-1000 Professional Basic Gradient Thermocycler (Biometra, Germany). Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1%, visualizados mediante fluorescencia con bromuro de etidio en luz UV. Las concentraciones de DNA fueron determinadas con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Wilmington DE).

7.09.1.- Composición de la mezcla de PCR.

El volumen final de cada mezcla de PCR fue de 25mL:

- Buffer 10X 2.5 μ l
- dNTP's 1mL (2.5 mM)
- 0.75 unidades de Taq DNA polimerasa 0.25mL (5u/ μ l, TaKaRa Ex Taq HS, Takara Bio, Japón)
- 1.0 μ l (12.5 mmol) de cada oligonucleótido
- 50ng de DNA de planta contenidos en 1 μ L

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.09.2.- Oligonucleótidos empleados.

Los oligonucleótidos utilizados fueron para las PCR fueron:

Tabla 6: Secuencia de los oligonucleótidos empleados			
Gen	Sentido	Secuencia	Tm (°C)
GFP	forward	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGGAGGAGCTG-3'	78.9
	reverse	5'-T TACTTCTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3'	72.4
uidA	forward	5'- ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACC-3'	70.1
	reverse,	5'- TCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCCGGTTT-3'	80.4
<i>virD2</i>	Primer A	5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3'	68.5
	Primer C	5'-TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA-3'	69
CmPP16	forward	5'-ATGGGGATGGGAATGATGGAGGTCCAT-3'	77.1
	reverse	5'-TTTTCCCATGGGTAACATCCTCCACAT-3'	72.8
KN1	forward	5'-GGCCTTACCCCTCAGAGACTCAGAAGG-3'	73.1
	reverse	5'-CTAGCCGAGCCGGTACAGCCCGCCGTC-3'	83.3

7.09.3. Programa para la PCR.

El programa utilizado para cada uno de los genes que se trabajaron se muestra en la Tabla 7:

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 7: Programa para las PCR.					
Gen		GFP	uidA	<i>virD2</i>	KN1
Desnaturalización inicial (5min-DNA _{genómico} , 2min-DNA _{plasmídico})		94°C	94°C	94°C	94°C
30 ciclos	Desnaturalización	94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min
	Alineamiento	62°C 50 seg	55°C 50 seg	57°C 1 min	52°C 50 seg
	Amplificación	72°C 1 min	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg
Amplificación final		72°C 7 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min

7.10.- RT-PCR y PCR tiempo real.

El programa utilizado para cada gen son los de la Tabla 6, mas fueron llevadas a 40 ciclos de amplificación en lugar de 30, esto a diferencia de la PCR tradicional. Las reacciones fueron incubadas en el equipo Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Australia).

7.10.1.- RT-PCR

Para realizar la RT-PCR se hizo con el sistema comercial One-Step Syb® GreenER qPCR Super Mix (Invitrogen), según las especificaciones de la compañía. El molde a partir del cual se partió fue RNA_{total} para hacer análisis de expresión de los genes o bien RNA_{savia} para determinar la abundancia relativa de estos transcritos en floema, ambos ajustados con ayuda del Nanodrop a una concentración de 500ng/mL. El primer ciclo de amplificación, correspondiente a la RT. Se hizo una desnaturalización del molde a 95°C por 5 minutos y después se pone en hielo, se agrega a la mezcla de reacción y se deja con la RT a 40°C por 45 minutos. Después se hace el primer ciclo de desnaturalización para comenzar con la PCR.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.10.2.- PCR tiempo real.

Para hacer la PCR tiempo real se uso el kit de GreenER qPCR Super Mix (Invitrogen); según las especificaciones de la compañía. El molde del cual se partió fue DNA_{genómico} a 50ng/mL, que fue ajustado previamente a esa concentración con ayuda del equipo Nanodrop (Invitrogen, Carlsbad CA).

7.11.- Tratamiento de sequía.

Las plantas de calabaza después de haber sido transferidas a maceta de 18 L (de 30cm de alto y 27.5 cm de diámetro), ser llenados de tierra de bosque (arcillo-arenosa) hasta 15 L y ser regadas con solución nutritiva por 2 meses, transcurrido ese tiempo las plantas dejaron de ser regadas para ser sometidas a sequía severa. El día cero del inicio de la sequía las plantas fueron regadas hasta el 100% de la WHC, y se dejaron en condiciones de invernadero sin agua. Durante el desarrollo del experimento se midieron los parámetros fisiológicos de las plantas.

7.12.- Medición de parámetros fisiológicos en las plantas durante la sequía.

La medición de los parámetros fisiológicos de las plantas se hizo con el equipo LICOR LI-6400XT Infrared Gas Exchange Analyzer (LiCor Inc., Lincoln, NE). Las condiciones bajo las cuales se hicieron las mediciones de fotosíntesis, Asimilación de CO₂, transpiración y conductividad estomática son las siguientes:

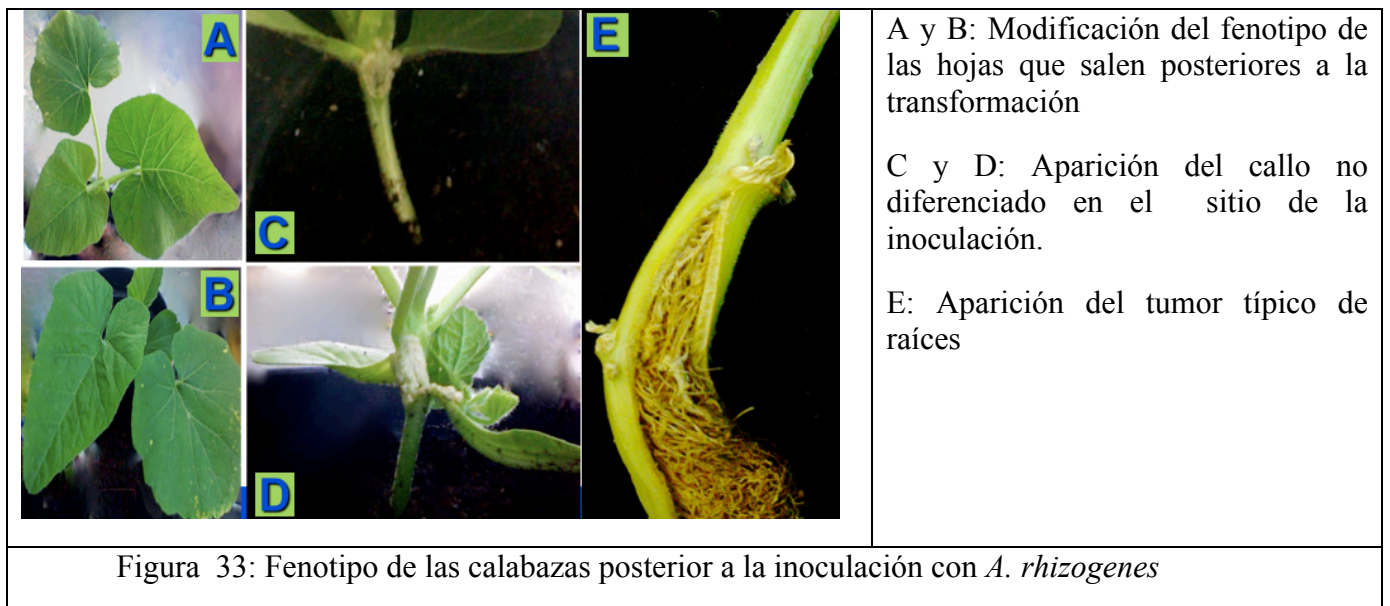
Tabla 8: Parámetros ambientales de medición de la fotosíntesis.	
Parámetro	Magnitud
Concentración molar de CO ₂ (ppm de aire)	400
Temperatura de las hojas (°C)	20
Flujo molar de luz ($\mu\text{mol}_{\text{de luz}}/\text{m}^2 \cdot \text{seg}$)	2000
Flujo de aire (mmol/seg)	500
Presión atmosférica (mm de Hg)	580

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1.- Implementación del sistema de transformación.

Se implementó un sistema de transformación de *C. maxima* mediante el uso de las dos cepas, *A. tumefaciens* C58C1 y *A. rhizogenes* K599; ambas, conteniendo el vector pCambia1304 con la construcción CaMV 35S-mGFP5-uidA. Se realizó mediante la inyección directa de una suspensión bacteriana en solución de infiltración; ésta se inyectó entre los cotiledones y en tallo.

Dos meses después se observó la formación un tumor de raíces pilosas, típica de la infección con *A. rhizogenes* (Figura 33E) esto se presentó en 9 de las 112 plantas que fueron inoculadas con esta cepa; aunque también se vio una modificación temporal en la forma de las hojas que salían poco después de la infección (Figura 33A), esta modificación de las hojas ocurrió en 17 de las 112 plantas inoculadas; las hojas que se formaron un mes después de haber realizado la inoculación tenían el fenotipo silvestre. En el caso de las plantas transformadas con *A. tumefaciens*, también se observó la aparición del tumor conocido como agalla de la corona (Figura 33: C y D) y se presentó en 30 de las 110 plantas inoculadas con esta cepa y también hubo modificación de las hojas (Figura 33B) en 12 de las 110 plantas. Esto fue independiente de la construcción que contuviera *Agrobacterium*, pues incluso se presentó en las plantas que fueron inoculadas con bacteria sin plásmido.



DISCUSION Y RESULTADOS

8.1.1.- Cambios morfológicos en las hojas de las plantas transformadas con las construcciones CaMV 35S-mGFP5-uidA y CaMV 35S-CmPP16-EGFP.

En estos dos tipos de plantas, no se presentó ningún cambio morfológico en sus hojas, salvo los ya descritos con anterioridad que fueron comunes para todas las construcciones. Sin embargo mediante pruebas específicas, fueron evidentes otros fenotipos, distintos de las plantas silvestres y también de las plantas transformadas con *Agrobacterium* sin plásmido. Dichas pruebas se presentan más adelante.

8.1.2.- Cambios morfológicos en las hojas de las plantas transformadas con la construcción rolC-KN1-EGFP.

A los pocos días de haber hecho la inoculación con *A. tumefaciens* que contenían el ORF *KN1*, se formaron nudos en las venas de los cotiledones (Figura 34). Esto se observó en 16 de 78 plantas inoculadas, dentro de los primeros 3 días posterior a la inoculación. Lo cual implica que la expresión de genes resultado de la transformación puede ocurrir en pocas horas. Estos nudos en las venas de las hojas causados por expresión ectópica de *KN1* ya habían sido reportados previamente en maíz por Volbrecht *et al.* en 1991.



Figura 34: Nudos en los cotiledones de plántulas.

A: Cotiledón plántula silvestre

B, C y D: Plántulas inoculadas con *A. tumefaciens*.

Por otra parte cuando se realizó la transformación con *A. rhizogenes*, también se observó la aparición de nudos en los cotiledones en un lapso de 3 días después de hacer la inoculación, pero a diferencia de los que ocasiona *A. tumefaciens*, éstos no se limitan a las venas, sino que se presentan en la parte terminal del cotiledón, dando un fenotipo nudoso más marcado similar al reportado por expresión ectópica en hojas de maíz por Smith *et al.* (1992). Esto fue observado en 3 de las 34 plantas inoculadas con *A. rhizogenes* (Figura 35).

DISCUSION Y RESULTADOS

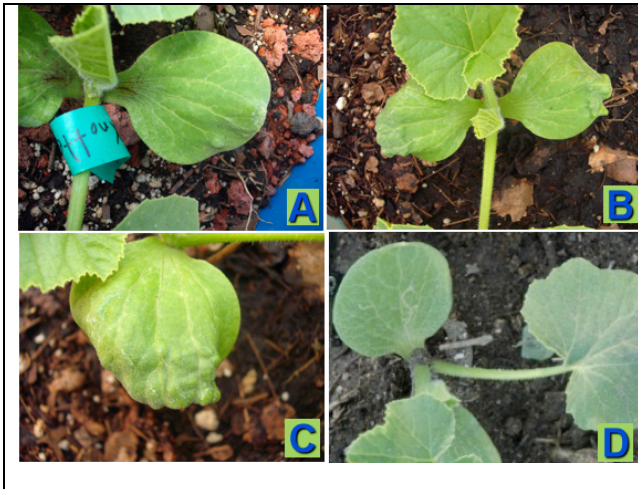


Figura 35: Cotiledones con fenotipo nudoso.

A, B y C. Cotiledones de plántulas inoculadas con *A. rhizogenes* K599.

D. Cotiledón de plántula inoculada con *A. rhizogenes* sin plásmido. Esta planta presenta el fenotipo silvestre.

A los pocos días de haber realizado la inoculación con *A. tumefaciens* comenzaron a emerger las primeras hojas verdaderas en las plantas, y éstas mostraban la forma típica debida a la expresión ectópica de *KN1* en maíz reportada por Smith, es decir hojas carnosas y nudosas (Figura 36). Sólo las primeras dos o tres hojas mostraban este fenotipo. Posteriormente las hojas más jóvenes, tenían la forma silvestre.

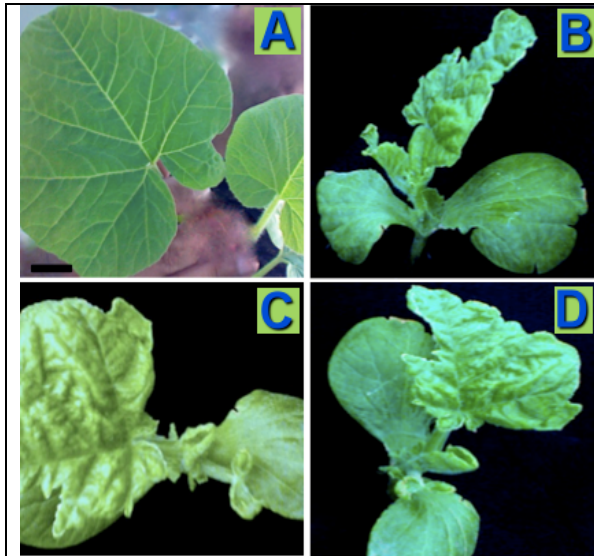


Figura 36: Hojas de calabaza transformadas con *A. tumefaciens* conteniendo la construcción KN1-EGFP.

A: Hojas de planta silvestre.

B, C y D: Hoja nudosa de una planta transformadas con *A. tumefaciens*.

Asimismo las plantas transformadas con *A. rhizogenes* presentan también el fenotipo nudoso (Figura 37) de las hojas al igual que las plantas transformadas con *A. tumefaciens*.

DISCUSION Y RESULTADOS



Figura 37: Hojas de calabaza transformadas con *A. rhizogenes* K599 conteniendo la construcción KN1-EGFP. A. Hoja de planta transformada con *A. rhizogenes* K599 sin plásmido. B y C. Hojas de plantas transformadas con *A. rhizogenes* mostrando el fenotipo nudoso por sobreexpresión de *KN1*.

En la Figura 38 se muestra una planta que fue sometida a agrotransformación para sobreexpresar knotted; se observa como las primeras hojas muestran una forma de la hoja rugosa (Figura 38 B y C). En la Figura 38 F se muestra la planta completa y se logra apreciar que la hoja postrera tiene un fenotipo casi igual al silvestre, además es de mayor tamaño. Esto indica que los niveles de Knotted a nivel de proteína se ven rápidamente regulados, pues el fenotipo silvestre de las hojas se recupera rápidamente.

