



UNIVERSIDAD DEL MAR
CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA
MUTANTE SUPERHIDROTRÓPICA (*suh1*) DE *Arabidopsis thaliana***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA
YULEMI ESCAMILLA DÍAZ**

**DIRIGIDA POR
M. EN B. MARÍA EUGENIA CAMPOS TORRES**

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA., SEPTIEMBRE DEL 2010

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la M. en B. María Eugenia Campos Torres en el laboratorio # 19 de la Dra. Gladys Cassab López del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de varias personas, por ello quiero agradecer:

A mi directora de tesis la M. en B. María Eugenia Campos Torres por los conocimientos transmitidos durante la realización de esta tesis, por contagiarme su dedicación por la ciencia, por motivarme a seguir adelante a pesar de todos los contratiempos que tuvimos y por sus críticas acertadas en la corrección de este escrito.

A la Dr. Gladys I. Cassab López por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por las contribuciones realizadas en la corrección de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Manuel Saucedo Ramírez y Nadia Porras González por su ayuda en el manejo del equipo y sobre todo por su grata compañía.

Al Dr. Arturo Reyes Ramírez, la M en C. Mónica Marcela Galicia Jiménez y la Dra. Elizabetha Hernández Domínguez por corregir este trabajo cuando solo era un protocolo de tesis.

A mis revisores de tesis la M en C. Mónica Marcela Galicia Jiménez, la M. en C. Julieta Karina Cruz Vázquez, la M. en C Mónica Alicia Calderón Oropeza y la Dra. Claudia Elia Villalobos Fernández por dedicar parte de su tiempo y experiencia en la corrección de este trabajo.

Al proyecto DGAPAIN220807-3 por la beca otorgada durante la realización de esta tesis.

A mis padres Paula Díaz Hernández y Augusto Escamilla Silva, y a mis hermanos Rocío, Aarón y Abel por su apoyo incondicional, por confiar en mí y por mostrar respeto y admiración por lo que hago.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Plantas	11
1.1.1. Anatomía de la planta	11
1.1.1.1. Funciones y estructura de la raíz	12
1.1.1.1.1. Absorción de agua por las raíces	13
1.2. Tropismos	13
1.2.1. Hidrotropismo	13
1.3. Estrés hídrico	13
1.4. Fitohormonas	14
1.4.1. Auxinas	14
1.4.2. Ácido abscísico (ABA)	14
1.4.3. Brasinoesteroides	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Primeros estudios acerca del hidrotropismo	16
2.2. Estudios recientes sobre el hidrotropismo	17
2.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo genético en el estudio del hidrotropismo	18
2.2.1.1. Mutantes hidrotrópicos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.2.1.1.1. Mutante no hydrotropic response (<i>nhr1</i>)	19
2.2.1.1.2. Mutante mizu-kuseei1 (<i>miz1</i>)	20
2.2.1.1.3. Mutante mizu-kuseei2 (<i>miz2</i>)	20
2.2.1.1.4. Mutante superhidrotrópica (<i>suh1</i>) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.2.1.1.4.1. Sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicos	20
2.2.1.1.4.2. Aislamiento de la mutante <i>suh1</i>	21
2.2.1.1.4.3. Características fenotípicas de <i>suh1</i>	22
2.2.1.1.4.4. Caracterización genética de <i>suh1</i>	22
2.2.1.1.4.4.1. Mapeo de <i>suh1</i>	22
2.2.1.1.4.4.2. Líneas tetraploides, origen y uso en el análisis	

genético de mutantes	24
2.2.1.1.4.4.3. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.2.1.1.4.4.3.1. Mutantes por inserción de T-DNA	26
2.2.1.1.4.4.3.1.1. Líneas Salk	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1. Objetivo general	30
5.2. Objetivos específicos	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1. Material vegetal	31
6.2. Estratificación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
6.3. Medios de cultivo	32
6.3.1. Medio de cultivo normal (MS 0.5X)	32
6.3.2. Medio de cultivo para aislar mutantes hidrotópicas	32
6.4. Siembra	32
6.5. Incubación	33
6.6. Tinción	33
6.7. Trasplante	33
6.8. Cruzas	33
6.9. Colecta de semillas	34
6.10. Extracción de ADN genómico	34
6.11. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
6.12. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1. Cuarta retrocruza entre la mutante <i>suh1</i> y la silvestre Col-0	37
7.2. La naturaleza semidominante de <i>suh1</i>	40
7.3. Identificación del fenotipo <i>suh1</i> en líneas de inserción de T-DNA	42
7.3.1. Líneas Salk evaluadas	42
7.3.2. Genotipificación	44
7.3.3. Evaluación de las líneas Salk genotipificadas en el medio de tamizado para aislar mutantes hidrotópicas	46
7.3.3.1. Aislamiento del homocigoto de las líneas Salk adquiridas	

