



## TESIS DE MAESTRÍA

**“Análisis de la función de los genes ROS1 (*Repressor Of Silencing 1*) y SPL12 (*Squamosa Promoter-binding protein-like 12*) durante el desarrollo de la semilla en *Amaranthus hypochondriacus*”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

PRESENTA

**IBQ. Yunuen Quetzali Garduño Tamayo**

DIRECTOR DE TESIS

**Dr. Gerardo Acosta García**

CO-DIRECTOR DE TESIS

**Dr. Mario Martín González Chavira**

Celaya, Gto., Diciembre 2020



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Celaya, Gto., 13/octubre/2020

Asunto: Acta de liberación de tesis

**COORDINACIÓN DEL MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
PRESENTE**

Los miembros del comité tutorial asignado a la alumna **C. YUNUEN QUETZALI GARDUÑO TAMAYO** con número de control **M1803097**, quien presentó su tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GENE ROS 1 DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA EN *Amaranthus hypochondriacus*"**, se reunieron el día **13 de octubre** a las **9:00 horas**, para evaluar el desempeño de la estudiantes referida y después de escuchar la exposición correspondiente al trabajo de tesis, realizar los cuestionamientos pertinentes y haber revisado el trabajo escrito presentado, se ha realizado la deliberación correspondiente y se consideró que la alumna obtuvo una calificación promedio de :

96 (Escala 0-100)

Generando las siguientes observaciones:

- Se recomienda ajustar el titulo y los objetivos específicos del proyecto con base a los resultados obtenidos
- Mejorar la redacción de la justificación; mejorar la redacción de los resultado y enriquecer la discusión de estos.
- Atender las observaciones particulares enviadas por los miembros de comité

Por lo cual el comité: AUTORIZA la impresión de la tesis.

**ATENTAMENTE**  
*La técnica por un México mejor ®*  
**EL COMITÉ TUTORIAL**

DR. GERARDO ACOSTA GARCÍA  
**PRESIDENTE**

DR. GUILLERMO ANTONIO SILVA MARTÍNEZ  
**SECRETARIO**

DRA. RITA MIRANDA LÓPEZ  
**VOCAL**

DR. MARIO MARTÍN GOZÁLEZ CHAVIRA  
**ASESOR EXTERNO**





MAESTRIA EN CIENCIAS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
Celaya, Gto., 15/Octubre/2020.  
Asunto: Carta de Cesión de Derechos.

DR. JOSÉ LÓPEZ MUÑOZ  
DIRECTOR DEL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA

PRESENTE

En la ciudad de Celaya, Guanajuato, México el día 17 del mes de octubre del año 2020, la que suscribe **Yunuen Quetzali Garduño Tamayo**, alumna de la **Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica** con número de control **M1803097**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dr. Gerardo Acosta García**, y cede los derechos del trabajo “**Análisis de la función de los genes *ROS1 (Repressor Of Silencing 1)* y *SPL12 (Squamosa Promoter-binding protein-Like 12)* durante el desarrollo de la semilla en *Amaranthus hypochondriacus*” al Instituto Tecnológico de Celaya para su difusión, con fines académicos y de investigación.**

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso del autor y directores del trabajo. Este podrá ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo electrónico: [m1803097@itcelaya.edu.mx](mailto:m1803097@itcelaya.edu.mx), [gerardo.acosta@itcelaya.edu.mx](mailto:gerardo.acosta@itcelaya.edu.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Yunuen Quetzali Garduño Tamayo**  
Nombre y Firma

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	0
ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
I. ANTECEDENTES .....	1
1.1    Amaranto .....	1
1.1.1 Taxonomía y características botánicas .....	1
1.1.2 Composición química de la semilla de amaranto .....	3
1.1.3 Calidad biológica de proteínas .....	4
1.1.4 Importancia económica.....	5
1.2 <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	6
1.2.1 Variedad revancha .....	6
1.3    Desarrollo del gametofito femenino y embrión en <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L	7
1.3.1 Megasporogénesis y megagametogénesis .....	7
1.3.2 Embriogénesis .....	9
1.4    Regulación en el desarrollo del gametofito femenino y la semilla.....	10
1.4.1 Regulación de la megasporogénesis .....	10
1.4.2 Regulación de la megagametogénesis .....	11
1.5    Metilación del ADN.....	12
1.6    Desmetilación del ADN.....	14
1.7 <i>ROSI</i> .....	16
1.7.1 Regulación de <i>ROSI</i> .....	18

1.8 Proteínas similares a las proteínas de unión a promotores de <i>SQUAMOSA (SPL)</i> ....	19
1.9 <i>SPL12</i> .....	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPOTESIS .....	23
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
II. MATERIALES Y METODOS.....	25
2.1. Materiales .....	25
2.2 METODOLOGÍA.....	25
2.2.1 Análisis <i>in silico</i> de <i>AmROS1</i> y <i>AmSPL12</i> .....	25
2.3 Analizar el patrón de expresión del gen <i>AmROS1</i> y <i>AmSPL12</i> durante el desarrollo floral de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	25
2.3.1 Diseño de oligonucleótidos para <i>AmROS1</i> y <i>AmSPL12</i> .....	25
2.3.2 Extracción de ARN: Método del TRIzol® Reagent.....	26
2.3.3 RT-PCR.....	26
2.3.4 Real-Time PCR .....	26
2.4 Diseñar y clonar una sonda específica para realizar análisis de expresión mediante <i>hibridación in situ</i> para los genes <i>AmROS1</i> y <i>AmSPL12</i> durante el desarrollo del óvulo en Amarantho .....	27
2.4.1 Amplificación por PCR de la sonda para <i>AmROS1</i> .....	27
2.4.2 Ligación al vector pGEM®-T Easy.....	28
2.4.3. Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5α).....	29
2.4.4 Extracción de ADN plasmídico.....	29
2.4.5 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Eco RI</i> .....	30

2.4.6 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Sty I</i> .....	30
2.4.7 Diseño de oligonucleótidos sonda <i>AmSPL12</i> .....	31
2.5 Diseñar una estrategia para la generación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sobreexpresantes de los genes <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> .....	31
2.5.1 Amplificación por PCR del gen <i>AmROSI</i> .....	31
2.5.2 Amplificación por PCR del gen <i>AmSPL12</i> .....	33
2.5.3 Ligación al vector pGEM <sup>®</sup> -T Easy.....	34
2.5.4. Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5 $\alpha$ ).....	34
2.5.5 Extracción de ADN plasmídico.....	34
2.5.6 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Eco RI</i> .....	34
2.5.7 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por el método de infiltración floral. Una vez que ya se tenga la construcción confirmada en <i>A. thumefaciens</i> se llevara a cabo la transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> tipo silvestre (Apendice A.5). .....	35
2.5.8 Analizar el patrón de expresión del gen <i>DEMETER</i> en plantas sobreexpresantes de <i>AmROSI</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	35
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
3.1 Realizar un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> con las reportadas en otras especies .....	36
3.1.1 Análisis <i>in silico</i> de <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> .....	36
3.2 Analizar el patrón de expresión del gen <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> .....	38
3.1.2 Diseño de oligonucleótidos para <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> .....	38
3.1.3 Análisis de expresión durante el desarrollo de la planta .....	40
3.1.4 Real-Time PCR .....	41

3.3 Diseñar y clonar una sonda específica para realizar análisis de expresión mediante <i>hibridación in situ</i> para los genes <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> durante el desarrollo del óvulo en Amaranto .....	43
3.3.1 Amplificación por PCR de la sonda para <i>AmROSI</i> .....	43
3.3.2 Ligación al vector pGEM®-T Easy.....	44
3.3.3 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Eco</i> RI.....	44
3.3.4 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Sty</i> I.....	45
3.4 Diseñar una estrategia para la generación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sobreexpresantes de los genes <i>AmROSI</i> y <i>AmSPL12</i> .....	46
3.4.1 Amplificación por PCR del fragmento del gen <i>AmROSI</i> .....	46
3.4.2 Amplificación por PCR del fragmento del gen <i>AmSPL12</i> .....	47
3.4.3 Ligación gen <i>AmSPL12</i> al vector pGEM®-T Easy .....	48
3.4.4 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>Eco</i> RI.....	48
3.4.5 Digestión con la enzima de restricción <i>Sac</i> I para liberar el fragmento del gen <i>AmSPL12</i> .....	49
3.4.6 Diseño de oligonucleótidos para <i>DEMETER</i> .....	50
IV. CONCLUSIONES .....	53
V. PERSPECTIVAS.....	54
VI. REFERENCIAS .....	55
VIII. APENDICE .....	67
A.1 Extracción de ARN: Método del TRIzol® Reagent.....	67
A.2 Hibridación <i>in situ</i> .....	68
A.3 Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5α) .....	72
A.4 Extracción de ADN plasmídico.....	73

A.5 Transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de infiltración floral..... 74