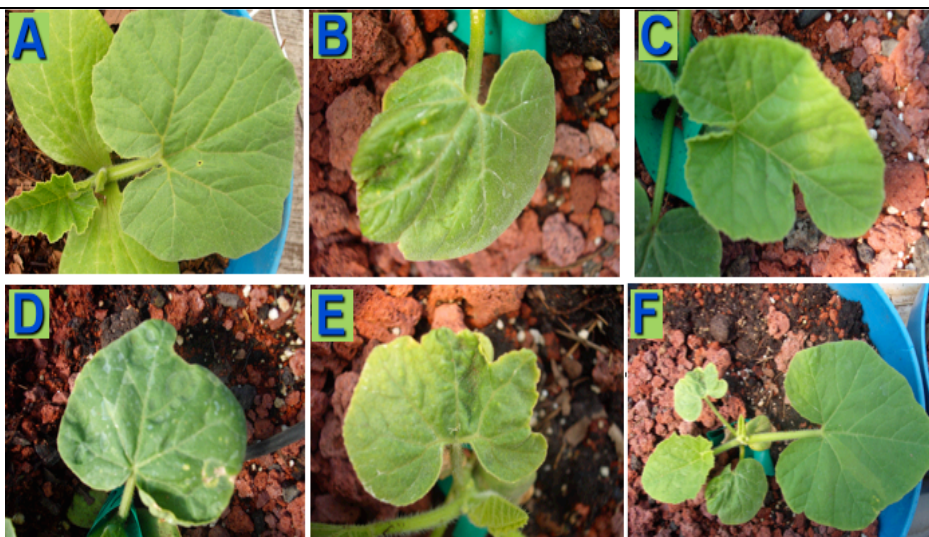
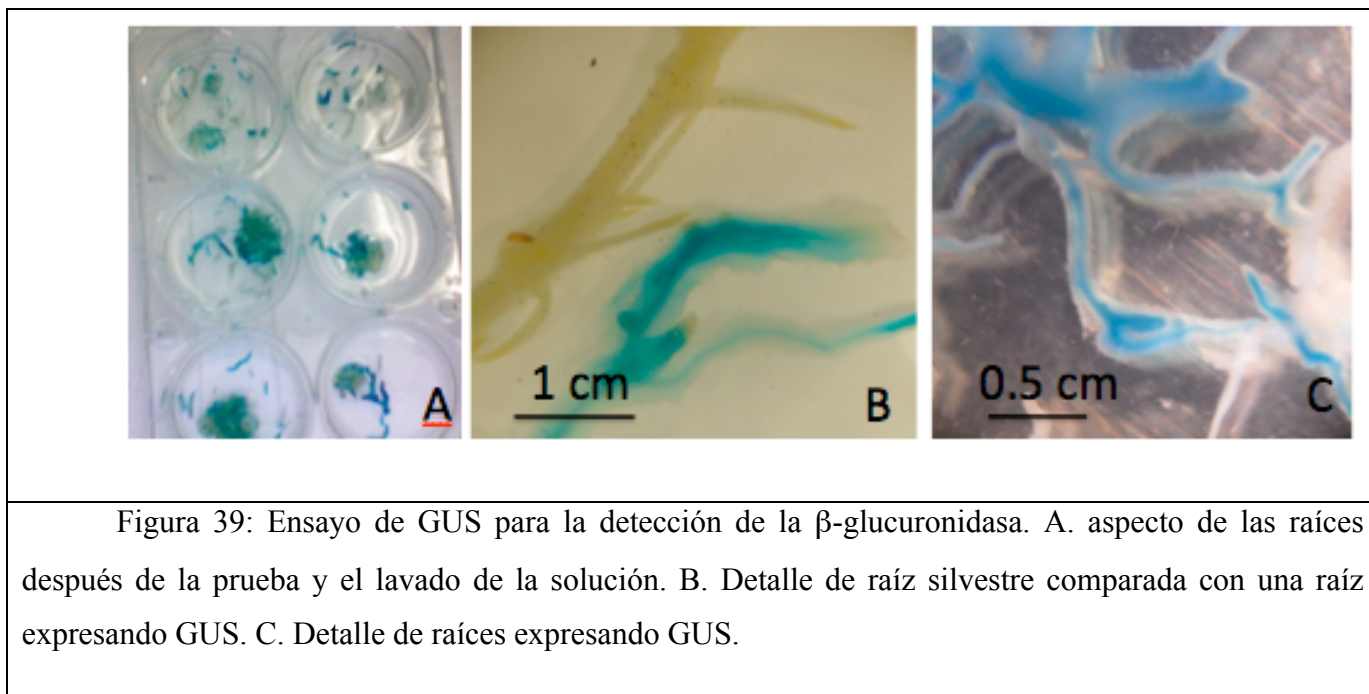


Figura 38: Planta transformada con *A. tumefaciens* conteniendo KN1-EGFP. A. Hoja planta transformada con *A. tumefaciens* sin plásmido. B, C, D y E. Hojas de una planta sobreexpresando *KN1*. F. Planta sobreexpresando *KN1* mostrando todas sus hojas; nótese que la postrera hoja es más grande y más parecida a la silvestre

DISCUSION Y RESULTADOS

8.2.- Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción mGFP5-GUS.

Las plantas que fueron transformadas con la construcción de mGFP5-GUS, fueron sometidas al ensayo histoquímico de GUS. La comprobación de la presencia de β -glucuronidasa se hace por el desarrollo de color debido a la hidrólisis del X-Gluc. No todas las plantas fueron positivas para esta prueba ni tampoco en todos los tejidos, a pesar de que en ellas se encuentra presente el promotor fuerte CaMV 35S. Cuando se hizo esta prueba a raíces procedentes del tumor formado por la transformación con *A. rhizogenes*, se observa una coloración azul, resultado positivo, en algunas de ellas (Figura 39).



La presencia de la coloración azul en algunas raíces procedentes del tumor de *A. rhizogenes* hace evidente la presencia de la enzima solo en algunas de ellas, pero también se observa la presencia de raíces que no presentan la coloración azul (y por tanto no están transformadas); esto se debe a que las raíces transformadas poseen la habilidad de sintetizar hormonas necesarias para el desarrollo del tumor (citocininas) y células silvestres respondieron a estas hormonas formando raíces también. Al observar una de estas raíces con mayor detalle bajo el microscopio se puede observar que la β -glucuronidasa se encuentra fuertemente localizada en el cilindro vascular (Figura 40).

DISCUSION Y RESULTADOS

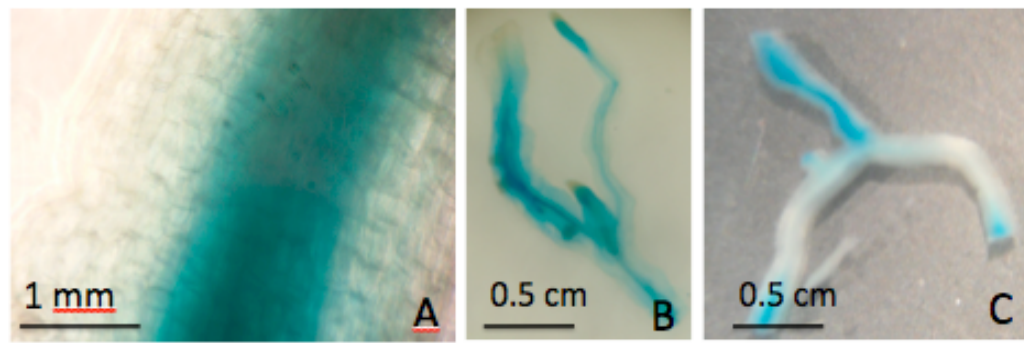


Figura 40: Distribución de la β -glucuronidasa en el cilindro vascular de raíz. A. Detalle al microscopio 100X de una raíz. Se aprecia la fuerte distribución en el cilindro vascular. B y C Detalle de raíz en microscopio estereoscópico 10X.

Por otra parte, también se analizaron otros tejidos, entre ellos tallo, hojas, botón y floral. Se encontró que las plantas transformadas con *A. tumefaciens* presentaban una expresión sistémica de la β -glucuronidasa y las plantas transformadas con *A. rhizogenes* presentaban una expresión limitada a algunos tejidos (Figura 41).

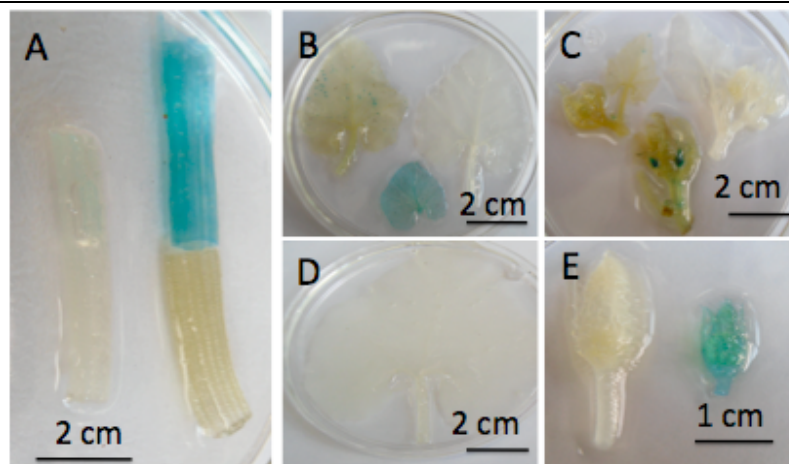
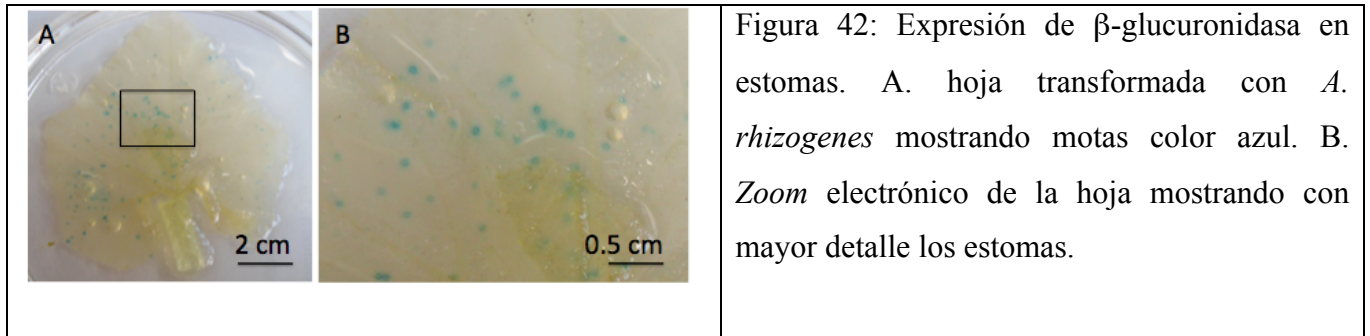


Figura 41: Distintos tejidos expresando β -glucuronidasa. A. Tallo; primero, una planta transformada con *A. tumefaciens* sin plásmido, después arriba, una planta transformada con *A. tumefaciens* y abajo una silvestre. B. Hojas. Arriba con motas azules planta transformada con *A. rhizogenes*, la hoja azul corresponde a planta con *A. tumefaciens* y la silvestre completamente blanca. C. Meristemos apicales. Arriba *A. tumefaciens* sin plásmido, con los botones florales en azul plantas con *A. rhizogenes* y la silvestre mas clara. D. Hoja silvestre. E. Botones florales de planta silvestre transformada con *A. tumefaciens*.

DISCUSION Y RESULTADOS

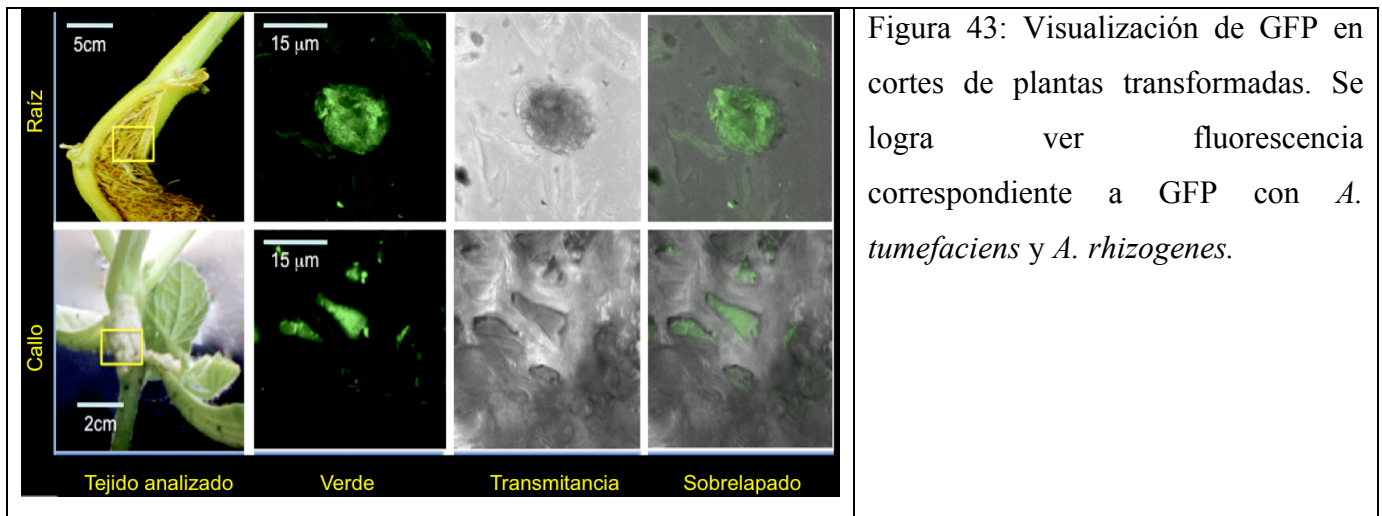
Finalmente al analizar con mayor detalle las hojas de plantas transformadas con *A. rhizogenes*, especialmente las motas color azul que presenta la hoja, podemos ver que se trata de estomas (Figura 42). Los estomas son el único tipo celular en la hoja que presenta la expresión de GUS, del mismo modo en meristemo apical como se vio en la Figura 37, solamente los botones florales presentan expresión de GUS. Pero esto sucede solamente cuando se transforma con *A. rhizogenes*, las plantas transformadas con *A. tumefaciens* presentan expresión sistémica, de alguna manera *A. rhizogenes* induce silenciamiento más que *A. tumefaciens*.



8.3.- Visualización de GFP.

8.3.1.- Visualización de mGFP5 en plantas con la construcción GFP-GUS.

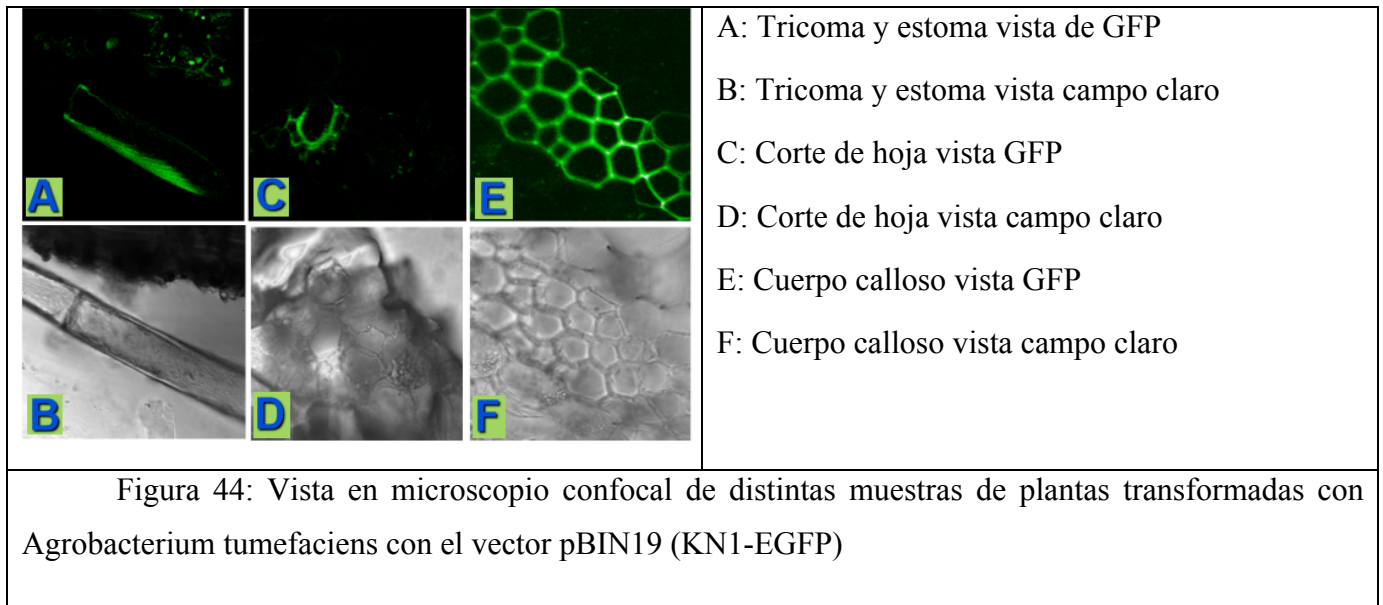
El análisis de la localización celular de GFP se realizó por microscopía confocal, en donde se identificó fluorescencia verde en la longitud de onda de 582 nm, característico de la emisión de GFP. En la primera construcción, debido a que mGFP5 sufre una modificación postraduccional por palmitilación en el extremo N-terminal, se adhiere a las membranas; se logra observar en las micrografías que se localiza únicamente en el interior de las células (Figura 43).