como heterocigotas que mostraron raíces más largas que el control (Col-0)	49
7.3.3.2. Evaluación de los homocigotos de las líneas Salk cuyos heterocigotos mostraron raíces más largas que Col-0	51
7.3.3.3. Análisis fenotípico de las líneas Salk evaluadas en el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas	51
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
LITERATURA CITADA	65
APÉNDICES	73
1. Disoluciones stock de macro-nutrientes 50X, CaCl ₂ , 200X, Fe-EDTA 200X y micro-nutrientes 200X.	
2. Medio de cultivo normal (MS 0.5X)	
3. Medio estresante (ME 0.5X)	
4. FAA al 100%	
5. Lugol	
6. Metro-Mix 200	
7. Buffer CTAB 2X	
8. Buffer TBE 1X	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura típica de una planta	11
Figura 2. Sección longitudinal diagramática de la región apical de la raíz	12
Figura 3. Experimento de la canasta colgante de Sachs	16
Figura 4. Sistema experimental desarrollado para la inducción del hidrotropismo en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Figura 5. <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
Figura 6. Diagrama del sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas	21
Figura 7. Plántulas <i>suh1</i> y tipo silvestres (Col-0) de 11 días de crecimiento sobre el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas	22
Figura 8. Mapeo fino de la mutante superhidrotrópica <i>suh1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> mostrando los genes candidatos en la zona de máxima resolución	23
Figura 9. Mapa de restricción del vector pROK2 empleado en la generación de las líneas SALK	27
Figura 10. F1 producto de la cuarta retrocruza (<i>suh1</i> x Col-0), sobre el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas a los 11 días de edad	37
Figura 11. F2 producto de la cuarta retrocruza sobre el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas a los 11 días de edad	39
Figura 12. Estructura de la cofia de una raíz silvestre (Col-0), heterocigota (F1B4) y homocigota (F6B3) mutante <i>suh1</i> vistas con un microscopio óptico usando el objetivo 20X, a los 11 días de edad	40
Figura 13. Plántulas F1 (triploides), resultado de las cruza CS3151 (♀) x <i>suh1</i> (♂) y CS3432 (♀) x <i>suh1</i> (♂), de 11 días de edad creciendo en el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas con sus respectivos controles CS3151 x Col-0 (CS1 x C), CS3432 x Col-0 (CS2 x C), CS3151 (CS1), CS3432 (CS2), <i>suh1</i> y Col-0	41
Figura 14. Regiones del T-DNA y del gen de interés que se utilizaron en el diseño de los oligonucleótidos; necesarios en la genotipificación de las líneas SALK	44
Figura 15. Análisis de PCR con el que se evaluó la condición homocigota, heterocigota o silvestre de una muestra confirmativa de cada línea Salk sin genotipificar	44
Figura 16. Líneas Salk que mostraron raíces más largas que el control (Col-0) sobre el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas a los 11 días de edad	47
Figura 17. Líneas Salk con raíces cortas de menor longitud que Col-0 sobre el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas a los 11 días de edad	48
Figura 18. Análisis de PCR con el que se evaluó la condición homocigota, heterocigota o silvestre de una muestra confirmativa de cada línea Salk adquirida como heterocigota, que al evaluarse en el medio de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas mostró raíces más largas que el control (Col-0)	50
Figura 19. Heterocigoto (HZ) y homocigoto (HM) de la línea SALK_131342	

(At2g34080, cisteín proteinasa) sobre el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas 51

Figura 20. Longitud promedio de raíces silvestres (Col-0), *suh1*, SALK_041384 (HM/UTR 5'; At2g33990, proteína de unión a calmodulina), SALK_011108 (HM/9° intrón; At2g34040, anti-apoptosis), SALK_008073 (HM/9° exón; At2g34040, anti-apoptosis), SALK_58376 (HM/promotor; At2g34060, peroxidasa), SALK_051197 (HM/3° exón; At2g34060, peroxidasa), SALK_131342 (HM/promotor; At2g34080, cisteín proteinasa), SALK_134303 (HM/2° exón; At2g34080, cisteín proteinasa), SALK_122423 (HM/3° exón; At2g34090, MEE18), SALK_112753 (HZ/único exón; At2g34130, transposón) y SALK_085541 (HM/promotor; At2g34140, proteína dedos de zinc tipo Dof) a los 11 días de edad 54