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación botánica del amaranto.....	4
Tabla 2 Valor nutritivo de la semilla cruda de amaranto comparado con cereales comunes (gr /100 g).....	5
Tabla 3 Composición de aminoácidos esenciales.....	7
Tabla 4 Principales estados productores de amaranto en México.....	8
Tabla 5 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación sonda <i>AmROSI</i> .....	30
Tabla 6 Mezcla de reacción de ligación al vector pGEM - T Easy.....	31
Tabla 7 Mezcla de reacción de digestión con <i>Eco RI</i> .....	32
Tabla 8 Mezcla de reacción de digestión <i>Sty I</i> para liberar el fragmento de la sonda <i>AmROSI</i> .....	33
Tabla 9 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento <i>AmROSI</i> .....	34
Tabla 10 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento <i>AmSPL12</i> .....	35
Tabla 11 Mezcla de reacción de digestión <i>Sac I</i> para liberar el fragmento <i>AmSPL12</i> .....	37
Tabla 12 Oligonucleótidos utilizados para el gen <i>AmROSI</i> .....	41
Tabla 13 Oligonucleótidos utilizados para el gen <i>AmSPL12</i> .....	41
Tabla 14 Extracciones de ARN a tejidos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	43
Tabla 15 Oligonucleótidos para <i>DEMETER</i> .....	52
Tabla 16 Extracciones de ARN de botón <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
Tabla 17 Soluciones para tratamiento previo del tejido.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología <i>Amaranthus hypochondriacus</i> variedad Revancha.....	9
Figura 2 Megasporogenesis y megagametogenesis de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	10
Figura 3 Etapas durante la embriogénesis de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	12
Figura 4 Modelo de desmetilación en el gametofito femenino.....	17
Figura 5 Desmetilación de ADN activa es mediada por el mecanismo de reparación por escisión de base.....	18
Figura 6 Fenotipo mutante de la mutante de <i>ros1</i> .....	20
Figura 7 Regulación de <i>ROS1</i> por vía de ensamblaje (CIA) y Metilación del ADN.....	21
Figura 8 Análisis de expresión de <i>SPL12</i> .....	22
Figura 9 Fenotipo de la mutante de <i>spl12</i> .....	23
Figura 10 Crecimiento vegetativo de las plantas de <i>spl12-1</i> después tratamiento térmico.....	23
Figura 11 Condiciones establecidas para oligonucleótidos sonda <i>AmROS1</i> .....	30
Figura 12 Condiciones establecidas para oligonucleótidos sobreexpresión <i>AmROS1</i> .....	34
Figura 13 Condiciones establecidas para oligonucleótidos sobreexpresión <i>AmSPL12</i> .....	35
Figura 14 Alineamiento de secuencias de aminoácidos de DML en cereales conocidos.....	39
Figura 15 Alineamiento de secuencias de aminoácidos de SPL en otras especies.....	40
Figura 16 Extracción de ARN a tejidos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	42
Figura 17 Niveles de expresión <i>AmROS1</i> en tejidos de <i>Amaranthus Hypochondriacus</i> .....	44
Figura 18 Niveles de expresión <i>AmSPL12</i> en tejidos de <i>Amaranthus Hypochondriacus</i> ...	45
Figura 19 Amplificación sonda <i>AmROS1</i> .....	46
Figura 20 ADN plasmídico sonda con pGEM®-T Easy .....	46
Figura 21 Digestión sonda con <i>Eco</i> RI.....	47
Figura 22 Digestión sonda con <i>Sty</i> I.....	48

Figura 23 Amplificación gen <i>AmROSI</i> .....	49
Figura 24 Amplificación gen <i>AmSPL12</i> .....	50
Figura 25 ADN plasmídico de <i>AmSPL12</i> en el vector pGEM®-T Easy.....	50
Figura 26 Digestión de la sonda con <i>Eco</i> RI.....	51
Figura 27 Digestión de la sonda con <i>Sac</i> I.....	51
Figura 28 Extracción de ARN de botón floral de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
Figura 29 Condiciones de amplificación de la secuencia genómica del gen <i>DEMETER</i> .....	54

## RESUMEN

El amaranto o *Amaranthus* es un género de plantas herbáceas y anuales perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, que comprende más de 70 géneros y aproximadamente 80 especies. Hasta ahora se ha reportado que *Amaranthus hypochondriacus* cuenta con 12.9% de proteínas, y concentraciones elevadas de lisina aproximadamente 6.1g/ 100 g de proteína; aminoácido esencial que está en baja proporción en otros cereales, lo cual confiere al amaranto un alto valor nutricional. Dicha característica y debido a los cambios en los hábitos alimenticios de la población, permiten centrar la atención al estudio del grano de amaranto. Para este cultivo no existen estudios detallados en los que se describan los mecanismos genéticos y moleculares que regulan el desarrollo de la semilla, por lo cual en el presente trabajo se tiene como objetivo estudiar la función de *ROS1* (*Represor of silencing 1*) y *SPL12* (*Squamosa Promoter Like 1*) en Amaranto, los cuales desempeñan una función importante durante el desarrollo de la semilla *Arabidopsis thaliana* y a su vez regulan a diversos genes como *DEMETER* encargado de llevar a cabo la desmetilación de las primeras etapas de la formación de la semilla.

En este trabajo, se analizó la expresión relativa del gen *AmROS1* y *AmSPL12* mediante análisis de RT-PCR tiempo real en diferentes tejidos. Tépalos y óvulos antes de fecundación presentaron mayor expresión de ambos genes *AmROS1* y *AmSPL12*, lo cual sugiere que ambos podrían ser determinante en las etapas de diferenciación del gametofito femenino y por lo tanto de la semilla de Amaranto, así como que estos podrían estar relacionados. Una vez que se determinó la expresión de *AmROS1* y *AmSPL12*, para realizar un estudio detallado de las etapas y células donde se expresan, se diseñó una sonda de hibridación, la cual clonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy y se utilizara para el análisis de hibridación *in situ*.

Para el análisis de función el gen *AmROS1*, se decidió realizar una construcción para la sobreexpresión de *AmROS1* mediante la clonación en el vector pBin35S, el cual contiene el promotor constitutivo *35SCaMV*. Para esto, se obtuvo el cDNA de *AmROS1* y *AmSPL12* para su sobreexpresión en plantas de *Arabidopsis thaliana* y de esta manera analizarlo durante el desarrollo de la semilla. Además, una vez que se tenga la línea sobreexpresante de *AmROS1* y *AmSPL12*, se analizará la expresión del gen *DEMETER* para estudiar su regulación por *AmROS1*.

## SUMMARY

Amaranth or *Amaranthus* is a genus of herbaceous and annual plants belonging to the *Amaranthaceae* family, comprising more than 70 genera and approximately 80 species. Until now it has been reported that *Amaranthus hypochondriacus* has 12.9% protein, and high concentrations of lysine approximately 6.1g / 100g of protein; Essential amino acid that is in a low proportion in other cereals, which gives amaranth a high nutritional value. This characteristic and due to the changes in the eating habits of the population, allow us to focus our attention on the study of the amaranth grain. For this crop, there are no detailed studies that describe the genetic and molecular mechanisms that regulate seed development, for which reason the present work aims to study the function of *ROS1* (*Repressor of silencing 1*) and *SPL12* (*Squamosa Promoter Like 1*) in Amaranth, which play an important role during the development of the *Arabidopsis thaliana* seed and in turn regulate various genes such as *DEMETER* in charge of carrying out the demethylation of the first stages of seed formation.

In this work, the relative expression of the *AmROS1* and *AmSPL12* gene was analyzed by real-time RT-PCR analysis in different tissues. Tepal and ovule before fertilization showed higher expression of both *AmROS1* and *AmSPL12* genes, which suggests that both could be determinant in the differentiation stages of the female gametophyte and therefore of the Amaranth seed, as well as that these could be related. Once the expression of *AmROS1* and *AmSPL12* was determined, in order to carry out a detailed study of the stages and cells where they are expressed, a hybridization probe was designed, which was cloned in the pGEM®-T Easy vector and used for the analysis hybridization *in situ*.

For the analysis of the function of the *AmROS1* gene, it was decided to make a construction for the overexpression of *AmROS1* by cloning it into the vector pBin35S, which contains the constitutive *35SCaMV* promoter. For this, the cDNA of *AmROS1* and *AmSPL12* was obtained for its overexpression in *Arabidopsis thaliana* plants and thus analyzed during seed development. Furthermore, once the overexpressing line of *AmROS1* and *AmSPL12* is obtained, the expression of the *DEMETER* gene will be analyzed to study its regulation by *AmROS1*.

# I. ANTECEDENTES

## 1.1 Amaranto

### 1.1.1 Taxonomía y características botánicas

El Amaranto pertenece a la familia de las *Amaranthaceae* y del género *Amaranthus* (**Tabla 1**). Esta familia comprende 60 géneros y cerca de 80 especies. Las especies más importantes y conocidas son: *Amaranthus caudatus* L, *Amaranthus hypochondriacus* L, *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hybridus* L, *Amaranthus tricolor* L, *Amaranthus blitum* L., *Amaranthus virides* L, de las cuales *Amaranthus hypochondriacus* L, *Amaranthus caudatus* L y *Amaranthus cruentus* L son las principales especies productoras de grano (Sauer, 1967; Feine *et al.*, 1979).

El amaranto es un grano muy versátil que se cultiva en una amplia gama de condiciones agroclimáticas; presenta gran tolerancia a la sequía, el calor y las plagas, y se adapta fácilmente a nuevos entornos, incluidos algunos que son inhóspito para los cultivos de cereales convencionales (Kaur *et al.*, 2010).

El amaranto es una especie anual, herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias. La raíz es pivotante con abundante ramificación y múltiples raicillas delgadas, que se extienden rápidamente después que el tallo comienza a ramificarse, facilitando la absorción de agua y nutrientes, la raíz principal sirve de sostén a la planta, permitiendo mantener el peso de la panoja. El tallo es cilíndrico y anguloso de 0.4 a 3 m de longitud, cuyo grosor disminuye de la base al ápice, presenta distintas coloraciones que generalmente coinciden con el color de las hojas, aunque en muchos casos empiezan desde la base o a media altura y que se originan de las axilas de las hojas (Kaur *et al.*, 2010).

Tapia (1997) menciona que las hojas son pecioladas, sin estipulas de forma oval, elíptica, opuestas o alternas con nervaduras prominentes en el envés, lisas o poco pubescentes de color verde o púrpura cuyo tamaño disminuye de la base al ápice, presentando borde entero, de tamaño variable de 6.5 m a 0.15 m. La inflorescencia del amaranto corresponde a panojas amarantiformes o glomeruladas muy vistosas, terminales o axilares, con colores que van del amarillo, anaranjado, café, rojo, rozado, hasta el púrpura; el tamaño varía de 50 a 90 cm.

Las plantas por el tipo de polinización son predominantes autógamas, variando el porcentaje de polinización cruzada con los cultivares. El fruto es una cápsula pequeña que botánicamente corresponde a un pixidio unilocular, la que a la madurez se abre transversalmente, dejando caer la parte superior llamada opérculo, para poner al descubierto la inferior llamada urna, donde se encuentra la semilla. Siendo dehiscente por lo que deja caer fácilmente la semilla (Sánchez, 1980). La semilla es pequeña, lisa, brillante de 1 a 1.5 mm de diámetro, ligeramente aplanada, de color blanco, aunque existen de colores amarillentos dorados, rojos, rosados, púrpuras y negros; el número de semillas varía de 1 a 3 kg (Nieto, 1990). Las especies silvestres presentan granos de color negro con la episperma muy dura. En el grano se distinguen cuatro partes importantes: episperma que viene a ser la cubierta seminal, constituida por una copa de células muy finas, endospermo que viene a ser la segunda capa, embrión formado por los cotiledones que es la más rica en proteínas y una interna llamada perisperma, rica en almidones.