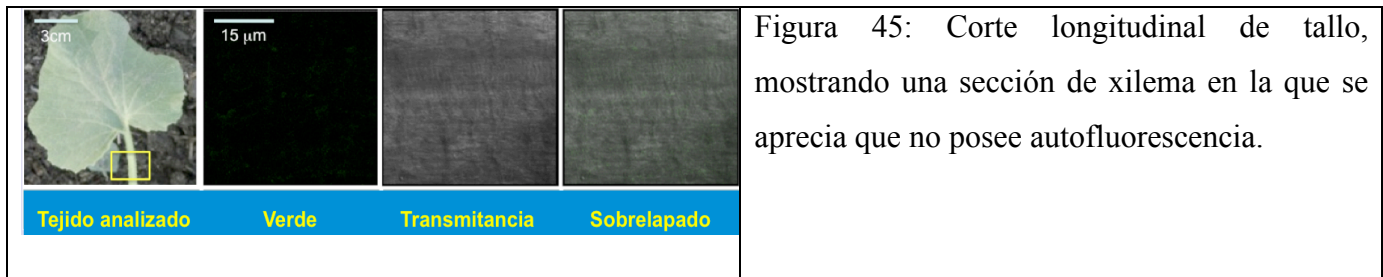
DISCUSION Y RESULTADOS

8.3.2.- Visualización de GFP en plantas expresando la construcción KN1-EGFP

La proteína GFP de la construcción KN1-EGFP no sufre ninguna modificación postraduccional que limite su movimiento, salvo el hecho que ésta no es una proteína que tenga la secuencia de aminoácidos que le permita viajar libremente en el sistema vascular. Mas como se encuentra fusionada a la proteína KN1, ésto le permite ser transportada en floema, aunque cabe destacar que esto no ha sido demostrado del todos. KN1 es una proteína homeótica que se expresa principalmente en meristemas en vegetativos, por lo que no puede viajar tan fácilmente desde donde se produce hasta tejido distal, mas al estar fusionada con un promotor de tejido vascular se observa que se expresa en distintos tejidos (Figura 44).

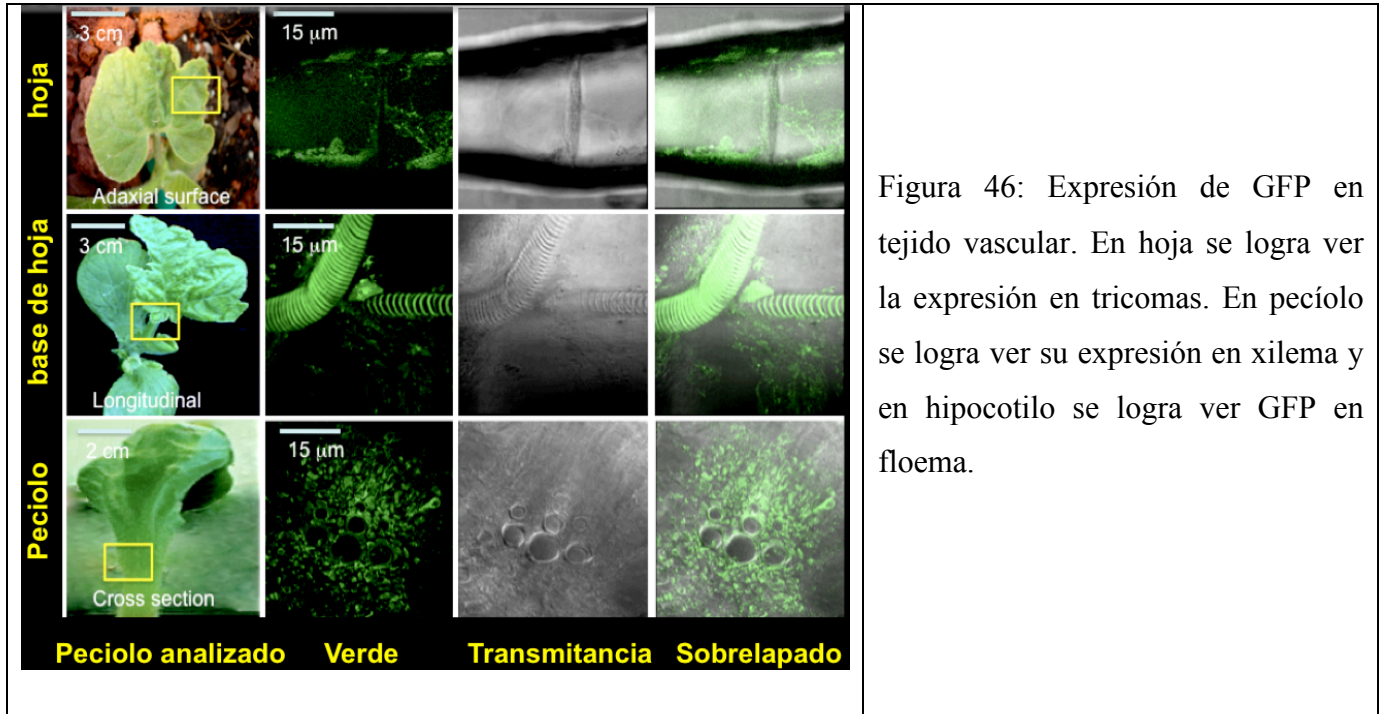


Por otra parte, como el tejido donde se expresa la GFP es tejido vascular, esto hace que no sea totalmente confiable de que GFP se esta expresando el hecho de que éste tejido se vea fluorescente, ya que el xilema es muy autofluorescente. Por ello es necesario realizar la técnica de extracción de clorofila para atenuar la autofluorescencia (Figura 45).



DISCUSION Y RESULTADOS

Una vez realizada la técnica de atenuación de la autofluorescencia se tomaron más fotos y se logró ver que la fluorescencia por GFP se presenta toda en tejido vascular (Figura 46).



8.3.3.- Visualización de GFP en plantas con la construcción CmPP16-EGFP

Al igual que la construcción KN1-EGFP, esta construcción no posee ninguna limitación secuencial al movimiento libre de la GFP, más aun, al estar fusionada traduccionalmente con una proteína implicada en el transporte de macromoléculas (sobre todo RNA) en el floema, puede ser transportada larga distancia por el floema. Esto nos permitiría no solo observar si se encuentra o no el floema, sino también el destino de la proteína CmPP16, que como se logra apreciar en la Figura 47, uno de los probables destinos finales es el tricoma. Por otra parte, más que en el caso anterior de la Figura 46, aquí se aprecia en corte transversal que el xilema posee mucha fluorescencia.

Se logra observar en general que el tricoma es una de las regiones “más privilegiadas” de la planta, pues en él se acumula una gran cantidad de fluorescencia (Figura 48), lo cual indica que gran cantidad de moléculas de GFP (proteína o RNAm) se traslocan a éste; en este caso lo vemos tanto con KN1 como CmPP16. Esta fluorescencia no se observó con la construcción mGFP5-GUS, ya que dicha construcción no está asociada al transporte de macromoléculas, así que observamos que permanece en la célula en donde se genera.

DISCUSION Y RESULTADOS

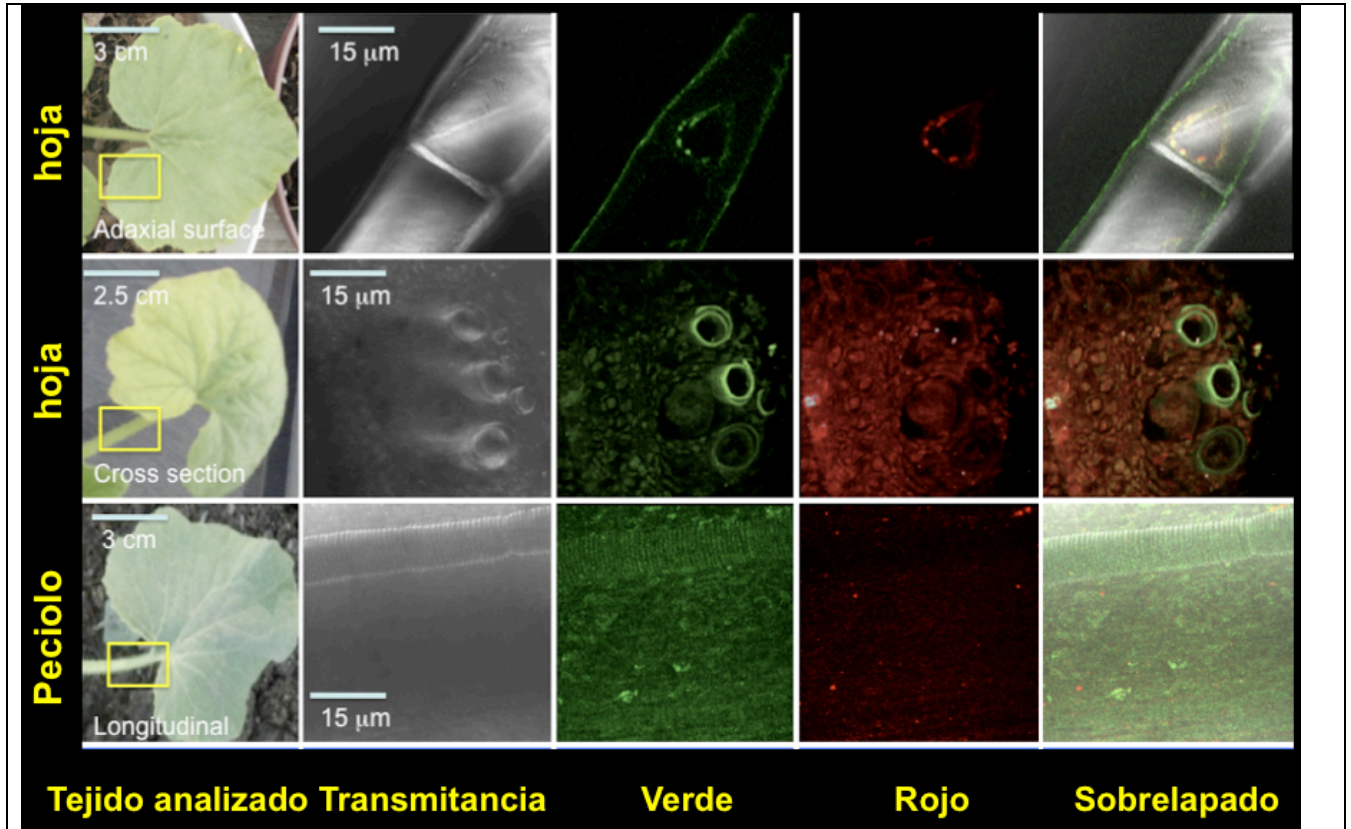


Figura 47. Vista de GFP en plantas transformadas con la CmPP16-EGFP. Estas plantas fueron transformadas con *A. rhizogenes*.

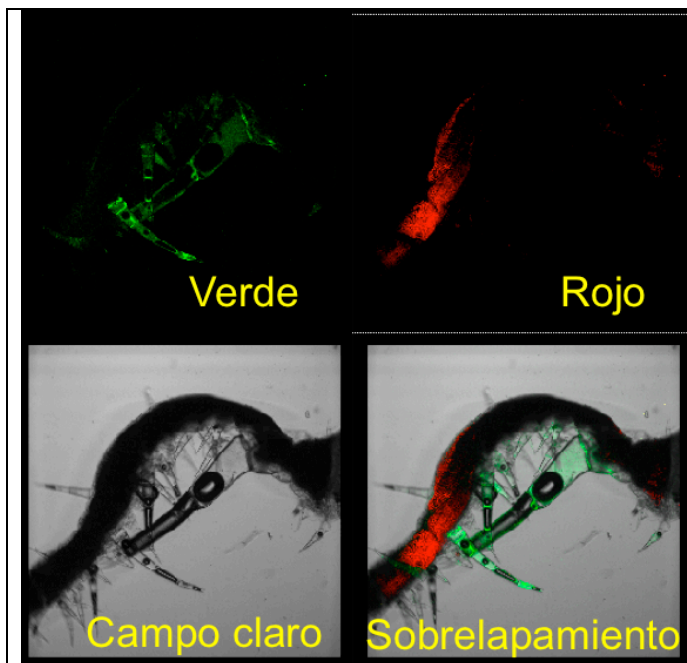


Figura 48. Fluorescencia en tricoma. En el corte longitudinal de hoja tierna, se aprecia que el tricoma acumula gran cantidad de fluorescencia, más que a hoja sobre la cual se ha formado.

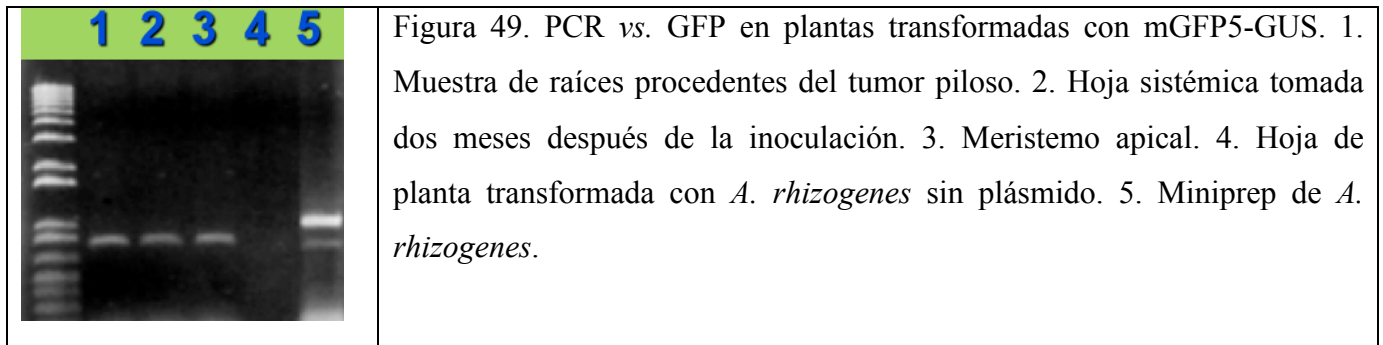
DISCUSION Y RESULTADOS

8.4.- Análisis por PCR punto final de plantas transformadas.

El primer criterio que se tomó en cuenta para considerar si las plantas estaban transformadas fue el análisis por PCR punto final; partiendo de éste se hicieron los análisis antes descritos para todas las plantas que resultaron positivas a esta prueba.