Figura 21. Representación esquemática del hidrotrotropismo en raíces de plántulas de *Arabidopsis* 62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Fenotipo en el medio de tamizado de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> empleadas en los experimentos realizados	31
Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para genotipificación	35
Tabla III. Fenotipos observados en la generación F1 producto de la cuarta retrocruza entre la mutante <i>suh1</i> y la silvestre Col-0, 11 días después de la siembra	38
Tabla IV. Análisis estadístico Chi-cuadrada (X^2) con el que se definió si la segregación del fenotipo mutante <i>suh1</i> en F2 (F2B4) se ajusta a la proporción 1:2:1 esperada para una mutación monogénica semidominante	39
Tabla V. Frecuencia de varias clases de fenotipos observados en la F1 (triploide) resultado de las cruzas entre el homocigoto mutante <i>suh1</i> y las líneas tetraploides CS3151 y CS3432	41
Tabla VI. Lista de las líneas mutantes por inserción de T-DNA (líneas Salk) evaluadas en el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas	42
Tabla VII. Análisis fenotípico de las mutantes por inserción de T-DNA (líneas Salk) que afectan 18 de los 22 genes definidos por el mapeo fino de la mutante <i>suh1</i> , así como las regiones intergénicas ubicadas en esta zona	51
Tabla VIII. Análisis <i>in silico</i> de elementos regulatorios que actúan en <i>cis</i> sobre los promotores de los genes que mostraron una respuesta hidrotrópica alterada en el medio de tamizado para aislar mutantes hidrotrópicas	60

RESUMEN

Las raíces muestran una respuesta hidrotópica en presencia de gradientes de humedad, la respuesta hidrotópica es importante porque permite a la raíz dirigir su crecimiento hacia zonas del suelo con mayor humedad y de esta forma obtener el agua y nutrientes que la planta requiere para sobrevivir. El mecanismo molecular que regula la respuesta hidrotópica es aún desconocido, por ello los esfuerzos de algunos laboratorios se han centrado en el aislamiento de mutantes hidrotópicos empleando como modelo a *Arabidopsis thaliana*, que permitan identificar los elementos clave de este proceso, aislándose hasta el momento cuatro mutantes con una respuesta hidrotópica alterada: *nhr1*, *miz1*, *miz2* y *suh1* (Eapen *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2007; Miyazawa *et al.*, 2009b). La mutante superhidrotópica (*suh1*) se aisló empleando el sistema de tamizado para aislar mutantes hidrotópicos, este sistema consiste en dos medios, uno estresante (ME) colocado en la parte superior de una caja Petri cuadrada y otro normal (MN) colocado en la parte inferior de esta, las raíces de *suh1* crecen continuamente bajo condiciones severas de déficit hídrico por diez días hasta alcanzar las condiciones de potencial de agua moderadas presentes en la sección inferior de la caja Petri que contiene el medio normal, lo que no ocurre con la silvestre Col-0 que se queda en el medio estresante sin poder sobrevivir (Saucedo, 2001). Como parte de la caracterización genética de esta mutante en este trabajo se determinó a través de una retrocruza adicional que la mutación en *suh1* es semidominante, este análisis además nos permitió aislar el homocigoto mutante *suh1*. El análisis microscópico de cofias homocigotas mutantes reveló que, a diferencia de la silvestre, estas poseen gránulos de almidón y varias capas de células tipo borde lo que indica una tasa de crecimiento mayor en ellas. El análisis de triploides que contienen una copia del gen *SUHI* mutada y dos silvestres permitió inferir que la mutación en *suh1* originó pérdida de la función del gen, mientras que el análisis de las mutantes por inserción de T-DNA (líneas Salk) de los genes definidos por el mapeo fino de *suh1* reveló que el mejor candidato para tener la mutación puntual es el gen At2g34080 que codifica para la síntesis de una cisteín proteinasa, la cual al parecer está involucrada en la degradación de factores de respuesta a auxinas (ARFs) que son determinantes en el crecimiento diferencial de la raíz que origina la curvatura hidrotópica.