**Tabla 1 Clasificación botánica del amaranto**

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	<i>Embryophyta</i> <i>Siphonogama</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Clase</b>	<i>Dicotyledonae</i>
<b>Subclase</b>	<i>Archiclomidae</i>
<b>Serie</b>	<i>Centrospermae</i>
<b>Familia</b>	<i>Amaranthaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Amaranthus</i>
<b>Especies cultivadas para grano</b>	<i>hypochondriacus</i> , <i>cruentus</i> y <i>caudatus</i>

(Tapia, 1997)

### 1.1.2 Composición química de la semilla de amaranto

En la **Tabla 2** se puede observar la composición química de la semilla de amaranto y su valor nutricional de las cuales podemos destacar que posee entre 12 al 19 g de proteína valor superior a todos los cereales en listados en la tabla; también se destaca por su contenido de calcio que va entre 130 a 164 mg que mayor que los valores reportados para el trigo y el arroz (National Research Council, 1984).

**Tabla 2 Valor nutritivo de la semilla cruda de amaranto comparado con cereales comunes (gr /100 gr)**

	<b>Amaranto</b>	<b>Arroz</b>	<b>Trigo</b>	<b>Maíz amarillo</b>	<b>Avena</b>	<b>Quínoa</b>
<b>Fibra dietética (g)</b>	14.5	6.5	10.7	9.4	16.9	5.2
<b>Proteína (g)</b>	12.9	2.8	12.7	7.3	10.6	11.7
<b>Lípidos (g)</b>	6.5	0.5	2	4.7	6.9	6.3
<b>Carbohidrato (g)</b>	66.2	79.2	75.4	74.3	66.3	68
<b>Calcio (mg)</b>	153	3	34	7	54	148.7
<b>Hierro (mg)</b>	7.6	4.23	5.4	2.7	4.7	13.2
<b>Calorías (kcal)</b>	374	358	340	365	389	399

(National Research Council, 1984)

En la semilla de amaranto el carbohidrato principal es almidón y se han encontrado pequeñas cantidades de sacarosa y rafinosa (Becker *et al.*, 1981).

Se ha señalado que la mayor parte de los lípidos en amaranto se encuentran en la fracción testa-embrión (25% del peso de la semilla) (Betschart *et al.*, 1979b; Becker *et al.*, 1981). La fracción lipídica de los granos de amaranto es similar a otros cereales, consiste principalmente en ácidos grasos insaturados, como ácido linoleico siendo este el ácido graso predominante.



El aceite que se obtiene del grano de amaranto contiene una cantidad significativa (8%) de escualeno y tiene el potencial de reemplazar otras fuentes de escualeno como el aceite de hígado de ballena. La importancia de este aceite es porque actúa como anticancerígeno y se ha atribuido a su capacidad para reducir los niveles de colesterol inhibiendo su síntesis en el hígado (Kaur *et al.*, 2010).

En minerales y vitaminas el amaranto tiene mayor contenido de sodio que otros cereales, mientras que el contenido de potasio está en niveles competitivos. El alto nivel de calcio (6.5 mg/100g) en el amaranto sugiere que el ácido fítico puede estar como una sal de calcio insoluble en la semilla (Becker *et al.*, 1981). Estudios analíticos de la semilla muestran que la riboflavina y ácido ascórbico se encuentran en cantidades mayores a las reportadas para trigo, la riboflavina, niacina, vitamina C y tiamina se distribuyen principalmente en la testa de la semilla. El caroteno está ausente en el grano de amaranto (Becker *et al.*, 1981; Singhal y Kulkarni, 1988).

### **1.1.3 Calidad biológica de proteínas**

Las semillas amarillas de *A. hypochondriacus* y las semillas de color negro de *A. caudatus* tienen contenidos similares en algunos de los diferentes aminoácidos. En general el amaranto tiene niveles aceptables de aminoácidos azufrados y niveles altos de aminoácidos como metionina y lisina (**Tabla 3**). Este último corresponde a casi el doble de lo que contiene el maíz y trigo algo menos que lo encontrado en frijol (Downton, 1973; Senft, 1979; Vietmeyer, 1982; Duarte-Correa *et al.*, 1986; Pedersen *et al.*, 1987a). Pedersen *et al.*, (1987) reportan que la treonina es el primer aminoácido limitante seguido por leucina, valina y metionina. Sin embargo, parece que las proteínas de amaranto cumplen satisfactoriamente con los requerimientos de aminoácidos esenciales de acuerdo a los estándares para adultos reportados por los organismos FAO/WHO/UNU (1985).

**Tabla 3 Composición de aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína).**

Aminoácido	Amaranto	Maíz	Trigo	Patrón de referencia FAO/OMS/UNU, 1985 Adultos/Niños	
Isoleucina	4	3.5	3.9	1.3	4.6
Leucina	6.2	12.4	7.3	1.9	9.3
Lisina	6.1	3	3	1.6	6.6
Metionina	2.3	2	1.7	1.7* <sup>1</sup>	4.2
Cisteína	3.9	2.3	2.6		
Fenilalanina	4.8	4.4	4.8	1.9* <sup>2</sup>	7.2
Tirosina	4.3	3.3	2.5		
Treonina	4.6	3.3	2.8	0.9	4.3
Valina	4.4	4.9	4.9	1.3	5.5
Triptófano	1.3	0.7	1.2	0.5	1.7

\*<sup>1</sup>= metionina + cisteína; \*<sup>2</sup>=fenilalanina + tirosina. (Paredes *et al.*, 2006; Bourges *et al.*, 2009)

#### 1.1.4 Importancia económica

En México se cultivan 11 especies de amaranto, de las cuales las especies *Amaranthus hypochondriacus L.*, y *Amaranthus cruentus* son originarias del territorio nacional (Velasco & Villela, 2016)

La producción de amaranto en su mayoría se localiza en la meseta central: Puebla con el 33.43%, Morelos 4.60%, Tlaxcala 53.61%, CDMX 2.46 %, Estado de México 4.59%, Oaxaca 1.04% y Guanajuato con 2%. En el reporte de producción anual por cultivos publicado por el servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el 2015 Guanajuato tuvo una producción de 22 toneladas anuales y en producción anual México produjo 8522 toneladas (**Tabla 4**).

**Tabla 4 Principales estados productores de amaranto en México**

<b>Estados</b>	<b>Producción (ton)</b>
Tlaxcala	1118
Puebla	3155
Estado de México	854
CDMX	140
Morelos	24
Guanajuato	22
Total Nacional	5313

(SIAP, 2015)

A nivel mundial, China es el principal productor de amaranto con 150,000 hectáreas sembradas. Le siguen India y Perú con 1,800 has., México con 900 has. y Estados Unidos con 500 has. En cuanto a participación en el mercado de exportaciones, Argentina representa el 49%, Perú el 45.24% y México solamente tiene el 3.02% seguido de Bolivia con 0.36% y Ecuador con 0.25% (Martínez, 2016).

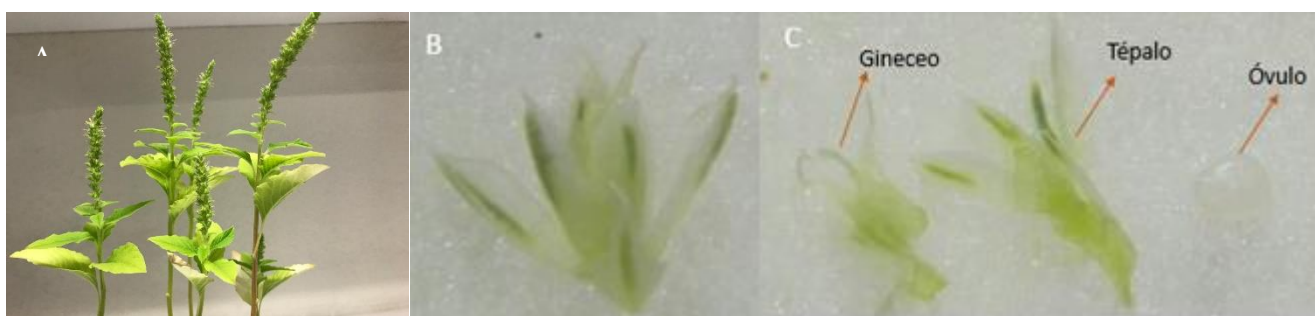
## ***1.2 Amaranthus hypochondriacus***

### **1.2.1 Variedad revancha**

Espitia (1991b) en México, desarrollo la variedad mejorada Revancha que corresponde a *Amaranthus hypochondriacus* y derivada de la raza Mercado cuyas principales características son: alto potencial de producción de grano (4,518 kg ha<sup>-1</sup>), con 131 días de periodo vegetativo, altura de planta adecuada para la mecanización del cultivo (137 cm) y uniformidad de maduración (**Fig. 1A**).

Se caracteriza por su pigmentación en la raíz, en el hipocotilo y en la base del tallo, el resto de la planta es de color verde. La inflorescencia es de color indeterminado con ramificaciones cortas, las flores tienen brácteas cortas, por lo que presentan el tacto espinoso como las variedades criollas. La semilla es de color blanco marfil y ligeramente aplanada (**Fig 1C**). Es

una variedad de ciclo vegetativo intermedio, la madurez fisiológica ocurre en promedio en 180 días, esta variedad es de porte intermedio, su altura varía de 101 a 162 cm, según el manejo agronómico del cultivo. Los beneficios que presenta son un alto rendimiento de grano, uniformidad en la madurez, uniformidad en altura de planta, sustentabilidad de cultivo y aptitud para la cosecha mecánica. La variedad Revancha puede ser utilizada en la elaboración de dulces y cereales, en harinas se puede utilizar en la elaboración de concentrados 34 proteínicos, atole, leche etc. El ámbito de aplicación son los valles altos de los estados de Hidalgo, Estado de México, Puebla y Tlaxcala, comprendidos en la zona templada con altura mayor a los 2240 mm y con precipitaciones de 350 a 800 mm.



**Figura 1** Morfología *A. hypochondriacus* variedad Revancha. A) Inflorescencia; B) Estructura floral; C) conformación de la estructura floral.