8.4.1.- Análisis por PCR punto final de plantas con la construcción mGFP5-GUS.

El único gen en común de las tres construcciones fue GFP, así que éste se usó para detección en plantas inoculadas por PCR en punto final; para las plantas transformadas con la construcción mGFP5-GUS mediante *A. rhizogenes*, el electroferograma en gel de agarosa de la PCR se muestra en la Figura 49.



Como se muestra en la Figura 44, se logra apreciar que la transformación se llevó a cabo a nivel sistémico, ya que solo la muestra 1 pertenece a las raíces del tumor de *A. rhizogenes*; las muestras 2 y 3 pertenecen a tejido sistémico, en las cuales también fue hallado el transgen. Los detalles de las pruebas descritas hasta este punto se resumen en la Tabla 9. Nótese también en la tabla que algunas muestras aunque se tomaron directamente del tumor formado ya sea de raíces por *A. rhizogenes* o de agallas de la corona por *A. tumefaciens*, éstas no resultaron positivas a la prueba de PCR, lo cual fortalece la suposición planteada mediante el ensayo histoquímico de raíces negativas a GUS, donde se establece que éstas se presentan porque se han producido hormonas que aceleran el crecimiento de las células silvestres.

DISCUSION Y RESULTADOS

Tabla 9. Eficiencia de transformación de plantas transformadas con la construcción mGFP5-GUS. Resumen de ambas cepas *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*. En ella se incluyen los cambios morfológicos, los resultados de la observación al microscopio confocal y multifotónico, los ensayos histoquímicos y de PCR para GFP.

	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Total de plantas inoculadas	112	110
Plantas positivas para tumor (de raíces o agallas de la corona)	9/112	30/110
Total de plantas que mostraron un cambio en la forma de la hoja	17/112	12/110
Total de muestras positivas a GFP mediante PCR	70/112	56/110
Procedentes de tumor de raíces o agallas de la corona	24/38	19/41
Procedentes de hoja sistémica	25/40	15/28
Procedentes tallo	9/14	8/16
Procedentes de cotiledón	5/8	5/8
Procedentes de raíz	7/12	9/17
Total de muestras positivas al ensayo de GUS	32/50	28/50
Procedentes de tumor de raíces o agallas de la corona	10/19	7/12
Procedentes de hoja sistémica	6/7	5/10
Procedentes tallo	12/18	10/11
Procedentes de cotiledón	3/5	6/10
Procedentes de raíz	1/1	0/7
Total de muestras positivas a GFP	31/42	20/37
Procedentes de tumor de raíces o agallas de la corona	11/12	5/9
Procedentes de hoja sistémica	8/9	6/9
Procedentes tallo	7/9	7/11
Procedentes de cotiledón	5/9	2/5
Procedentes de raíz	0/3	0/3

DISCUSION Y RESULTADOS

6.4.2.- Análisis por PCR punto final de plantas con la construcción KN1-EGFP.

También en esta construcción se utilizó la PCR para detección de GFP para determinar eficiencia de transformación y que fuese comparable con las otras construcciones. Donde se hizo PCR tanto de tejido procedente de tumores, como de tejido sistémico (Figura 50). El resumen de las pruebas realizadas hasta este punto para *KN1* se resumen en la Tabla 10.

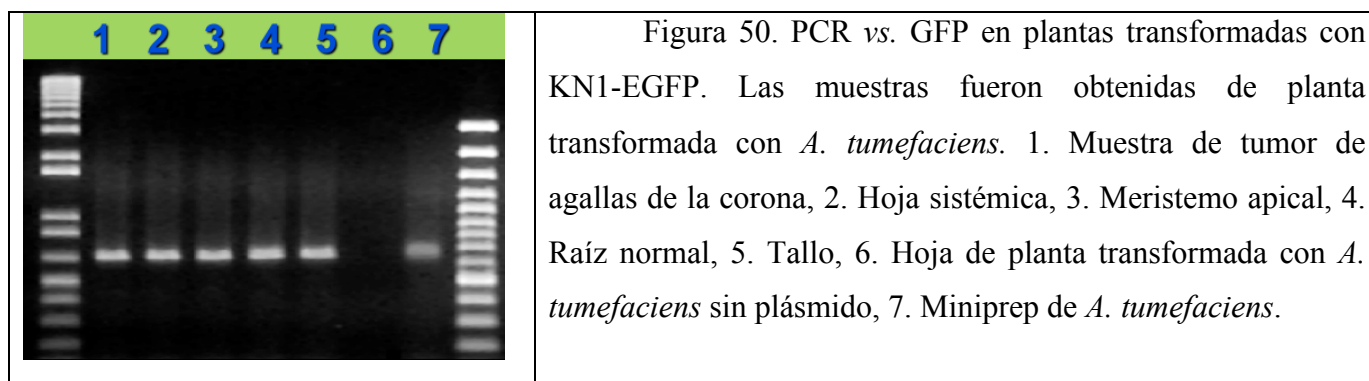


Tabla 10: Eficiencia de la expresión de Knotted en plantas de calabaza. Los pruebas que se muestran de manera resumida son el desarrollo de tumor, la modificación de las hojas debida a *KN1* y las pruebas de PCR.

	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>
Total de plantas inoculadas	78	34
Plantas positivas para tumor (raíces o agallas de la corona)	12/78	4/34
Total de muestras positivas a GFP mediante PCR	61	27
Procedentes de tumor de raíces o agallas de la corona	12/61	4/27
Procedentes de hoja sistémica	11/61	10/27
Procedentes tallo	8/61	5/27
Procedentes de cotiledón	26/61	5/27
Procedentes de raíz	4/61	3/27
Total de muestras positivas al fenotipo nudoso (KN1)	41	6
Muestras de hoja	25/41	3/6
Muestras de cotiledón	16/41	3/6

DISCUSION Y RESULTADOS

6.4.3.- Análisis por PCR punto final de plantas con la construcción CmPP16-EGFP.

Como las plantas con la construcción CmPP16-EGFP no mostraban un fenotipo capaz de ser evaluado a simple vista (salvo en algunos casos que se muestra el mismo cambio en la morfología de las hojas que se da por el simple hecho de transformar con *Agrobacterium*), en estas plantas se hizo especialmente importante la prueba de PCR vs. GFP para determinar aquellas candidatas a continuar con el resto de las pruebas y aquellas que no. En Figura 51 se muestran PCR vs. GFP de plantas transformadas con *A. rhizogenes* y en la Tabla 11 se muestra el resumen de las pruebas hechas para plantas con esta construcción, hechas con ambas cepas.

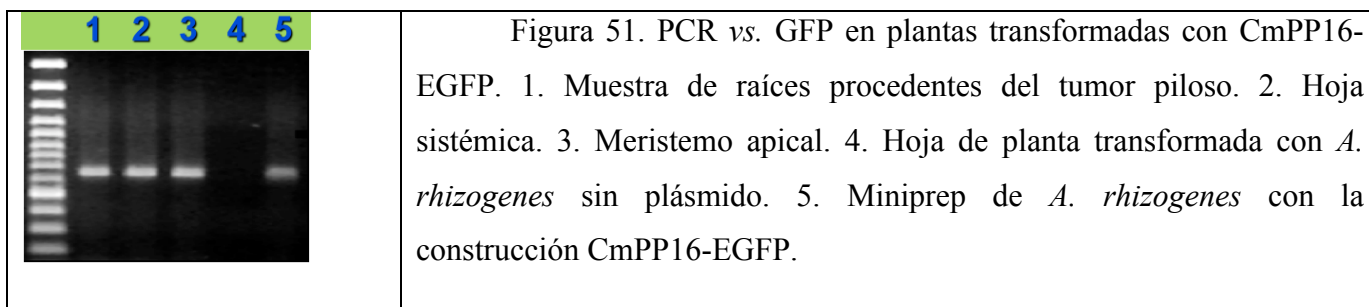


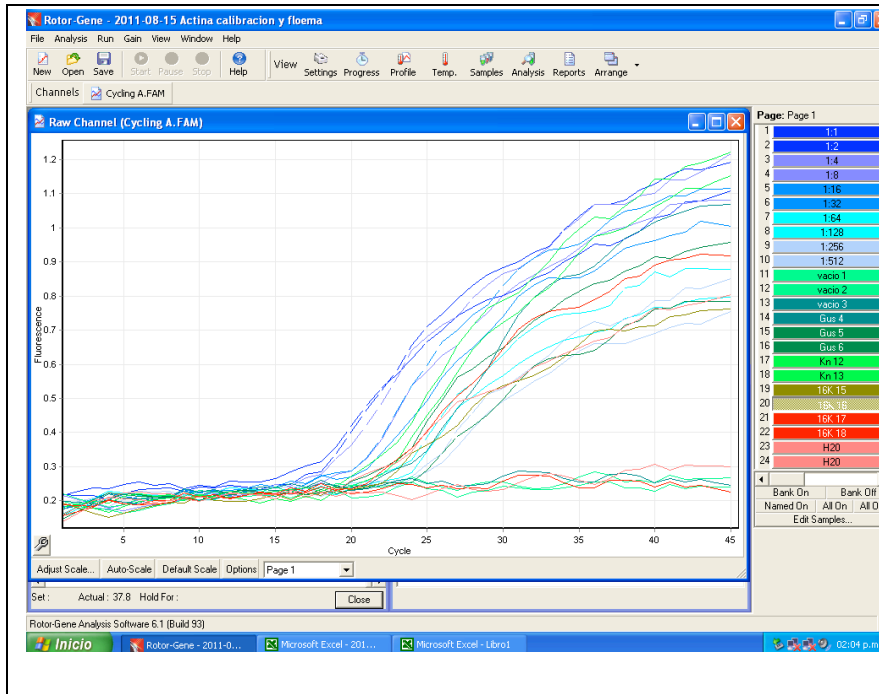
Tabla 11. Eficiencia de transformación de plantas de calabaza con la construcción CmPP16-EGFP. En la tabla se resume la formación de tumores, los ensayos de PCR y el ensayo de resistencia a sequía atribuido a la sobreexpresión de CmPP16.

	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>
Total de plantas inoculadas	36	104
Plantas positivas para tumor (de raíces o agallas de la corona)	3/36	19/104
Total de muestras positivas a GFP mediante PCR	20	80
Procedentes de tumor de raíces o agallas de la corona	3/20	19/80
Procedentes de hoja sistémica	5/20	35/80
Procedentes tallo	6/20	15/80
Procedentes de cotiledón	6/20	8/80
Procedentes de raíz	0/20	3/80
Total de plantas positivas para resistencia a sequía	20	97

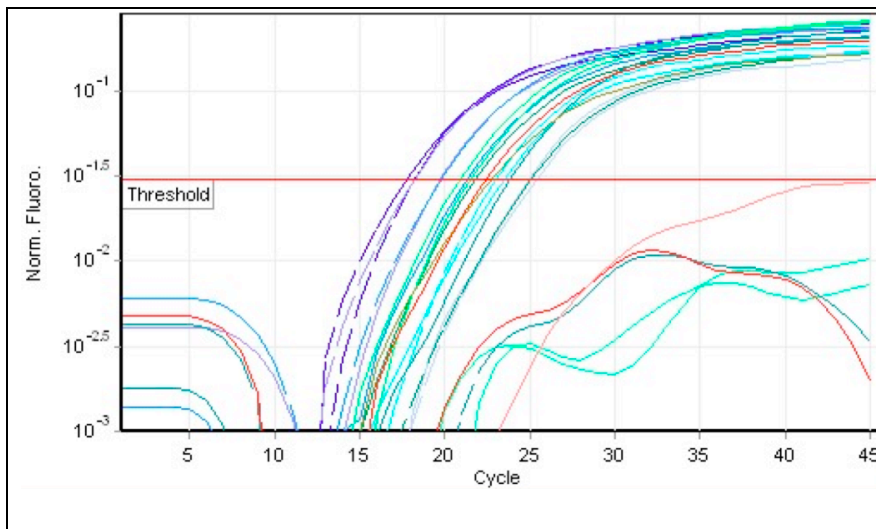
DISCUSION Y RESULTADOS

8.5.- Análisis por RT-PCR y PCR tiempo real de plantas transformadas.

Tanto para RT-PCR y PCR tiempo real, el procesamiento de muestras y el análisis *in silico* es igual. Lo que marca la diferencia es la interpretación de cada proceso. La amplificación y el análisis de datos se hizo con el software ROTOR-GENE. Donde se primeramente muestra la fluorescencia para cada ciclo de amplificación (Gráfica 1). Después se procede a obtener el logaritmo de la fluorescencia normalizada contra los ciclos (Gráfica 3), se mueve el umbral mínimo (threshold) para determinar el Ct de cada muestra.



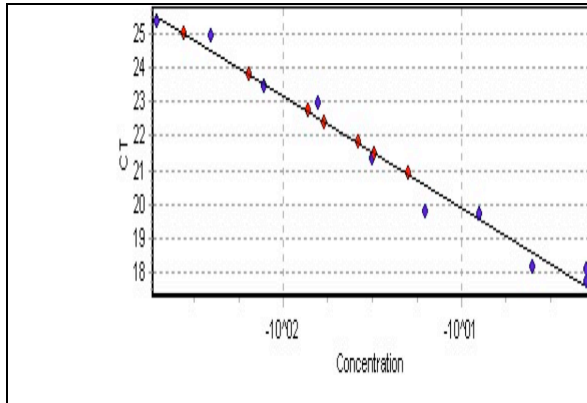
Gráfica 1. Gráfica de Fluorescencia vs. ciclos. Esta gráfica nos indica la fiabilidad del proceso. ya que si la concentración del molde al iniciar la PCR es elevada, la fluorescencia inicial será muy alta y probablemente no haya fase exponencial. La fase exponencial es la que se utiliza para los análisis.



Gráfica 2. Fluorescencia Normalizada contra ciclos. Se hace esta gráfica, después se mueve el umbral para eliminar o disminuir interferencias; después se determina el Ct para cada muestra.

DISCUSION Y RESULTADOS

Una vez obtenidos los Ct para cada muestra a distintas diluciones, éstos se grafican contra la concentración de DNA inicial (Gráfica 3), se construye la recta que predice su comportamiento y se evalúa eficiencia y precisión.



Gráfica 3. Gráfica de Ct vs. Concentración de DNA inicial. Se realiza esta gráfica para determinar reproducibilidad del método y saca a la luz errores por pipeteo o estandarización y permite corregirlos.

Una vez hecho esto para cada una de las muestras, se toma el Ct corregido para cada una, el cual se reporta por el programa en la Tabla 12. El gen endógeno que se utilizó para cada uno de los dos procesos fue actina según el método descrito por Livak y Schmittgen, (2001).