### 1.3 Desarrollo del gametofito femenino y embrión en *Amaranthus hypochondriacus*

#### L

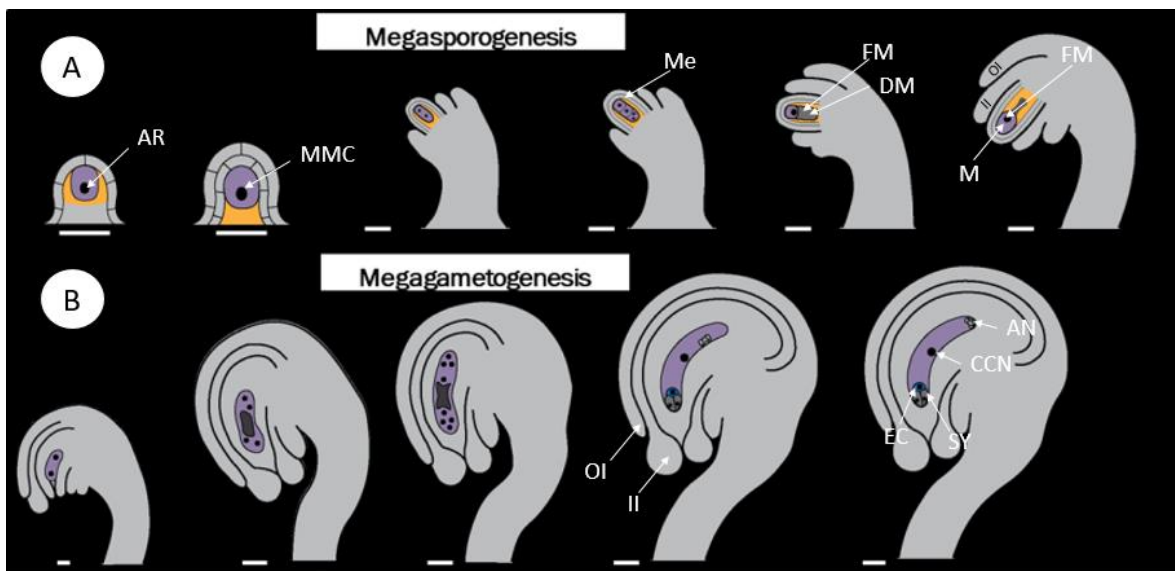
#### 1.3.1 Megasporogénesis y megagametogénesis

La megasporogénesis comienza cuando en la región apical de la nucela una célula subepidérmica se diferencia en la célula arquesporial (AR), que dará lugar a la célula madre de la megaspora (MMC). Después la MMC sufre meiosis, que da lugar a cuatro células megasporas haploides. Al final de la meiosis, las megasporas ubicadas en el extremo calazal mueren, mientras que micropilar se convierte en la megaspora funcional (FM) que a diferencia de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* la megaspora funcional se desarrolla en el extremo calazal. (Fig. 2A) (Barrales-López, 2018).

La megagametogénesis comienza cuando la FM se agranda, iniciando el desarrollo del gametofito femenino. Esta etapa es llamada la fase coenocítica inicial, en la que ocurren tres

rondas de mitosis sin citoquinesis. Esta fase comienza como un gametofito femenino mononuclear que sufre una división nuclear seguida de la aparición de una gran vacuola. Los dos núcleos resultados de esta división migran a los polos opuestos. La segunda ronda de división nuclear ocurre, resulta en dos núcleos en cada polo (Barrales-López, 2018).

Después de una tercera y última división nuclear, un núcleo de cada polo migra a la zona central para formar la célula central binuclear. Durante la formación de células en el extremo chalazal, el primer evento de celularización se observa en dos de los núcleos y en el gametofito femenino maduro, las células de la etapa tres se diferencian como células antípodas (AN). En el polo micropilar se formaron los dos sinérgicos (SY) y el óvulo. Una de las células sinérgicas sufre una muerte celular programada antes que el tubo polínico alcance el micrópilo. En la etapa inicial del desarrollo, los dos núcleos polares se fusionaron, dando lugar a la célula central diploide (CC) y la célula central es la célula más grande del gametofito femenino (Barrales-López, 2018) (**Fig. 2B**).



**Figura 2 Megasporogénesis y megagametogénesis en *Amaranthus hypochondriacus*.** A) Primeras etapas de megasporogénesis que muestra células de arcosporas (AR), células madre de megasporas (MMC), tétrada de megasporas (Me), megaspora funcional (FM) y células de megasporas degeneradas (DM). B) detalle del gametofito femenino maduro con antípodas (AN), células de huevo (EC), células sinérgicas (SY), célula central (CCN), Integumento externo (OI), integumento interno (II) (Barrales-López, 2018).

### 1.3.2 Embriogénesis

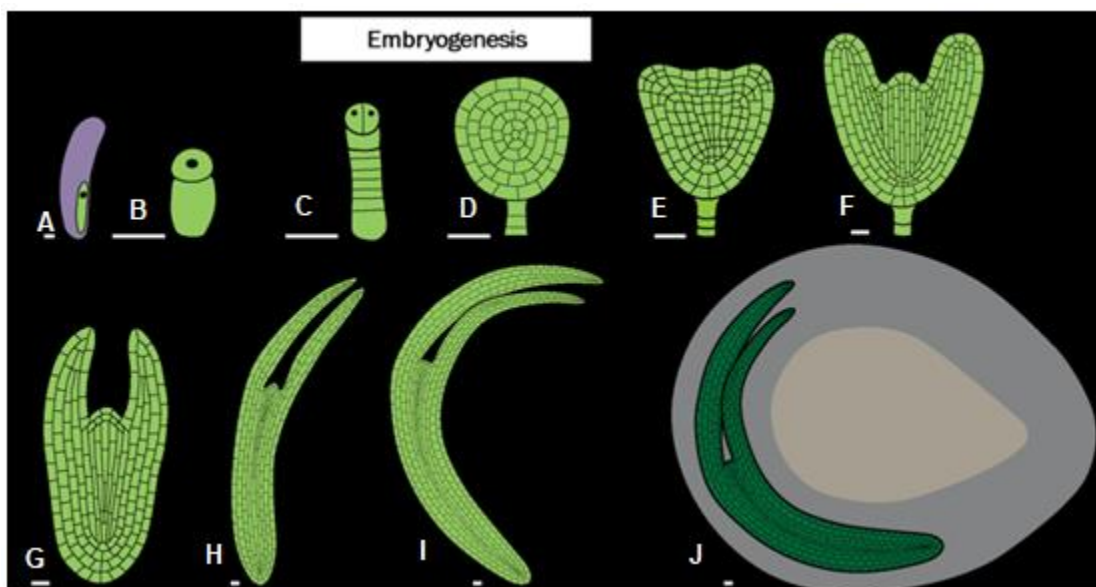
Después de la doble fecundación, la etapa inicial se caracteriza por una rápida división celular y la segregación de los mecanismos de desarrollo en el cigoto formado por el embrión y el suspensor. La célula de huevo fecundada comienza a alargarse y diferenciarse en el cigoto. La primera división del cigoto es transversal y da origen a una célula basal y una célula apical, que se convierten en el suspensor y embrión, respectivamente (Barrales-López, 2018).

El suspensor experimenta divisiones celulares en la etapa de cuatro células antes de que el proembrión lineal sufra su primera división. El endospermo y el perispermo se diferencian en esta etapa formando la estructura que permite el crecimiento del embrión (**Fig. 3**). La primera división embrionaria es longitudinal, mientras que la segunda división embrionaria es transversal; la hipófisis se define cuando el suspensor está en la etapa de las siete células (Barrales-López, 2018).

La división celular y la diferenciación continua en el embrión propio, que se convierte en un embrión globular temprano a tardío. Tras la etapa de cuatro células el embrión sufre otra división para formar la etapa octante, y con esto comenzar la etapa globular temprana. Se observan divisiones de células periclinales en la etapa globular media y se produce la primera división de la hipófisis. Entonces la hipófisis da lugar a dos pequeñas células con forma de lente durante la etapa globular tardía del embrión. Al final de la etapa globular el embrión ha sufrido divisiones celulares periclinal y anticlinal, y continua en transición de la etapa al embrión cardíaco. El endospermo muestra un tipo helobial y la presencia de una estructura que funciona como un andamio para el posicionamiento de los núcleos libres (Drews & Koltunow, 2011; Barrales-López, 2018).

En la etapa globular tardía hay una transición de una forma globular a una polarizada en forma de corazón, que es causado por el crecimiento diferencial del dominio apical para formar los primordios de cotiledón y el meristemo de los brotes. En la etapa del corazón el embrión ya ha diferenciado la mayoría de los tejidos y tipos de células. Durante el torpedo la etapa en que se ha consumido el endospermo. En la etapa temprana del cotiledón el embrión muestra meristemos bien diferenciados de brotes y raíces. En la etapa de maduración el embrión aumenta dramáticamente en tamaño debido a la expansión celular y la acumulación de productos de almacenamiento, principalmente en los cotiledones. El

endospermo está casi consumido; sin embargo, el perispermo se mantiene, quizás manteniendo la nutrición y proporcionando un espacio adecuado para el crecimiento del embrión maduro (Drews & Koltunow, 2011; Barrales-López, 2018).



**Figura 3** Etapas embriogénesis en *Amaranthus hypochondriacus*. Etapas de división celular y diferenciación en el embrión. A) Cigoto, B) Etapa 1 célula, C) Etapa 7 células, D) Etapa globular temprana, E) Transición de etapa globular a corazón, F) Etapa de corazón, G) Etapa de torpedo, H) Cotiledón etapa temprana, I) Etapa de maduración, J) Embrión maduro (Barrales-López, 2018).

## 1.4 Regulación en el desarrollo del gametofito femenino y la semilla

### 1.4.1 Regulación de la megasporogénesis

En *Arabidopsis* y en la mayoría de las otras especies, la célula madre de la megasporas (CMM) se desarrolla a partir de una célula sub-epidérmica dentro de un óvulo primordial joven (**Fig. 2A**). La mayoría de los primordios de óvulos contienen una sola células madre del megaspora. Sin embargo, 5-6% de óvulos en *Arabidopsis* forman células agrandadas adicionales. Estas células agrandadas se parecen a células madre de megasporas, pero sólo una célula sufre los sucesos posteriores de la megasporogénesis. y megagametogénesis (Drews & Koltunow, 2011).

Estudios recientes en *Arabidopsis*, arroz y maíz han identificado un grupo de genes que promueven el desarrollo de células madre megasporas. Algunos de los genes identificados

en *Arabidopsis* incluyen a *NOZZLE / SPOROCTELESS*, *WUSCHEL (WUS)*, *WINDHOSE1 (WH1)*, *WH2* y *TORNADO2 (TRN2)* (Lieber *et al.*, 2011); en arroz *AT LEPTOTENE (MEL1)* (Nonomura *et al.*, 2007) y en de maíz *ARGONAUTE104 (AGO104)* (Singh *et al.*, 2011).

En la selección de la megaspora funcional se identificaron genes involucrado en la restricción del número de células madre de megasporas a solo una por óvulo, en maíz *MAC1* (Sheridan *et al.*, 1999), en arroz *SPOROCTE1 MÚLTIPLE* (Nonomura *et al.*, 2003) y *OsTDL1A* (Zhao *et al.*, 2008).

La formación de megasporas a partir de células somáticas en óvulos pre-meióticos está activamente reprimida por *ARGONAUTE9 (AGO9)*, *ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN 6 (RDR6)* y el *SUPRESOR DE SILENCIACIÓN DE GENES3 (SGS3)* en *Arabidopsis* (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010), y *DOMINIOS METHYLTRANSFERASEFERASE103 (DMT103)* en maíz (García-Aguilar *et al.*, 2010).

En maíz *DMT103* parece desempeñar un papel en la regulación de la formación del gametofito femenino y en la restricción del destino celular en el óvulo para que se forme un solo gametofito. El gen *ANTIKEVORKIAN (AKV)* en *Arabidopsis* está involucrado en la regulación de la supervivencia de las megasporas, ya que el 10% de los óvulos mutantes de *akv* contienen las cuatro megasporas (Yang & Sundaresan, 2000).

#### **1.4.2 Regulación de la megagametogénesis**

*RBR* es un regulador del ciclo celular que inhibe entrada a este mediante la represión de los factores de transcripción E2F, que activan los genes requeridos para la transición G1 / S. *RBR* tiene funciones adicionales durante el desarrollo de gametofito femenino ya que las líneas mutantes no expresan o expresan incorrectamente varios marcadores específicos de estas etapas de desarrollo, lo que sugiere que *RBR* también se requiere para la diferenciación de las células del gametofito femenino. La expresión errónea de los genes se debe en parte a la inhibición de *RBR* (y *MSII*) y la expresión del ADN *METHYLTRANSFERASA1 (MET1)*, *MET1* es responsable del mantenimiento de la metilación del gen inhibitorio y la ausencia de *MET1* (junto con la actividad *DME*) conduce a la eliminación de las marcas de metilación silenciadoras y a la activación de la expresión génica (por ejemplo, *FIS2* y *FWA*) (Johnston & Grussem, 2009).



La proliferación nuclear durante la megagametogénesis también puede ser regulado por *IG1* y *AGL23*. El fenotipo de *ig1* sugiere que *IG1*, como *RBR*, puede funcionar para restringir la extensión de la proliferación nuclear durante la megagametogénesis. La fase de proliferación nuclear de la megagametogénesis es afectada por mutaciones a varias remodelaciones de cromatina o factores modificadores de la histona, incluyendo *CHR11* proteína remodeladora de cromatina, *HAM1* y *HAM2* genes que codifican histonas acetiltransferasas (*HAT*) (Latrasse *et al.*, 2008).

Un grupo de genes necesarios para la especificación o diferenciación celular durante el desarrollo de gametofito femenino han sido identificado estos incluyen *MYB98* para la diferenciación de las células sinérgidas, *AGL80* y *AGL61* para el desarrollo de células centrales en *Arabidopsis* y *DMT102* requerido para el desarrollo antípodas en maíz (García-Aguilar *et al.*, 2010).

### **1.4.3 Regulación en el inicio del desarrollo de la semilla**

Para iniciar el desarrollo de semillas se requieren gametofitos femeninos en estadio maduro y durante la doble fecundación. En *Arabidopsis*, la célula central no fecundada contiene un conjunto de proteínas que suprime el desarrollo del endospermo hasta que se produce la fertilización. Estas proteínas forman parte de un complejo denominado complejo *FIS* (*FERTILIZATION INDEPENDENT SEED*). Además de esta función durante la pre-fecundación, el complejo *FIS* también tiene varias funciones post-fecundación en el endospermo, incluida la impronta génica. El complejo *FIS* regula la trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (*H3K27*), que está asociada compactación de la cromatina y silenciamiento génico. Si la metilación del *H3K27* mediada por *FIS* interviene en el silenciamiento de los genes del endospermo, entonces estas marcas de histonas deben revertirse en la fecundación (Guitton & Berger, 2005).

## **1.5 Metilación del ADN**

La metilación es un proceso de modificación de carácter reversible que experimenta el ADN después de ser sintetizado mediante la conversión enzimática de los desoxirribonucleótidos a metildesoxirribonucleótidos (Razin & Riggs, 1980). Todas las bases nitrogenadas del ADN pueden metilarse en diferentes posiciones, aunque la base que con mayor frecuencia aparece

metilada es la citosina en su posición 5. En los animales la metilación es de aproximadamente 8 %, mientras que en plantas puede llegar normalmente hasta un 30% (Leal *et al.*, 1998).

Los patrones de metilación durante la replicación del ADN se mantienen estables y se ha podido precisar que los sitios metilados están sobre ambas cadenas y que, además, al parecer se heredan de forma clonal. Los patrones de metilación dependen también de la actividad metilante de la célula y se han sugerido dos tipos de actividad metilante: de *novo* y de mantenimiento. La metilación de *novo* añade grupos metilo en posiciones totalmente nuevas, pudiendo cambiar el patrón de metilación en una región localizada dentro del genoma. La actividad de la metilasa de mantenimiento actúa inmediatamente después de la síntesis del ADN y adiciona grupos metilos a sitios hemimetilados (metilados en una sola cadena), es decir, a la nueva cadena recién sintetizada.

La reacción de metilación del ADN es catalizada por las ADN metiltransferasas e involucra la transferencia del grupo metilo de la S adenosil- L-metionina al carbono 5 de la citosina y la especificidad de estas enzimas afecta a la metilación en contextos de secuencia particulares, la mayor parte de la metilación en los dinucleótidos CG es catalizada por el ADN METHYLTRANSFERASE1 (MET1) (Kankel *et al.*, 2003). La metilación en el contexto CHG está mediada por CHROMOMETHYLASE3 (CMT3) (Lindroth *et al.*, 2001). Este es simétrico y puede potencialmente regenerarse mediante un mecanismo semiconservador. La metilación en el contexto CHH no simétrico se debe en gran medida a las actividades de DRM1 y DRM2 con alguna contribución de CMT3 (Bartee *et al.*, 2001; Cao & Jacobsen, 2002).

La metilación del ADN constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación del ADN y el origen parental de regiones impresas, regula a los transposones, la impronta genómica y la expresión génica (Bird & Wolffe, 1999; Costello & Plass, 2001; Paulsen & Ferguson-Smith, 2001; Bird, 2002). Generalmente la metilación en elementos reguladores de los genes tales como promotores, potenciadores, aislantes y represores suprime su función (Wolffe & Matzke, 1999; Bird & Wolffe, 1999; Nakao, 2001). La metilación en regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, parece ser crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas (Nakao, 2001;

Bird,2002). También se ha sugerido que la metilación constituye un mecanismo de defensa del genoma contra elementos genéticos móviles (O'Neill *et al.*, 1998; Bird, 2002).

El nivel de metilación se controla dinámicamente por establecimiento, mantenimiento y eliminación de citosina metilación (desmetilación del ADN), la relación entre estos dos procesos opuestos es la que promueve las bases para la formación de los patrones de metilación correctos para cada tejido (Han *et al.*,2019).

### **1.6 Desmetilación del ADN**

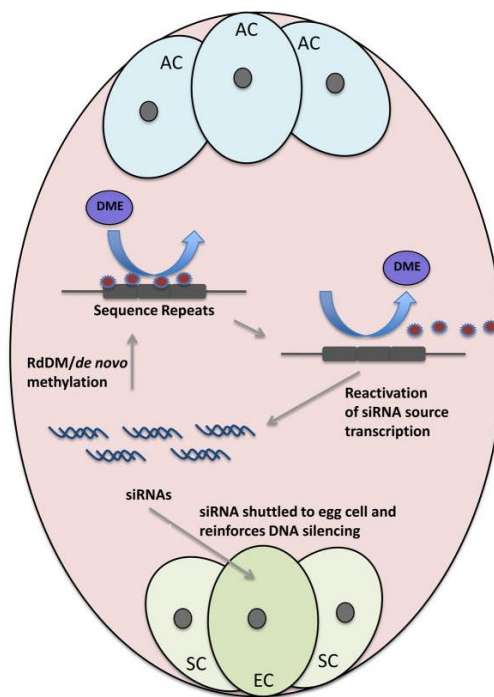
La desmetilación del ADN ocurre por un proceso pasivo o activo. La desmetilación pasiva se refiere a la pérdida de metilación del ADN durante la replicación de este debido a la reducción o inactivación de enzimas que contribuyen al ADN metilación (Zhu,2009).

En Arabidopsis, la reducción en la expresión de los componentes de la vía de metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM) durante la gametogénesis masculina da como resultado la desmetilación pasiva del ADN en la célula vegetativa (Slotkin *et al.*, 2009). Del mismo modo, la desmetilación pasiva del ADN también puede ocurrir en la célula central durante el desarrollo del gametofito femenino y el mantenimiento de la represión transcripcional mediante el ADN metiltransferasa MET1 se encontró que está asociado con la desmetilación del ADN de todo el genoma en la célula central (Jullien *et al.*, 2008).

La desmetilación activa del ADN implica la participación de enzimas que se encargan de remover la citosina metilada. En las plantas, este proceso es iniciado por una familia de ADN glucosilasas, incluida Demeter (DME), represor de silenciamiento 1 (ROS1), Demeter-like 2 (DML2) y Demeter-like 3 (DML3) y el mecanismo de reparación por escisión de base (BER) completa el proceso (Penterman *et al.*, 2007; Zhu 2009). La desmetilación de ADN activa no solo es crucial para la reprogramación de todo el genoma, sino también para la activación de genes específicos durante el desarrollo de la planta (Hsieh *et al.*, 2009).

Un ejemplo de la participación de la desmetilación en el desarrollo de la planta es la célula central; la célula central es crítica para el desarrollo de la semilla después de la fecundación porque las semillas con un alelo mutante *dme* materno abortan el desarrollo y son inviables. La expresión de *DME* no se detecta en el polen, y la herencia de un alelo *dme* mutante paterno no afecta el desarrollo de la semilla. Debido a que el *DME* se expresa en la célula central, y

no en el polen, el endospermo hereda los genomas con diferentes estados epigenéticos, lo cual es crítico para el establecimiento de los patrones de metilación (**Fig. 4**) (Baue & Fischer, 2011).