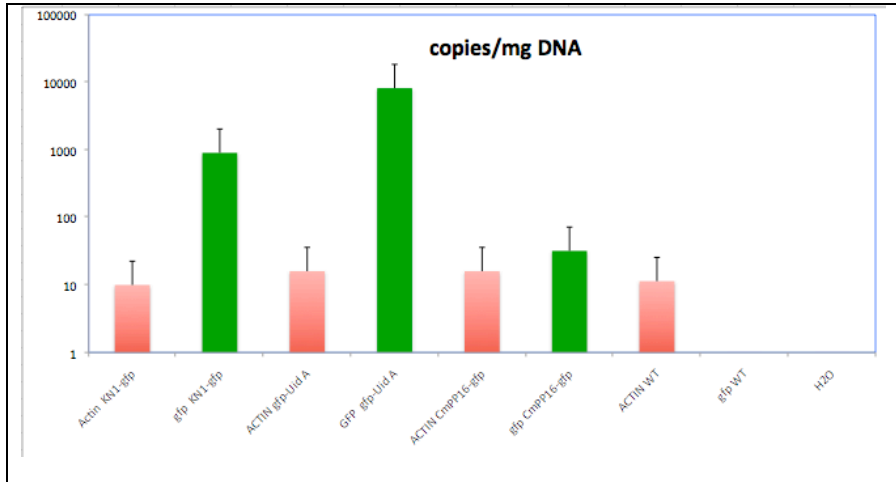
No.	Colour	Name	Type	Ct
1	Blue	1	Standard	17.71
2	Blue	1:2	Standard	18.12
3	Blue	1:4	Standard	18.15
4	Blue	1:8	Standard	19.73
5	Blue	1:16	Standard	19.77
6	Blue	1:32	Standard	21.29
7	Blue	1:64	Standard	22.97
8	Blue	1:128	Standard	23.44
9	Blue	1:256	Standard	24.88
10	Blue	1:512	Standard	25.30
11	Green	H2O	NTC	
12	Green	H2O	NTC	
13	Green	H2O	NTC	
14	Green	gus	Unknown	23.77
15	Green	gus	Unknown	24.98
16	Green	gus	Unknown	21.78
17	Green	Kn	Unknown	20.87
18	Green	Kn	Unknown	21.49
19	Green	16K	Unknown	22.70
21	Green	16K	Unknown	
22	Green	16K	Unknown	22.40
23	Green	non	Negative Control	

Tabla 12. Ct reportada por el programa para cada muestra. Una vez reportada esta tabla, por cada dilución 1:2 se suma un ciclo. Tomando esto como referencia se puede hacer promedio para tomar la Ct más exacta.

8.5.1- Análisis por PCR tiempo real del número de copias de GFP en el DNA genómico.

Una vez obtenido el Ct corregido para cada muestra, se compara con el endógeno mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. El gen que se utilizó como patrón endógeno fue actina y como patrón de comparación exógeno fue GFP, mediante el cual se compararon las cantidad de copias presentes del gen en cuestión en el DNA genómico (Salgado-Siclán *et al.*, 2012). En la gráfica 4 se muestra la comparación del número de copias de GFP vs. copias de actina.

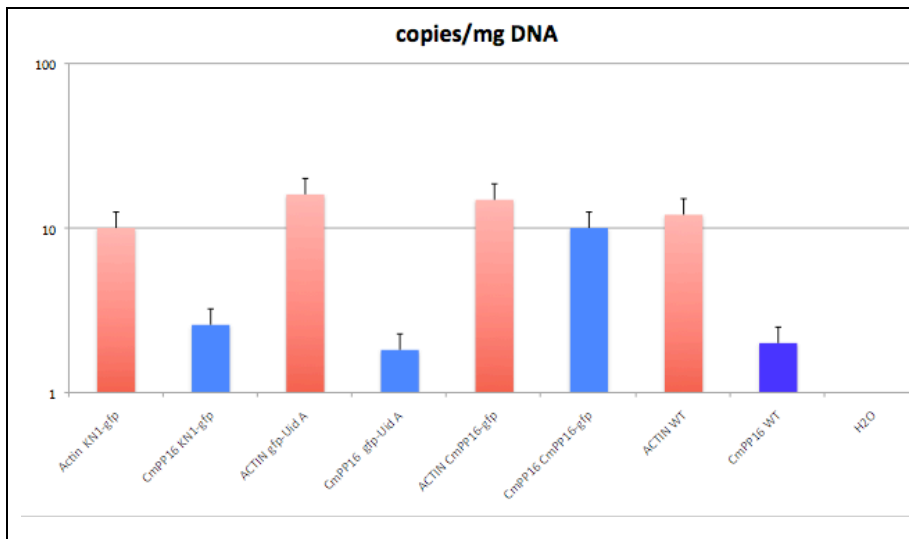
DISCUSION Y RESULTADOS



Gráfica 4. Número de copias de GFP vs. copias de Actina en DNA total, para las plantas transformadas con *A. rhizogenes*. Como la escala es logarítmica, se puede ver que hay 2 a 3 veces más copias de *GFP* que actina en el genoma.

8.5.2- Análisis por PCR tiempo real del número de copias de CmPP16 en el DNA genómico.

En la Gráfica 5 se muestra el análisis del número de copias de CmPP16 presente en el DNA genómico de las plantas. En la misma figura se puede apreciar que el número de copias relativas de CmPP16 en genoma es de 3 a 4 veces menor que Actina, sin embargo, al realizar la transformación genética, el número copias aumenta de 3 a 4 veces, por lo que en las plantas transformadas con la construcción CmPP16-EGFP se alcanzan niveles similares con los que se tienen para Actina. Esto es comparable con la figura anterior, en donde para esta construcción el número de copias para GFP y Actina son similares.

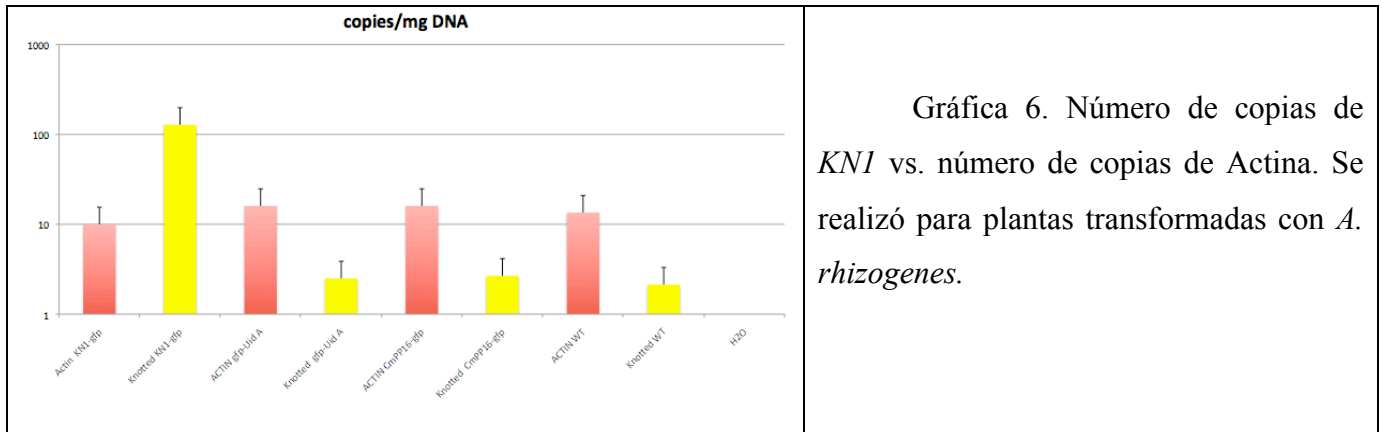


Gráfica 5. Número de copias de CmPP16 vs. número de copias de Actina. Se realizó para plantas transformadas con *A. rhizogenes*.

DISCUSION Y RESULTADOS

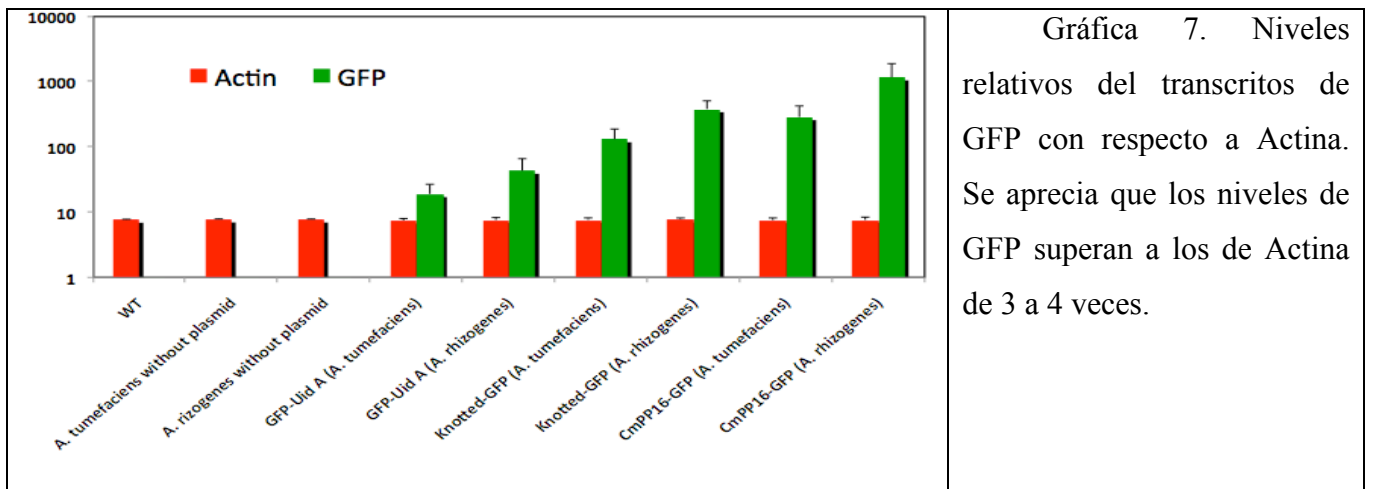
8.5.3- Análisis por PCR tiempo real del número de copias de *KN1* en el DNA genómico.

Adicionalmente se hizo el análisis del número de copias de *KN1* en DNA genómico, para cuantificar eficiencia de transformación; los datos se muestran en la Gráfica 6. Como se logra observar, los niveles de *KN1* para las plantas transformadas con KN1-EGFP, son poco más del doble que los niveles de Actina; lo cual concuerda con los resultados de la Figura 51, donde los niveles de GFP son poco menos del triple que los de Actina.



8.5.4- Análisis por RT-PCR de niveles de transcritos de GFP.

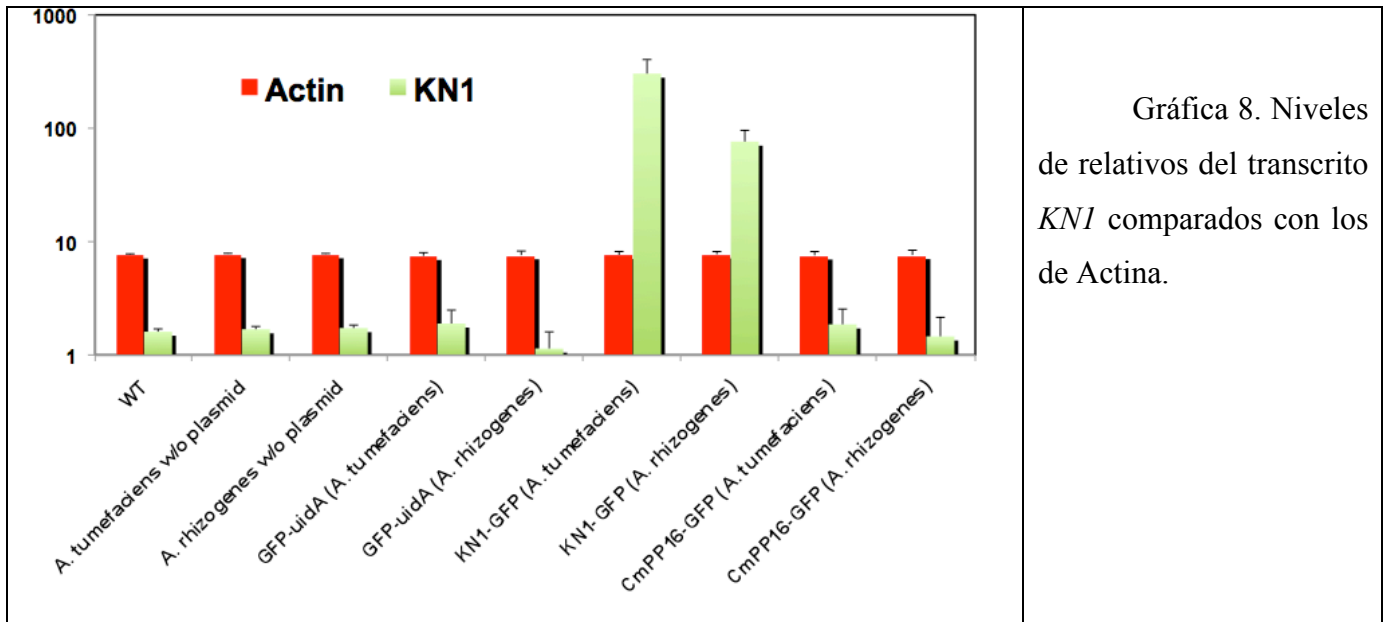
Los niveles RNAm presentes de cada gen nos indica de manera indirecta los niveles de proteína que habrá en las células, siempre y cuando no haya control postraducciona. Por lo tanto nos proporciona un buen parámetro del transporte de esta macromolécula. Para realizar la comparación de los niveles de transcritos de cada gen es necesario compararlos con un gen que tengan común todas las construcciones que en este caso es GFP y comparar con un gen endógeno y que no varíe, como es Actina (Gráfica 7).



DISCUSION Y RESULTADOS

8.5.5- Análisis por RT-PCR de niveles de transcripción de *Knotted*.

KN1 no se expresa en todos los tejidos, ya que al ser un gen homeótico está ligado fuertemente a la diferenciación celular durante etapas tempranas del desarrollo y para mantener las pozas de células troncales en meristemas. Si bien su concentración de DNA es constante, los niveles de transcrito en tejido maduro son muy bajos. Además en el caso de las plantas con la construcción de *KN1-EGFP*, los niveles de este transcrito deben coincidir con los niveles del transcrito *GFP*. Así al analizar los niveles del transcrito se logra ver que el nivel de transcripción de *KN1* supera de 2 a 3 veces al nivel de transcripción de Actina (Gráfica 8). Los niveles de *KN1* en plantas transformadas con la construcción de *KN1-EGFP* no coinciden con los *GFP*, y de hecho varían más del 20%, que es la varianza, por lo que probablemente es más alta que la estimada, cerca del 40%.

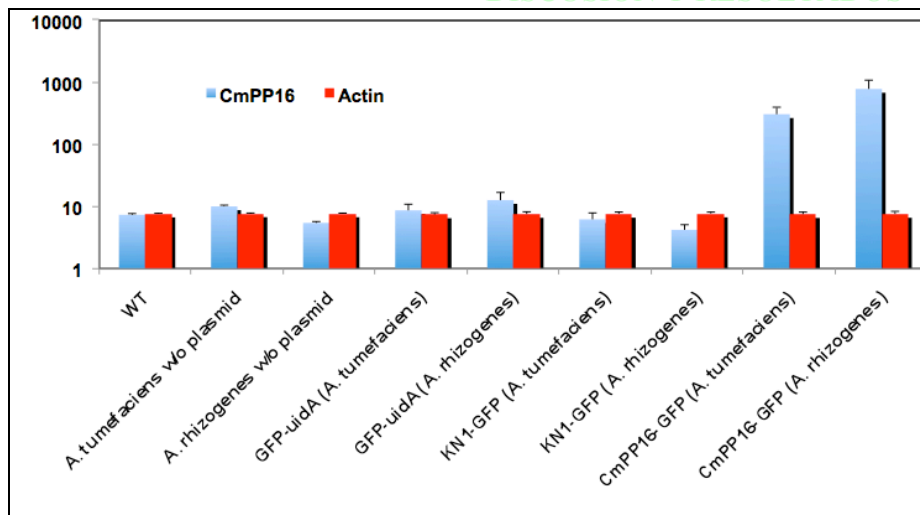


Gráfica 8. Niveles de relativos del transcrito *KN1* comparados con los de Actina.

8.5.6- Análisis por RT-PCR de niveles de transcripción de *CmPP16*.

CmPP16 es un gen endógeno que tiene altos niveles de expresión, por lo que los valores del transcrito deben permanecer relativamente constantes para todas las construcciones, salvo las plantas que fueron transformadas con la construcción de *CmPP16-EGFP*; y los niveles del transcrito deben de ser muy similares a los de *GFP* para esa construcción. Por ello también estos niveles de transcrito se cuantificaron (Gráfica 9).