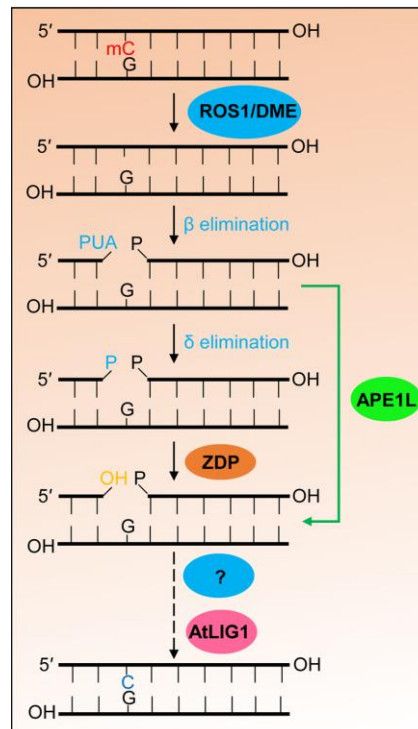


**Figura 4 Modelo de desmetilación en el gametofito femenino.** DME elimina la metilación del ADN en la célula central, lo que hace que los genes metilados comiencen a expresarse. Muchos sitios desmetilados también son secuencias repetitivas y elementos transponibles. La desmetilación de los loci fuente de ARNip, incluido el ADN repetitivo y los elementos transponibles, se expresaría. La ruta RdDM procesa estos ARN para ARNsi y guiaría la metilación de novo. Los ARNip también podrían trasladarse al embrión, donde la vía RdDM puede reforzar el silenciamiento del elemento transponible y otras secuencias de ADN repetitivas. AC, células antipodales; CE, óvulo; SC, células sinérgicas (Baue & Fischer, 2011).

DME, ROS1, DML2 y DML3 son ADN glucosilasas bifuncionales, capaces de hidrolizar el enlace N-glicosídico entre la base y su residuo de desoxirribosa e escindir el esqueleto de ADN en el sitio abásico. Esto elimina citosina metilada independientemente de su contexto de secuencia y generar una brecha de un solo nucleósido (McCullough *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002).

La reacción de eliminación  $\beta$  crea una brecha con aldehído 3'-fosfo- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado (3'-PUA), mientras que la reacción de eliminación de  $\delta$  crea una brecha con un 3'-fosfato terminal (**Fig.**

5) (Agius *et al.*, 2006; Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014). Tanto el 3'-fosfato como el 3'-PUA deben convertirse a 3'-hidroxilo (3'-OH) para que el ADN polimerasa y ligasa puedan llenar el vacío. Un ADN de dedo de zinc 3'-fosfoesterasa (ZDP) convierte el grupo 3'-fosfato a un grupo 3'-OH (Jilani *et al.*, 1999; Martinez-Macías *et al.*, 2012). Proteínas apurínicos / apirimidínicos (AP) similares a la endonucleasa APE1L, APE2 y Proteína redox endonucleasa apurínica en Arabidopsis, APE1L puede procesar potentemente 3'-PUA para generar 3'-OH (Lee *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015a). Si bien la ADN polimerasa responsable de la desmetilación activa del ADN sigue siendo desconocida, la ADN ligasa, que crea un enlace fosfodiéster y une los dos extremos de las cadenas de ADN después de llenar el vacío con un nucleótido de citosina no metilado, se identificó como AtLIG1 (Andreuzza *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015b).



**Figura 5 Desmetilación de ADN activa es afectada por el mecanismo de reparación por base (BER)** ROS1 o DME eliminan la 5-metilcitosina (mC) y cortan el esqueleto del ADN en el sitio abásico a través de las reacciones de eliminación  $\beta$ ,  $\delta$ , generando una brecha con terminal 3'-PUA o 3'-fosfato. 3'-PUA y 3'-fosfato son convertido a 3'-OH por APE1L y ZDP, respectivamente. La brecha es luego se llena con una citosina habitual (no metilada) por las acciones de un ADN polimerasa desconocida y AtLIG1. (Li *et al.*, 2018).

### 1.7 ROS1

*Represor del silenciamiento 1 (ROS1)* es una glicosilasa específica de citosina metilada, eliminando la 5-meC del DNA como base libre mediante un mecanismo glicosilasa/liasa

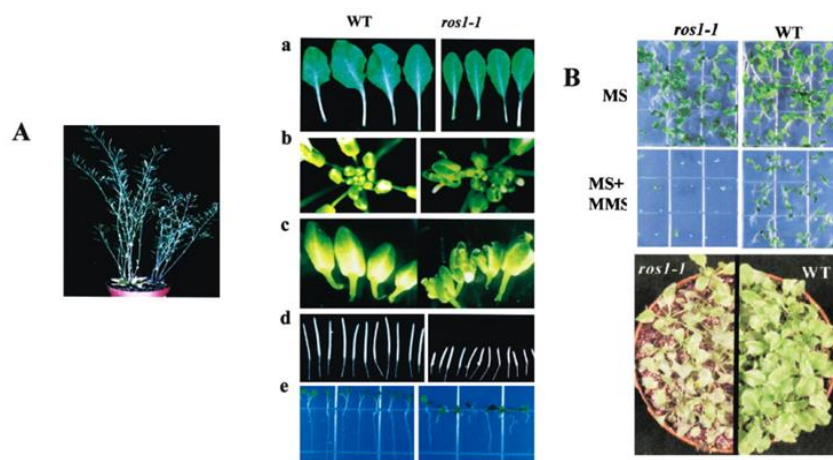
(Morales-Ruiz *et al.*, 2006). *ROS1* codifica una proteína nuclear de 1393 aminoácidos con un dominio HhH-GPD encontrado en las ADN glicosilasas; los miembros de la familia *ROS1/DME* codifican proteínas voluminosas y con una similitud de secuencia significativa a proteínas de reparación por escisión de bases pertenecientes a la familia hélice-horquilla-hélice y un enlace rico en Gly / Pro seguido un aspartato conservado (HhHGPD) (Gong, *et al.*, 2002; Choi, *et al.*, 2002; Morales-Ruiz, *et al.*, 2006). Hay al menos dos mecanismos posibles para explicar la función desmetilación de *ROS1*. Una es que *ROS1* puede evitar que los siRNAs del promotor causen la metilación del ADN. Otra posibilidad es que *ROS1* pueda inhibir la hipermetilación de secuencias de ADN específicas dirigidas por siARN a través de la participación en la desmetilación del ADN.

Las ADN glicosilasas son típicamente enzimas monoméricas de bajo peso molecular (200-300 aa) responsables de reconocer las lesiones de base en el genoma e iniciar la vía de reparación por escisión de base de ADN (BER). Estas enzimas en la mayoría de los organismos eliminan la modificación de la base común (oxidación, desaminación, alquilación) así como las bases normales en un contexto de mal ajuste, causadas por agentes endógenos o ambientales (Lindahl & Wood, 1999; Wiederhold *et al.*, 2004).

Al contrario que *DME*, que solo se expresa en el gametofito femenino, *ROS1* se expresa en una amplia variedad de tejidos. Las mutantes de *ros1* (**Fig 6A**) muestran anomalías en su desarrollo vegetativo, con un crecimiento más lento y de menor altura, las hojas son más estrechas que las de las plantas de tipo silvestre (**Fig. 6Aa**), las estructuras florales en plantas *ros1* no se desarrollan sépalos en comparación con las flores de plantas silvestres (izquierda) (**Fig. 6Ab y Ac**). (**Fig. 6Ad**) Las silicuas de las plantas *ros1* (derecha) son más cortas y contienen menos semillas que los de plantas de tipo silvestre (izquierda). (**Fig. 6Ae**) Las raíces de menor tamaño en *ros1* (derecha). Lo anterior demuestra que *ROS1* está involucrado en la reparación del ADN ya que *ros1* es más sensible a un agente de ruptura de doble cadena de ADN metil metanosulfonato (MMS) y peróxido de hidrogeno (**Fig. 6B**) (Gong *et al.*, 2002).

A diferencia de los mutantes *dme* y *ros1*, que presentan un fenotipo pleiotrópico con alteraciones severas en el desarrollo (Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002), los mutantes *dml2*

y *dml3* no muestran ninguna alteración fenotípica obvia bajo condiciones de crecimiento normales (Ortega-Galisteo *et al.*, 2008).



**Figura 6 Fenotipo mutante de ROS1.** A) Estructuras vegetativas y florales de *ros1*, B) Análisis de sensibilidad a agentes mutagénicos en *ros1*(Gong *et al.*, 2002).

### 1.7.1 Regulación de ROS1

El nivel de transcripción de *ROS1* está estrictamente controlado por el nivel de metilación de una secuencia blanco de RdDM (Metilación de ADN dependiente de ARN) secuencia de monitoreo de metilación del ADN; (MEMS) que se encuentra entre 5' UTR de *ROS1* y la región promotora TE (de - 40 a - 2 pb río arriba de sitio de inicio de la transcripción *ROS1*) (Fig.7). Cuando las actividades celulares de RdDM son altas o los niveles de desmetilación del ADN son bajas, el nivel de metilación de MEMS aumenta y promueve la expresión de *ROS1* y activa la desmetilación de ADN. La metilación del ADN en la región MEMS promueve la expresión de *ROS1* probablemente atrayendo a activadores transcripcionales (Lei *et al.*,2015).

Se demostró que la actividad enzimática ROS1 está regulada por el complejo de Ensamblaje hierro-azufre (CIA), potenciador 7 (AE7) y metionina que requieren MET18 para interactuar directamente con ROS1 en el citoplasma (Fig. 7) (Luo *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

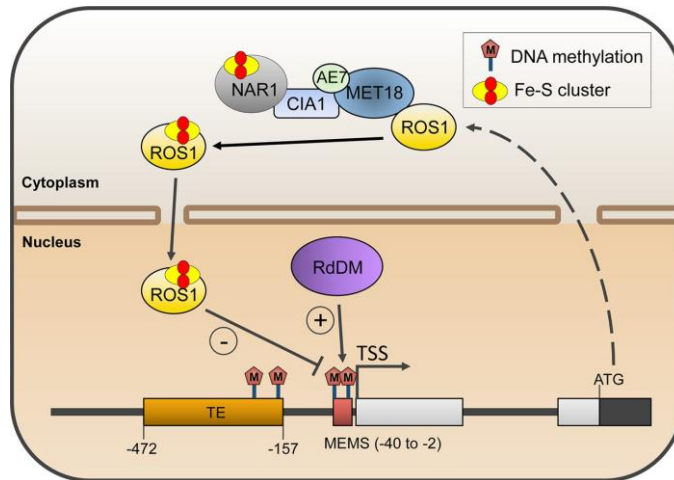


Figura 7 Regulación de *ROS1* por vía de ensamblaje (CIA) y Metilación del ADN (Li *et al.*, 2018).