DISCUSION Y RESULTADOS



Gráfica 9. Niveles de relativos de transcritos de CmPP16 comparados con los de Actina.

8.6.- Resultados de la prueba de tolerancia a sequía.

8.6.1.- Resultados del análisis de textura del suelo.

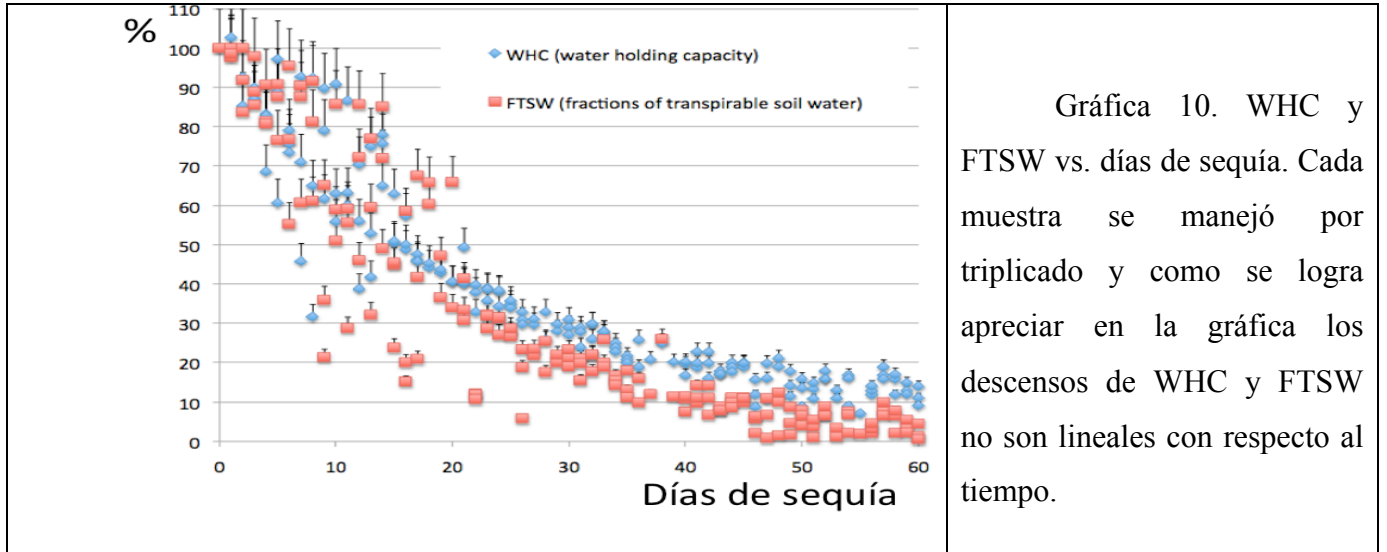
Se tomaron 100 g de suelo, se disgregaron los grumos con mortero, se pusieron en una probeta graduada de 1L, de donde aproximadamente el 60% del volumen correspondía a arena, el 30 del volumen fue de limo y el 10% restante fue arcilla. Esto lo clasifica como un suelo franco arenoso de mediana capacidad de retención de agua.

8.6.2.- Resultados de capacidad de retención del agua en suelo.

Se estimó por secado en horno a 105°C la capacidad de retención de agua de 1.58 Kg de agua por cada Kg de suelo seco y se estimó esto como el 100% de WHC. Por otra parte se saturó el suelo hasta el 100% de WHC, se dejó secar en bandejas en condiciones de invernadero, hasta que alcanzó peso constante.

Se estimó que la humedad mínima a la cual se puede deshidratar la muestra correspondía al 10% de WHC, es decir cuando se alcanzaba la concentración de 0.15Kg de agua/Kg de suelo y tardó dos meses en alcanzar el peso constante. Se graficó la evolución del peso con respecto a los días y esa diferencia del 90% de la WHC se tomó como el 100% de FTSW y se estimó la relación matemática entre ambos parámetros para poder determinar el FTSW por diferencia de peso. En la gráfica 10 se muestran los resultados de la WHC y FTSW con respecto a los días que se sometió a la sequía. El eje y corresponde al % de cada parámetro. En condiciones de invernadero no se pudo alcanzar el 0% de WHC.

DISCUSION Y RESULTADOS



Con base a la gráfica anterior, se determina la relación matemática entre el WHC y el tiempo de sequía, la cual se muestra en la Fórmula 2. La pérdida de humedad tienen un comportamiento exponencial negativo con una asíntota distinta de cero. Se estimó por predicciones en el programa Grapher para Mac, que la asíntota es 7%, lo que significa que el punto de partida del descenso no lineal es de 93%, resultando este último valor de la resta del 100% de humedad al inicio de la sequía menos la asíntota del 7%. También con el programa Grapher se calculó que la pendiente del exponente negativo es de 0.04, que se puede interpretar como una pérdida media del 4% de humedad por día. Esta relación matemática varía de acuerdo con las condiciones de sequía y el tipo de suelo.

$$WHC = 7 + e^{(-0.04(\text{days}) + \ln(93))}$$

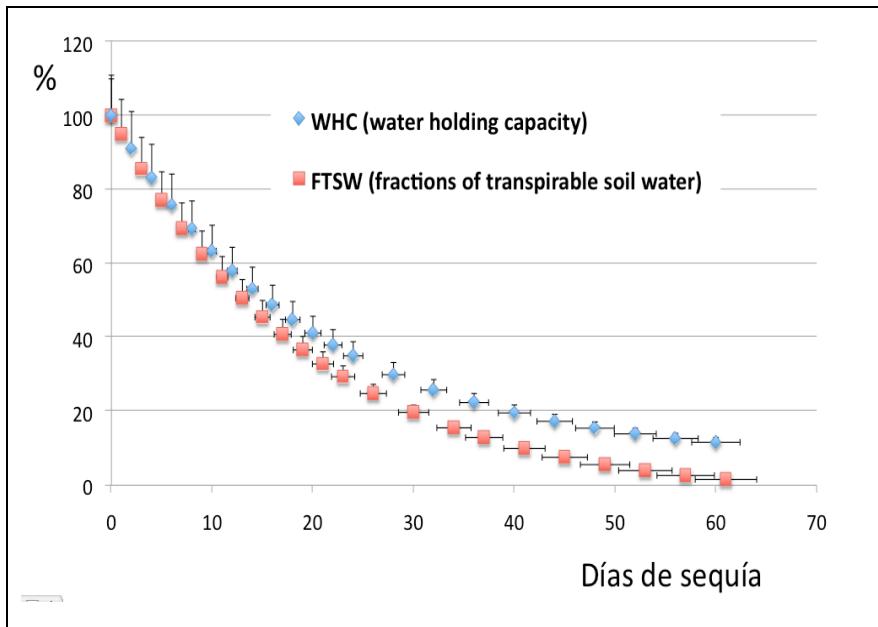
Fórmula 2. Relación para determinar WHC en base a los días que se expone a la sequía.

Por otra parte también se hizo la relación matemática del FTSW en base a WHC, con quien se puede considerar que tiene una relación lineal. Esta relación se presenta en la Fórmula 3, que también fue obtenida con el programa Grapher.

$$FTSW = 1.1111(WHC - 10)$$

Fórmula 3. Determinación de FTSW en base a WHC.

Con base en lo anterior, se hizo una simulación para obtener el comportamiento de humedad en suelo y ésta se muestra en la gráfica 11. Únicamente se pueden graficar los parámetros de sequía contra FTSW si esta ha sido linearizada.



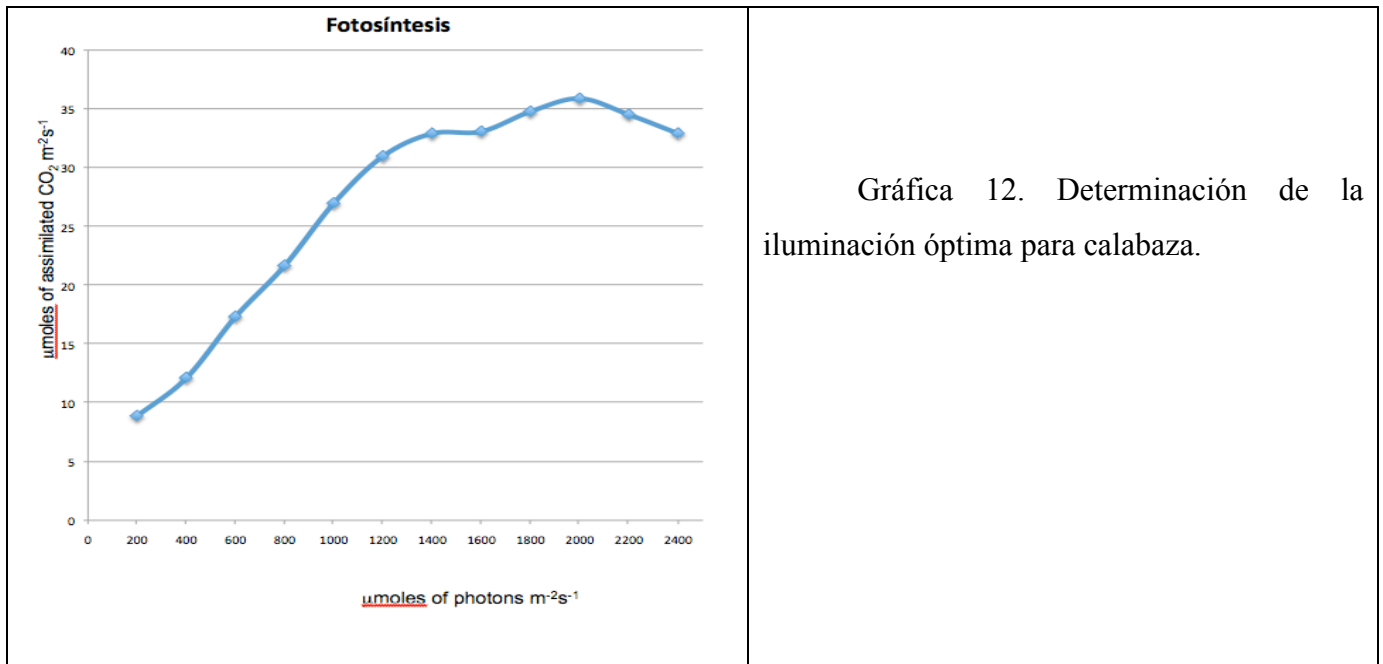
Gráfica 11. Linearización de WHC y FTSW con respecto a los días de sequía.

8.6.3.- Determinación de la intensidad de iluminación óptima.

La fotosíntesis depende mucho de la intensidad y el tipo de luz aplicado. Las plantas responden mejor a la luz roja y azul, generalmente a una relación de 75% de luz roja y 25% de luz azul en relación molar. El equipo con el que se trabajó, el IRGA, permite variar el flujo de luz desde 50 hasta 2500 μmol de fotones / m^2 segundo. La calabaza, al ser una planta ampliamente distribuida en el mundo y crecer en zonas que van desde las tropicales hasta las semiáridas, tiene una alta resistencia a altas intensidades de luz. Es de aclarar en este punto que la luz que no se aprovecha para la fotosíntesis generará radicales libres, especialmente para longitudes de onda cercanas al violeta; por lo que para un sistema eficiente de iluminación no se recomienda que sea pobre en luz roja. Sí hay exceso de iluminación modificará el parámetro de conductividad estomática y puede hacer que llegue a valores negativos más rápidamente,

DISCUSION Y RESULTADOS

por lo que es necesario hacer una serie de mediciones para determinar la iluminación máxima a la cual se puede trabajar. El equipo IRGA permite que se tenga una relación 50%/50% molar de luz roja y luz azul; esto gracias a los LEDs que tiene integrados en la sonda de muestreo. En la gráfica 12 se muestran los valores de la tasa de fotosíntesis contra la iluminación para determinar el valor óptimo para realizar las mediciones de estrés hídrico. Así se logró determinar que el valor óptimo bajo el cual se deben de realizar las mediciones es de 2000 μmol de fotones / m^2 segundo.



8.6.4.- Mediciones de parámetros de fotosíntesis con respecto a la sequía.

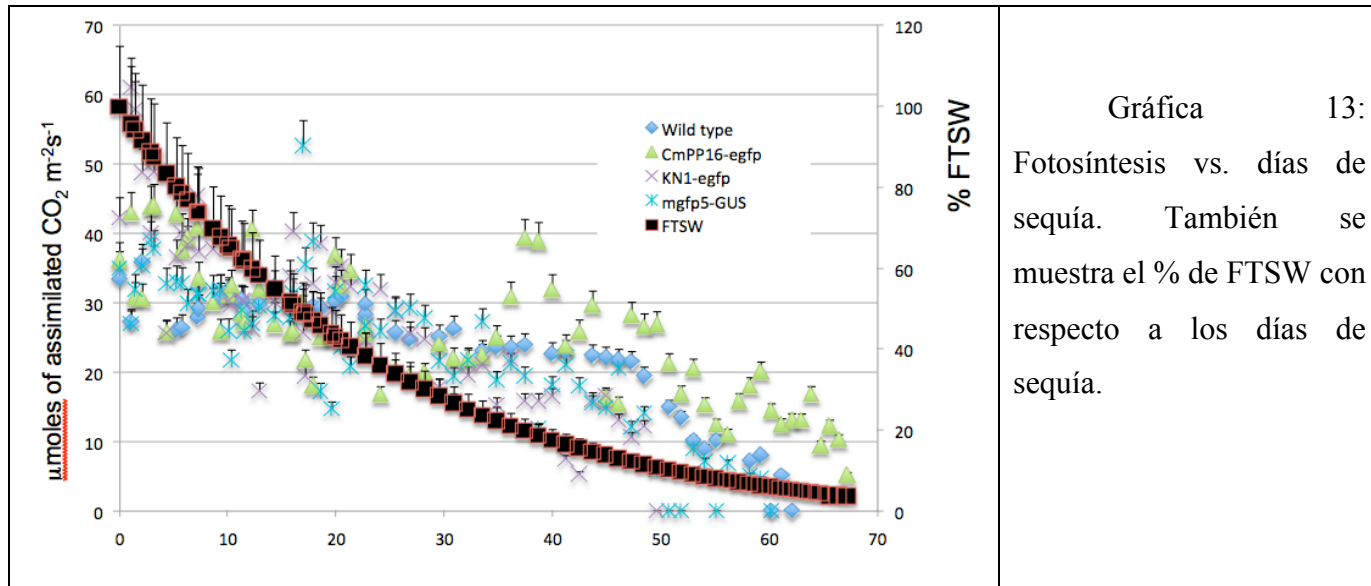
La tasa neta de fotosíntesis indica directamente si una planta está estresada o no, en este caso, cuando se someten las plantas a estrés hídrico, se observa que la fotosíntesis va decayendo conforme avanza la sequía. Se estuvieron midiendo los distintos parámetros fisiológicos para monitorear la respuesta de las plantas ante el estrés hídrico; dichos parámetros fueron: Fotosíntesis neta, Conductividad estomática y transpiración.

8.6.4.1.- Fotosíntesis neta ante el estrés hídrico.

Se sometieron plantas con las diferentes construcciones a estrés hídrico para evaluar su respuesta ante él. Al graficar la tasa fotosintética neta contra FTSW se observa en la Gráfica 13 que las plantas transformadas con la construcción CmPP16-EGFP muestran mayor tolerancia ante la sequía que las plantas silvestres y las otras construcciones. Se presenta un promedio de las construcciones de *A.*

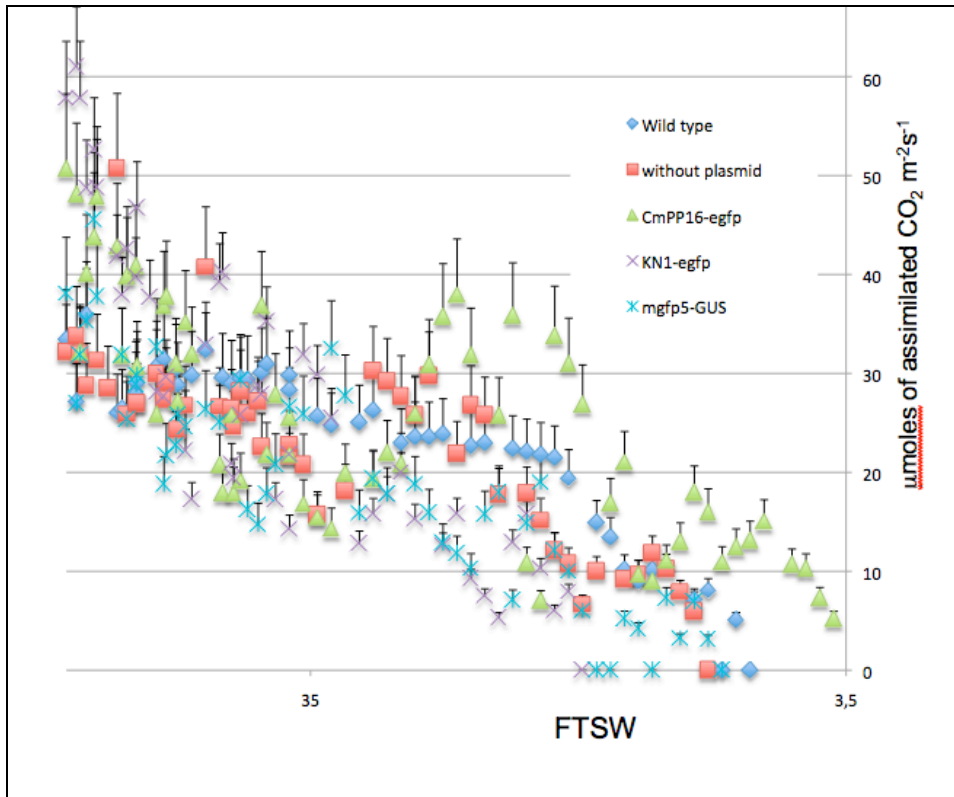
DISCUSION Y RESULTADOS

tumefaciens y *A. rhizogenes* y también la evolución de el FTSW linearizado con respecto a los días de sequía.

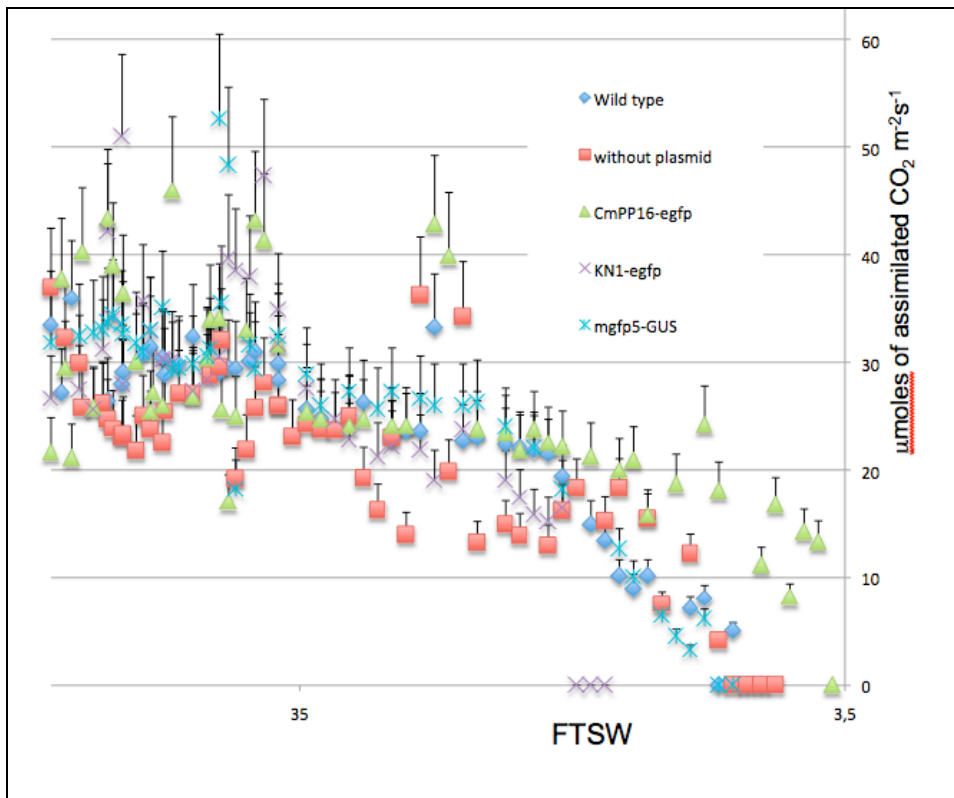


También se presentan los datos por separado para cada construcción y cepa, así como para las cepas sin plásmido (Gráficas 14 y 15). En ellas se logra observar que no hay diferencia significativa entre tratamiento y que las plantas transformadas con cepas sin plásmido no presentan una diferencia significativa con las plantas silvestres. Asimismo, en las plantas que fueron transformadas con las construcciones mGFP5-GUS, CmPP16-GFP o KN1-GFP no muestran variación con las plantas silvestres en condiciones normales.

DISCUSION Y RESULTADOS



Gráfica 14.
Medición de fotosíntesis durante el estrés hídrico en plantas transformadas con *A. rhizogenes*.

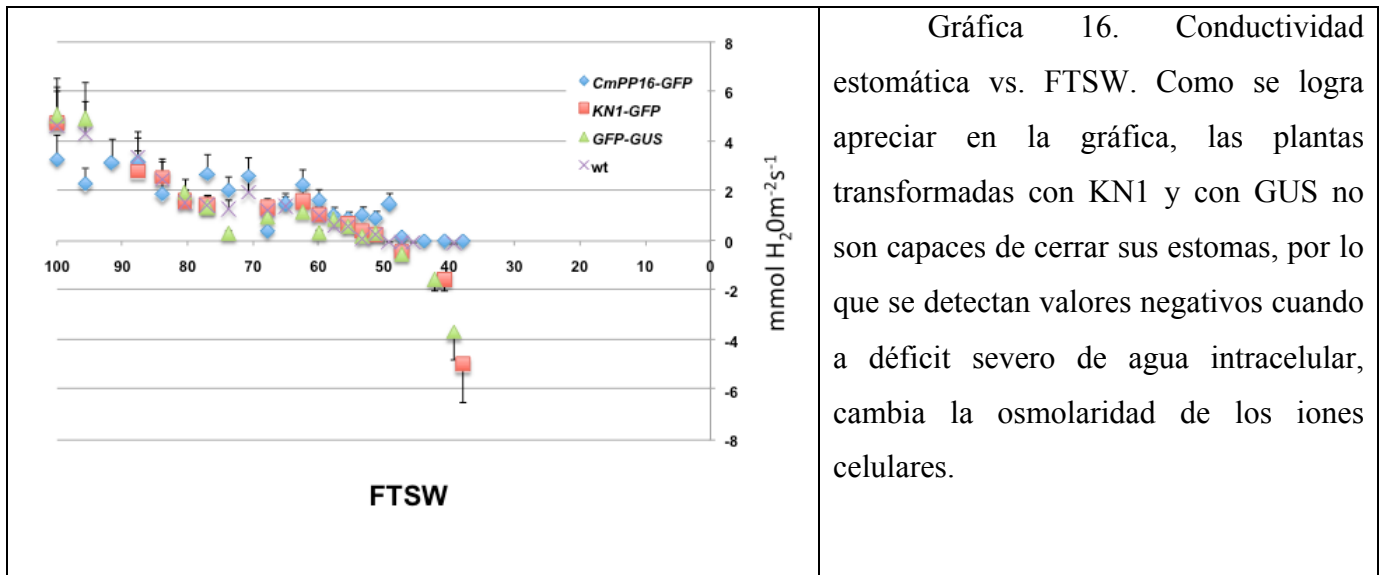


Gráfica 15.
Medición de fotosíntesis durante el estrés hídrico en plantas transformadas con *A. tumefaciens*.

DISCUSION Y RESULTADOS

8.6.4.2.- Conductividad estomática en plantas sometidas a estrés hídrico

Otro de los parámetros que se midió fue la conductividad estomática que nos dice de manera indirecta el nivel de estrés que tienen las células, pues cuando las plantas se someten a estrés hídrico, se acumula CO_2 intracelular, el cual interfiere con un gran número de reacciones, más para que se pueda acumular el CO_2 intracelular, Rubisco tiene que estar inhibida por otros factores ocasionados por el mismo estrés hídrico. La acumulación de CO_2 entre otras cosas modifica el pH intracelular, por lo que es importante conocer la tasa de eliminación, que mide de manera indirecta con la conductividad estomática. La gráfica 16 muestra la evolución de la conductividad estomática contra FTSW.



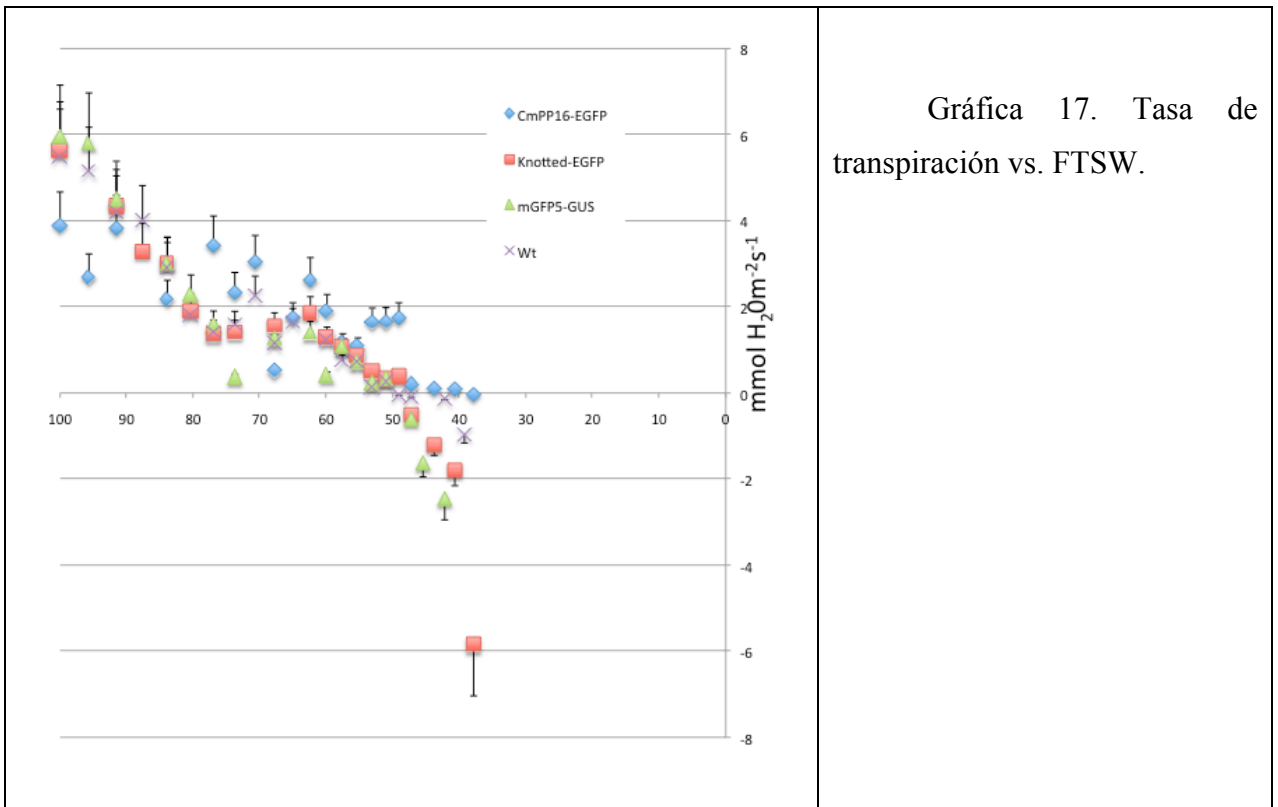
Gráfica 16. Conductividad estomática vs. FTSW. Como se logra apreciar en la gráfica, las plantas transformadas con KN1 y con GUS no son capaces de cerrar sus estomas, por lo que se detectan valores negativos cuando a déficit severo de agua intracelular, cambia la osmolaridad de los iones celulares.

Las plantas silvestres tienen un mecanismo natural para regular la apertura de los estomas, que al parecer está relacionada con la función de CmPP16. En efecto, esta construcción mantiene dicha respuesta, lo cual le permite también mantener la tasa fotosintética por más tiempo. Por otra parte en las plantas con la construcción KN1-GFP tal respuesta está comprometida y la conductividad estomática cae a valores negativos debido tal vez a su alta tasa metabólica. Esto también ocurre con las plantas con la construcción mGFP5-uidA; en este caso puede deberse a que poseen el promotor CaMV 35S, que es muy fuerte, e inevitablemente altera el metabolismo. Correlacionando la gráfica 15 con la 14, podemos ver que los valores negativos de conductividad estomática se observan a valores de FTSW menores al 50%, justo antes de que la tasa fotosintética comience a caer. Así que la conductividad estomática nos puede predecir la caída en la tasa fotosintética.

DISCUSION Y RESULTADOS

8.6.4.3.- Niveles de transpiración en plantas sometidas a estrés hídrico.

Un parámetro muy importante es la tasa de transpiración; cuando alcanza valores negativos indica que aunque hay pérdida de agua, no hay intercambio gaseoso eficiente, entonces hay acumulación de CO_2 y posiblemente también formación de especies reactivas de oxígeno. Las plantas de manera natural responden ante el estrés hídrico evitando la pérdida de agua por transpiración. En la gráfica 17 se muestra cómo responden las plantas disminuyendo su transpiración conforme aumenta el estrés hídrico. Se puede observar en la gráfica que aun las plantas silvestres tienen problemas para regular la transpiración, ya que en ellas ésta alcanza valores negativos, mientras que en las plantas con la construcción de CmPP16 ésta llega a cero. Esto indica que también la CmPP16 está involucrada con la tasa de transpiración en estrés hídrico.



Gráfica 17. Tasa de transpiración vs. FTSW.

9.- CONCLUSIONES

Es posible la transformación de *C. maxima* utilizando tanto *A. rhizogenes* K599, como *A. tumefaciens*.

La expresión quimérica de *KNOTTED1* en plantas de *C. maxima* menores a un mes es capaz de manifestarse con un cambio fenotípico en las hojas.

La expresión quimérica de *CmPP16* no va acompañada de cambios fenotípicos apreciables a simple vista, sin embargo su rol en la tolerancia a sequía se evidencia cuando los niveles de FTSW en suelo llegan a ser menores al 50%

El T-DNA proveniente de *Agrobacterium* tiene la capacidad de desplazarse a través del floema de *C. maxima*, ocasionando su transformación a nivel sistémico. Los transgenes son detectados en órganos distantes a los sitios iniciales de transformación de la planta en savia de floema, como RNA; es posible que éste pueda ser retrotranscrito e insertado en el genoma en tejidos distantes. Se demostró que dicho fenómeno no es causado por el desplazamiento de *Agrobacterium* dentro de la planta.