### 1.8 Proteínas similares a las proteínas de unión a promotores de *SQUAMOSA* (*SPL*)

Las SPL constituyen una familia diversa de factores de transcripción que juegan funciones fundamentales en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y son definidos por una región altamente conservada de 76 aminoácidos llamada el dominio SBP (Klein *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2007). El dominio SBP está involucrado tanto en la importación nuclear como en la unión a una secuencia específica de ADN mediante un consenso con motivos GTAC y regiones flanqueantes específicas de algunos genes (Birkenbihl *et al.*, 2005; Yamasaki *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008). Los genes de la familia SPL se encuentran en todas las plantas verdes, incluidas las algas verdes unicelulares, musgos, gimnospermas y angiospermas (Cardon *et al.*, 1997; Arazi *et al.*, 2005; Riese *et al.*, 2008), y fueron identificados por primera vez en *Antirrhinum* basado en la habilidad de *AmSBP1* y *AmSBP2* estrechamente relacionados para unirse al promotor del gen de identidad del meristemo floral *SQUAMOSA* (*SQUA*) (Klein *et al.*, 1996).

En *Arabidopsis thaliana* se han reportado 17 genes pertenecientes a la familia SPL que de manera general se clasifican por dos clases principales. La clase I contiene cinco (*SPL1*, 7, 12, 14 y 16) proteínas grandes de más de 800 aminoácidos; los 12 restantes constituyen la clase II y son más pequeños que 400 residuos (Cardon *et al.*, 1999; Birkenbihl *et al.*, 2005). Excepto *SPL8*, que afecta el desarrollo del tubo polínico (Unte *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2008), todos los genes de la clase II SPL son objetivos de miR156 y cumplen una función en la vía de

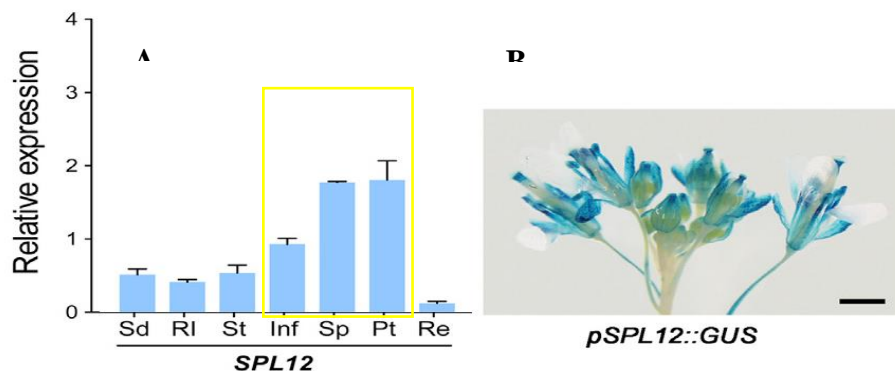


envejecimiento endógeno que regula diversos aspectos relacionados con las transiciones de fase de la planta (Chao *et al.*, 2017).

Los SPL de clase II también están implicados en vías relacionadas con el estrés, como se han demostrado *SPL2* y *SPL11* se regulan negativamente después de un choque térmico (Stief *et al.*, 2014). En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, *CRR1*, un homólogo de *Arabidopsis* clase I SPLs, es un regulador clave de señalización nutricional de cobre y activa genes a nivel transcripcional durante la deficiencia de cobre (Kropat *et al.*, 2005; Sommer *et al.*, 2010). Curiosamente, de la clase I miembros en *A. thaliana*, *SPL7* también es un regulador del homeostasis de cobre y regula la respuesta coordinada de luz y cobre (Zhao *et al.*, 2015). *SPL14* juega un papel en la sensibilidad de la planta a la toxina fúngica *Fumonisin B1* y el desarrollo de la arquitectura de la planta (Jorgensen y Preston, 2014) y *SPL16* (At1g76580) es un duplicado no funcional de *SPL14*, cuyo dominio SBP es probablemente perdido debido a una mutación de cambio de marco (Guo *et al.*, 2008). Así hasta ahora, la función de *SPL1* y *SPL12* en plantas terrestres permanece desconocido.

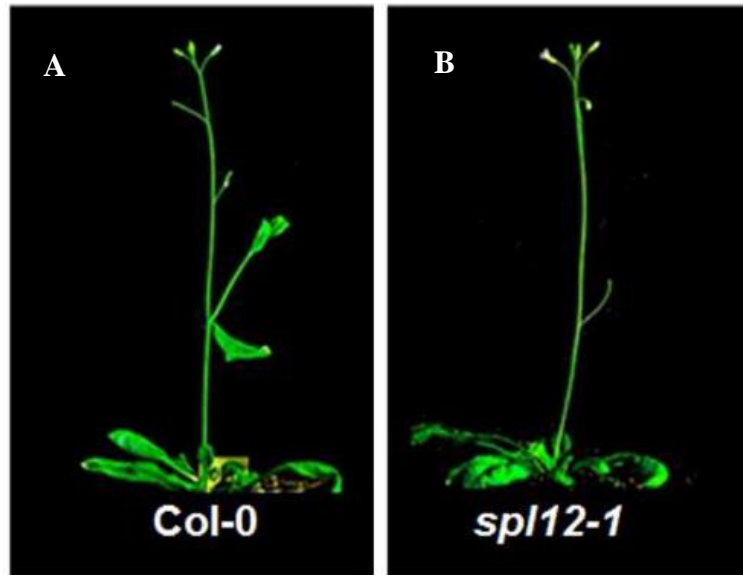
### 1.9 *SPL12*

*SPL12* se expresa ampliamente en casi todos los tejidos, con niveles de expresión más altos en inflorescencia que en tejidos vegetativo. En la **figura 8a** se muestra la expresión relativa de *SPL12* y en la **figura 8b** la tinción con b-glucuronidasa (GUS) de *pSPL12::GUS* (Chao *et al.*, 2017).



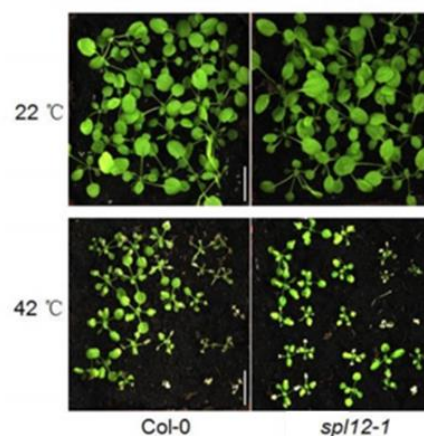
**Figura 8** Análisis de expresión de *SPL12*. A) Expresión relativa de *SPL12* en diferentes órganos. Sd, plántula; RI, hojas de roseta; St, tallo; En caso de inflorescencia; Sp, sépalo; Pt, pétalo; Re, órganos reproductivos (estambre y pistilo), B) Tinción GUS de *pSPL12::GUS* en la inflorescencia de *Arabidopsis*.(Chao *et al.*, 2017).

En el fenotipo de la línea mutante de *SPL12* no se tienen diferencias notables al compararla con el tipo silvestre, lo que se puede observar que en ausencia de *SPL12* promueve la transición reproductiva ya que se desarrollaron órganos florales como sépalos y pétalos, así como la ausencia de hojas caulinares (**Figura 9**) (Chao *et al.*, 2017).



**Figura 9 Fenotipo mutante de *spl12*.** A) Línea WT, B) Línea mutante *spl12*. (Chao *et al.*, 2017).

En estudios recientes se ha demostrado que *SPL12* confiere termotolerancia en *Arabidopsis* en la etapa reproductiva y su sobreexpresión mejora la termotolerancia a la inflorescencia y la producción de semillas (**Figura 10**) (Chao *et al.*, 2017).



**Figura 10 Crecimiento vegetativo en plantas *spl12-1* después tratamiento térmico.** Plantas de tipo silvestre (Col-0) y *spl12-1* en etapa vegetativa, que muestran una sensibilidad similar al estrés por calor. Las plantas de 14 días de edad (arriba) se sometieron a un tratamiento de 42 ° C durante 12 h y los fenotipos se fotografiaron después de la recuperación a 22 ° C durante 5 días (abajo) (Chao *et al.*, 2017).

## **JUSTIFICACIÓN**

Actualmente se sabe que la semilla de *A. hypochondriacus* cuenta un alto contenido proteico que va de 12 al 19% y es rico en aminoácidos azufrados y lisina, este último es un aminoácido esencial que está en baja proporción en otros cereales por lo que el amaranto se considera un grano con un alto valor nutritivo.

A pesar de esto, no existe un estudio detallado que describa los mecanismos genéticos y moleculares que regulan el desarrollo y tamaño de este grano, es por esto que este trabajo se enfoca en el estudio de genes involucrados en el crecimiento de la semilla en *A. hypochondriacus*.

## **HIPOTESIS**

*AmROS1* y *AmSPL12* determinan el desarrollo y tamaño de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus*, mediante la regulación de genes involucrados en el desarrollo del gametofito femenino.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la función de *AmROSI* y *AmSPL12* durante el desarrollo reproductivo en *Amaranthus hypochondriacus*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de *AmROSI* y *AmSPL12* con las reportadas en otras especies.
- Analizar el patrón de expresión de *AmROSI* y *AmSPL12* durante el desarrollo floral de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Diseñar y clonar una sonda específica para realizar análisis de expresión mediante *hibridación in situ* para los genes *AmROSI* y *AmSPL12* durante el desarrollo del óvulo en Amaranto.
- Diseñar una estrategia para la generación de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de los genes *AmROSI* y *AmSPL12*.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Materiales

- Semillas *Amaranthus hypochondriacus* variedad revancha.
- Línea silvestre (*Col-0*) *Arabidopsis thaliana*.
- Vector pGEM –T Easy.
- Vector pBin35s-NOS.
- Células de *Escherichia coli* químicamente competentes.
- Células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa 4404.
- Oligonucleótidos.