10.- BIBLIOGRAFIA

- Aigner A., (2006). Silencing through RNA interference (in vivo): **Strategies based on the direct application of siRNAs.** *Journal of Biotechnology* **124**: 12 – 25.
- Aoki K., Suzui N., (2005). **Destination-Selective Long-Distance Movement of Phloem Proteins.** *Plant Cell Preview*, 10.1105/tpc.105.031419.
- Balachandran S., Xiang, Y., Schobert, C., Thompson, G.A. & Lucas, W.J. (1997). **Phloem sap proteins from Cucurbita maxima and Ricinus communis have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**: 14150-14155.
- Barrera-Figueroa, B., Peña-Castro J., Acosta-Gallegos J. A., Ruiz-Medrano R. and Xoconostle-Cazares B., (2007). **Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars.** *Functional Plant Biol.*, **34**:368-381.
- Bartels D. and Sunkar R., (2005). **Drought and salt tolerance in plants.** *Crit Rev Plant Sci* **24**: 23-58.
- Bevan M., (1984). **Binary Agrobacterium vectors for plant transformation.** *Nucleic Acids* **12**:8711–8721.
- Blanco C., Ritzenthaler P., and Mata-Gilsinger J., (1982). **Cloning and endonuclease restriction analysis of uidA and uidR genes in E. Coli K-12 determination of transcription direction for the uidA gene.** *Journal of Bacteriology* **149**(2): 587-594.
- Blázquez M. A., Ahn J. H. and Weigel D., (2003). **A thermosensory pathway controlling flowering time in arabidopsis thaliana.** *Nat. Genet* **33**: 168-171.
- Blum, A., (1996). **Crop responses to drought and the interpretation of adaptation.** *Plant Growth Regulation.* **20**: 135-148.
- Booker, J., Chatfield, S. and Leyser O. (2003). **Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance.** *Plant Cell.* **15**: 495-507.

BIBLIOGRAFIA

- Bohnert, H.J. and E. Sheveleva, (1998). **Plant stress adaptations –making metabolism move.** *Curr. Opin Plant Biol.*, **1**:267-274.
- Braun A. C., Wood H. N., (1976). **Suppression of the neoplastic state with the acquisition of specialized functions in cells, tissues, and organs of crown gall teratomas of tobacco.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 496–500.
- Broughton W. J., Dilworth M. J., (1971): **Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans.** *Biochem J.*, **125**:1075-1080.
- Byung-Chun Y., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans A., Lee Y. M., Lough T. J. and Lucas W. J. (2004). **A Systemic Small RNA Signaling System in Plants.** *The Plant Cell* **16**:1979-2000.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W. and Prasher D. C., (1994). **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* **263**, 802-805.
- Chen I, Dubnau D. (2004). **DNA uptake during bacterial transformation.** *Nat. Rev. Microbiol.* **2** (3): 241–249.
- Chen, T. H. H., and Murata N., (2002). **Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes.** *Curr. Op. Plant Biol.* **5**: 250-257.
- Colasanti, J. and Sundaresan, V. (2000). **Florigen enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower.** *Trends Biochem Sci.*, **25**: 236-240.
- Dure L., M. Crouch J., Harada, T., Ho D., and Mundy J. I. (1989). **Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants.** *Plant Mol. Biol.*, **12**: 475-486.
- Eckardt N. A., Snyder G. W., Portis Jr. A. R., Ogren W. L. (1997). **Growth and Photosynthesis under High and Low Irradiance of Arabidopsis thaliana Antisense Mutants with Reduced Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase Content.** *American Society of Plant Biologists* **113**:575-586.
- Esquinas-Alcazar J. T. and Gulick P. J., (1983). **Genetic resources of Cucurbitaceae: A global report.** *1st ed. Intl. Board Plant Genet. Resour.*, IBPGR. Rome, Italy.

BIBLIOGRAFIA

- Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J. E., Guillén G., Díaz-Camino C., Campos F., Quinto C., Gresshoff P. M., Sanchez F., (2007): **Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by Agrobacterium rhizogenes.** *Nat Protoc.* **2**:1819-1824.
- Fromm M. E., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J. and Klein T. M., (1990). **Inheritance and expression of chimeric genes in the rogeny of transgenic. maize plants.** *Bio Technol.* **8**: 833-839.
- Fu Z. Q., Dong X. (2013). **Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense.** *Annu Rev Plant Biol.* **64**:839-863. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105606.
- Fütterer J., Gordon K., Sanfaçon H., Bonneville J. M. and Hohn T. (1990). **Positive and negative control of translation by the leader of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA.** *EMBO J.* **9**(6): 1697-1707
- Gilbertson R. L, Ruiz-Medrano R., Sudarshana M. and Lucas W. J., Plant Virus Movement. In: The Encyclopedia of Plant Pathology. Eds: Malloy, O. C. & Murray, T. D. John Wiley, New York, p.1063.
- Hake S., Vollbrecht E. V. and Freeling M., (1989). **Cloning knoffed, the dominant morphological mutant in maize using Ds2 as a transposon tag.** *EMBO J.* **8**:15-22.
- Hamilton A. J. and Baulcombe D. C., (1999). **A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.** *Science*, **286**: 950-952.
- Hartwell L. H., Hood L., Goldberg M. L., Reynolds A. E. and Silver M. L. **Genetics** (4th. Edition 2008). McGraw-Hill.
- Hinojosa-Moya J. J., Piedra-Ibarra E., Xoconostle-Cazares, B, Lucas W. J., Ruiz-Medrano R. (2008). **Phylogenetic and Structural analysis of translationally controlled tumor proteins.** *Journal of molecular evolution.* **66** (5): 472-483.
- Hutvagner, G., Mc. Lachlan J., Pasquinelli A. E., Balint, E., Tuschl T. and Zamore P. D., (2001). **A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.** *Science*, **293**: 834-838.

BIBLIOGRAFIA

- Ingram, J. and D. Bartels, (1996). **The molecular basis of dehydration tolerance in plants.** *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403.
- Jensen K. H., Liesche J. Bohr T. and Schulz A., (2012). **Universality of phloem transport in seed plants.** *Plant, cell and Enviroment* **35**: 1065-1076.
- Karimi M., Inzé D., Depicker A. (2002): **GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.** *Trends Plant Sci*, **7**:193-195.
- Katavic V, Jelaska S, Bakran-Petricioli T, David C: **Host tissue differences in transformation of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*.** *Plant Cell Tiss Org Cult* 1991 **24**: 473-497.
- Kim M., Canio W., Kessler S. and Sinha N., (2001). **Developmental changes due to long- distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato.** *Science*, **293**: 287-289.
- Klahre U., Crete P., Leuenberger S. A., Iglesias V. A. and Meins Jr. F. (2002). **High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**:11981-11986.
- Krüger-Lebus S. and Potrykus I., (1987) **A simple and efficient method for direct gene transfer to *Petunia hybrida* without electroporation.** *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**,289-294.
- Lalonde S, Weise A, Walsh RP, Ward JM, Frommer WB. (2003). **Fusion to GFP blocks intercellular trafficking of the sucrose transporter SUT1 leading to accumulation in companion cells.** *BMC Plant Biol.* 3:8. PMID: 14667250
- Levine, A., 1999. Oxidative Stress as a Regulator of Environmental Responses in Plants. In: Lerner, H.R. (Ed.). *Plant Responses to Environmental Stresses: from Phytohormones to Genome Reorganization.* New York, USA: Marcel Dekker, pp: 247-264.
- Lin M. K., Lee Y., Lough T. J., Phinney B. S. and Lucas W. J., (2009) **Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function.** *Mol Cell Proteomics*; **8**(2):343-56.
- Livak K. J., and Schmittgen T. D., (2001) **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* , **25**:402-408.

BIBLIOGRAFIA

- Lough T. J., Lucas W. J., (2006) **Integrative plant biology: role of phloem long distance macromolecular trafficking.** *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **57**:203-232.
- Lucas W. J., Bouche-Pillon S., Jackson D. P., Nguyen L., Baker L., Ding B. and Hake S., (1995). **Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata.** *Science*, **270**: 1980-1983.
- Maldonado A. M., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. J. and Cameron R. K., (2002). **A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis.** *Nature*, **419**:399-403.
- McGinnis W. and Krumlauf R., (1992). **Homeobox genes and axial patterning.** *Cell*. **68**(2): 283-302.
- McLean B. G., Greene E. A. and Zambryski P. C., (1998). **Mutants of *Agrobacterium* VirA that activate the *vir* gene expression in the absence of the inducer acetosyringone.** *J. Biol. Chem.* **269**:2645-2651.
- Miki B. and Mc Huhg S., (2004). **Selectable marker genes in transgenic plants applications, alternatives and biosafety.** *J. Biotech* **107**: 193-232
- Miyawaki A., Nagai T. and Mizuno H., (2005). **Engineering fluorescent proteins.** *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. **95**: 1-15
- Nakajima K., Sena G., Nawy T. and Benfey P. N., (2001). **Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning.** *Nature*, **413**: 307-311.
- Napoli C. A., Beveridge C. A., and Snowden K. C., (1999). **Reevaluating concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth.** *Curr. Top. Dev. Biol.*, **44**: 127-129.
- Neuhaus G., Spangenberg G., Mittelsten-Scheid O. and Schweiger, H. G., (1987). **Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore derived embryoids.** *Theor. Appl. Genet.* **75**, 30–36.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.M. & Vaucheret, H. (1997). **Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions.** *EMBO J.*, **16**:4738-4745.

BIBLIOGRAFIA

- Pattanagul W., (2011). **Exogenous Abscisic Acid Enhances Sugar Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) under Drought Stress.** *Asian Journal of Plant Sciences*, **10**:212-219.
- Phillips J. R., Oliver M. J. and Bartels D., (2002). **Molecular Genetics of Dessication and Tolerant Systems.** In **CAB International Dessication and Survival in Plants: Drying without Dying.** Black, M. and H. Pritchard (Ed.). CAB International pp: 319-341.
- Rao S. and Rohini V. K., (1999). **Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A simple protocol.** *Ann. Bot.*, **83**: 347-354
- Ramanjulu S. and Bartels D., (2002). **Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants.** *Plant Cell Environ.*, **25**:141-151.
- Raineri D. M., Bottino P., Gordon M. P., Nester E. W., (1990) **Agrobacterium mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.).** *Bio/Technol* **8**: 33–38.
- Ramanjulu S. and Bartels D. (2002). **Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants.** *Plant Cell Environ.* **25**:141-151.
- Rugini E., Pellegrineschi A., Mencuccini M., and Mariotti D., (1991). **Increase of rooting ability in the Woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizohenes rol* genes.** *Plant Cell Rpt*, **10**: 291-295.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B. and Lucas W. J., (1999). **Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants.** *Development* **126**: 4405-4419
- Ryals J., Lawton K. A., Delaney T. P., Friedrich L., Kessmann H., Neuenschwander U., Uknes S., Vernooij B. and Weymann K., (1995). **Signal transduction in systemic acquired resistance.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **92**: 4202-4205.
- Ryan C. A., and Pearce G., (1998). **Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**: 1-17.
- Salgado-Siclan M. L., Rojas-Martínez R., Zavaleta-Mejía E., Ochoa-Martínez D., Burgueño-Ferreira J., Xoconostle-Cázares B. and Ruiz-Medrano R. (2012). **Differential Accumulation of**

BIBLIOGRAFIA

- Defense-Related Transcripts by Inducers of Resistance in Arabidopsis.** *J. Plant Pathol. and Microb.* 3:6
- Stegemann S. and Bock R. (2009) **Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts.** *Science* **324**: 647-651.
- Sanford J. C. (1993) **Optimizing the biobalistic process for different biological applications.** *Meth Enzymol.* **217**: 483-509.
- Sanjur O. I., Piperno D. R., Andres T. C. and Wessel-Beaver L., (2002). **Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of Cucurbita (Cucurbitaceae).**
- Shimomura O., Head J. F. and Inouye. S., (2000). **The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution.** *Nature.* May 18; **405**(6784):372-6.
- Skillman J. B., Griffin K. L., Earll S. and Kusama M. Intechopen, Chapter 3: Photosynthetic Productivity. (<http://www.intechopen.com/books/thermodynamics-systems-in-equilibrium-and-non-equilibrium/photosynthetic-productivity-can-plants-do-better->)
- Sinauer, New York, NY. Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). **RNA silencing in plants--defense and counterdefense.** *Science* **292**: 2277-2280.
- Smarrelli J., Watters M. T. and Diba L. H., (1986), **Response of various Cucurbits to infection by plasmids harboring strains of Agrobacterium.** *Plant Physiol*, **82**: 622-624.
- Smigocki A. C. and Hammerschlag F. A., (1991). **Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of Agrobacterium.** *Journal Am. Soc. Hortic. Sci.* **116**: 1092-1097.
- Smith L. G., Greene B., Veit B and Hake S. (1992). **A dominant mutation in the maize homeobox gene, Knotted-1, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates.** *Development* **116**: 21-30.
- Stam M., Mol J. N. and Kooter M., (1997). **The silence of genes in transgenic.** *Ann Bot* **79**,3-12.
- Stegemann S. and Bock R. (2009), **Exchange of Genetic Material Between Cells in Plant Tissue Grafts.** *Science* **324**: 649.

BIBLIOGRAFIA

- Steve J. C. and Bent A. F., (1998), **Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.** The Plant Journal **16**(6):735-743.
- Taiz L. and Zeiger E., (2002). Plant Physiology (3rd. ed.). Sinauer, Sunderland, M. A.
- Turgeon R., (2010). **The Role of Phloem Loading Reconsidered.** American Society of Plant Biologists **152** (4): 1817-1823.
- Turnbull C. G. N. and Lopez-Cobollo R. M. (2013). **Tansley Review: Heavy traffic in the Fast Lane: long-distance signalling by macromolecules.** New phytol, **198**:33:51
- Tzfira T. and Citovsky V., (2002). **Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium.** Trends in Cell Biology, **12**:121:129.
- Ueki S. and Citovsky V., (2014). **Plasmodesmata-associated proteins: can we see the whole elephant?** Plant Signal Behav. **9**(2):e27899
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A and Willmitzer L (1990). **Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation.** *Mol. Gen. Genet.* **220**, 245-250
- Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). **RNA silencing in plants--defense and counterdefense.** *Science* **292**: 2277-2280.
- Van Larebeke, N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker I, Zaenen S, Schilperoort RA, Schell J: **Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall inducing ability.** *Nature* 1984, **252**:169-170.
- Vollbrecht E., Veit B., Sinha N. and Hake S. (1991). **The developmental gene Knotted-1 is a member of maize homeobox gene family.** *Nature* **350**: 241-243.
- Wu R. and Garg A. (2003). **Engineering rice plants with trehalose-producing genes improves tolerance to drought, salt and low temperature.** ISB News Report.
- Xiao B., Huang Y., Tang N. and Xiong L., (2007). **Overexpression of LEA gene in rice improves drought resistance under field conditions.** *Theoretical Applied Genet.*, **115**: 35-46.

BIBLIOGRAFIA

Xoconostle-Cazares B., Yu X., Ruiz-Medrano R., Wang H. L., Monzer J., Yoo, B. C., Mc Farland K. C., Franceschi V. R. and Lucas W. J. (1999) **Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem.** *Science* **283**: 94-98.

Xoconostle-Cazares B., Ramírez-Ortega F. A., Flores-Elenes L. and Ruiz-Medrano R., (2010). **Drought Tolerance in crop Plants.** *American Journal of Plant Physiology.* **5**: 241-256.

Yoo B. C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y. M., Lough T. J. and Lucas W. J., (2004) **A systemic small RNA signaling system in plants.** *Plant Cell* (**16**) 1979–2000

Zambryski P., and Crawford K., (2000). **Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **16**:393–421.

Zupan J., Citovsky V. and Zambryski P. (1996) **Agrobacterium VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plants cells.** *PNAS-USA.* **93**: 2392-2397.

<http://www.ee.unlv.edu/~eebag/Properties%20of%20Sunlight%20-%20Part%20I.pdf>

<http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/15477031/Floema-translocacion-y-retranslocacion-de-solutos.html>

<http://www.escuelapedia.com/los-tejidos-conductores/>