### 2.2 METODOLOGÍA

#### 2.2 Realizar un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de *AmROSI* y *AmSPL12* con las reportadas en otras especies.

##### 2.2.1 Análisis *in silico* de *AmROSI* y *AmSPL12*

En Phytozome, el portal Plant Comparative Genomics del Joint Genome Institute y) y The Arabidopsis Information Resource (TAIR) se obtuvieron la secuencia de los genes *AmROSI* en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum*, utilizando el programa Clustal Omega se llevó a cabo el alineamiento de secuencias, con el programa BoxShade obtuvieron regiones conservadas y con el programa SMART se localizaron dominios.

#### 2.3 Analizar el patrón de expresión del gen *AmROSI* y *AmSPL12* durante el desarrollo floral de *Amaranthus hypochondriacus*

##### 2.3.1 Diseño de oligonucleótidos para *AmROSI* y *AmSPL12*

Una vez que se obtuvieron las secuencia, con ayuda del programa Benchling se realizó el diseño de los oligonucleótidos y se comprobó con el programa Amplifix que los oligonucleótidos no formaran estructuras secundarias o fueran complementarios entre sí.

### 2.3.2 Extracción de ARN: Método del TRIZOL® Reagent

Se llevó a cabo la extracción de ARN total de los tejidos colectados los cuales fueron tallo, hoja, tépalo, gineceo, óvulo antes y después de fecundación, lo cuales fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido. Para la extracción, se utilizó el método del TRIZOL ® (Apéndice A.1). El ARN obtenido se re suspendió en 15µL de agua destilada estéril libre de ARNasas.

### 2.3.3 RT-PCR

Se agregó los siguientes reactivos en un tubo estéril tratados con DEPC y en hielo en el siguiente orden

Agua DEPC	1 µL
Oligo dt	1 µL
ARN	0.5 1 µL - 2 µL

Incubar en 65°C por 5 minutos.

Se adicionaron los siguientes reactivos en el orden indicado

5x reaction buffer	4 µL
Ribolock	1 µL
dntp's	2 µL
Reverse transcriptasa	2 µL

Se incubaron por 60 minutos a 42°C

Se finalizó la reacción por un calentamiento a 70°C por 5 minutos.

Se almacenó a -20°C.

### 2.3.4 Real-Time PCR

A partir del RT-PCR se estandarizaron las condiciones a las cuales se llevó a cabo el tiempo real, ya establecidas estas condiciones se utilizó el protocolo para Real-Time PCR:

1. Se hizo la distribución de las muestras y los genes en los pocillos de la placa que se introdujeron en el termociclador.

2. Se preparó una mezcla (1:1) de cebadores para cada gen

X  $\mu$ L iniciador sentido (10  $\mu$ M)

X  $\mu$ L iniciador antisentido (10  $\mu$ M)

-----

Total Y  $\mu$ L (5  $\mu$ M)

3. Se preparó una mezcla de reacción para cada gen

5,0  $\mu$ L Master mix

1,0  $\mu$ L Mezcla de cebadores

3,0  $\mu$ L H<sub>2</sub>O

-----

Total 9,0  $\mu$ L

4. Se adicionó el ADNc (1,0  $\mu$ L, sin diluir) a cada pocillo.
5. Se agregó la mezcla de reacción a cada pocillo, respectivamente (9,0  $\mu$ L)
6. Se selló la placa, evitar la formación de burbujas.
7. Se introdujo la placa en el termociclador, como se indica en el equipo.
8. Se aplicó el gradiente de temperatura 95 °C, 15 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min (40 ciclos). Seguidos de 70 °C para determinación de productos inespecíficos.
9. Se analizaron los resultados.

Se utilizaron dos replicas biológicas para cada uno de los tejidos y los datos fueron analizados por el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

## **2.4 Diseñar y clonar una sonda específica para realizar análisis de expresión mediante hibridación *in situ* para los genes *AmROS1* y *AmSPL12* durante el desarrollo del óvulo en Amaranto**

### **2.4.1 Amplificación por PCR de la sonda para *AmROS1***

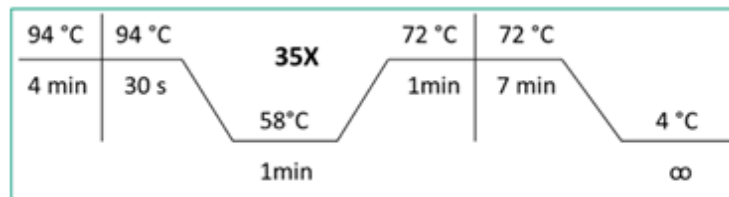
1. Se tomó 1  $\mu$ L de ADNc y se realizó la mezcla para la reacción de PCR en tubos estériles, como se muestra en la **Tabla 5**.



**Tabla 5 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación sonda *AmROSI***

<b>Mezcla Global</b>	<b>vol/Rx (µl)</b>
Agua	17.9
10x Buffer	2.5
50mM MgSO <sub>4</sub>	1
Iniciador Sentido (SHI <i>AmROSI</i> )	1.0
Iniciador Antisentido (SHI <i>AmROSI</i> )	1.0
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5
ADN	1.0
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1
<b>Volumen Total</b>	<b>25.0</b>

2. Se mezcló por re suspensión suave y se colocó en el termociclador.
3. Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 11.



**Figura 11 Condiciones establecidas para oligonucleótidos sonda *AmROSI***

4. Se analizaron 3 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2 %
5. Se almacenaron los productos de reacción a -20 °C.

#### **2.4.2 Ligación al vector pGEM®-T Easy**

El producto obtenido por PCR fue ligado al vector pGEM®-T Easy Promega de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante.

- 1 Se realizó la reacción de ligación añadiendo a un tubo estéril los siguientes reactivos en el orden en que se muestra en la **Tabla 6**

**Tabla 6 Mezcla de reacción de ligación al vector pGEM - T Easy.**

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/rx (<math>\mu</math>L)</b>
Regulador T4 ADN ligasa	5 $\mu$ l
Producto de Elución	1 $\mu$ l
T4 ADN Ligasa	1 $\mu$ l
Agua Estéril	2 $\mu$ l
Vector pGEM <sup>®</sup> -T Easy	1 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

- 2 Se mezcló por pipeteo suave.
- 3 Se incubó la reacción a 4 °C durante 18 h.

#### **2.4.3. Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ )**

Se llevó a cabo el protocolo para transformación de las células de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) **Apendice A.3** se obtuvieron colonias que eran posibles transformantes las cuales se pusieron a crecer en caldo LB con Ampicilina y se dejó incubando a 37°C a 250 rpm durante 16 h.

#### **2.4.4 Extracción de ADN plasmídico**

Una vez que se cumplió el periodo de 16 h, en los tubos donde se observe turbidez se llevará a cabo la extracción de ADN plasmídico (**Apendice A.4**), esta muestra se almaceno a -20°C hasta el momento de la comprobación mediante la enzima de restricción.

#### 2.4.5 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco RI*

A manera de comprobación, se liberó el fragmento de 180 pb del vector mediante digestión con la enzima *Eco RI* ya que pGEM<sup>®</sup>-T Easy cuenta con sitios de reconocimiento.

- 1 Se preparó la siguiente mezcla de reacción como se indica en la **Tabla 7** para cada muestra

**Tabla 7 Mezcla de reacción de digestión con *Eco RI*.**

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Rx (μL)</b>
Agua estéril	12
Regulador 10X	1.5
<i>Eco RI</i>	0.5
ADN	1
<b>Volumen Total</b>	<b>15</b>

- 2 Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 hora y se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %.

#### 2.4.6 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Sty I*

Se realizó una segunda digestión con la enzima *Sty I* para liberar para comprobar el sentido en el cual se había clonado nuestra sonda.

1. Se preparará la mezcla de reacción como se indica en la **Tabla 8** por cada muestra:

**Tabla 8 Mezcla de reacción de digestión *Sty I* para liberar el fragmento de la sonda *AmROSI*.**

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Rx (<math>\mu</math>l)</b>
Agua Estéril	11
Buffer Tango 10x	1.5
<i>Sty I</i>	0.5
ADN	2 $\mu$ l (2 $\mu$ g/ $\mu$ L)
<b>Volumen Total</b>	<b>15</b>

2. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h y se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®

El tejido que será utilizado para las hibridaciones fue colectado cada semana después de la formación de la inflorescencia (4-5 semanas después de la germinación) hasta 2 semanas después de la antesis. La fijación de tejido y la técnica de Hibridación *in situ* se llevará a cabo como lo menciona el **Apéndice A.2**

#### **2.4.7 Diseño de oligonucleótidos sonda *AmSPL12***

Se obtuvo la secuencia de *AmSPL12* en la base de datos Phytozome, con ayuda del programa Benchling se realizó el diseño de los oligonucleótidos y se comprobó con el programa Amplifix que los oligonucleótidos no formaran estructuras secundarias o fueran complementarios entre sí.

### **2.5 Diseñar una estrategia para la generación de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de los genes *AmROSI* y *AmSPL12***

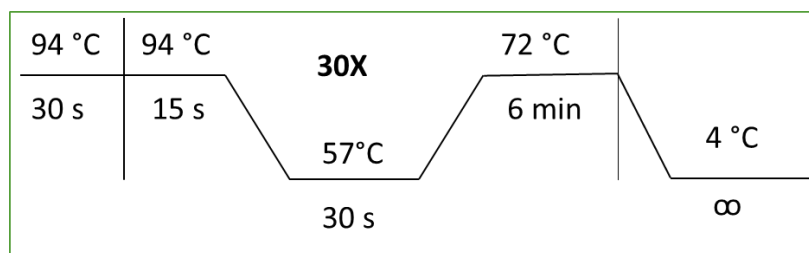
#### **2.5.1 Amplificación por PCR del gen *AmROSI***

1. Se tomó 1  $\mu$ L de ADNc y se realizó la mezcla para la reacción de PCR en tubos estériles, como se muestra en la **Tabla 9**.

**Tabla 9 Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento *AmROSI***

<b>Mezcla Global</b>	<b>vol/Rx (μl)</b>
Agua	17.9
10x Buffer	2.5
50mM MgSO <sub>4</sub>	1
Iniciador Sentido ( <i>AmROSI</i> )	1.0
Iniciador Antisentido ( <i>AmROSI</i> )	1.0
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5
ADN	1.0
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1
<b>Volumen Total</b>	<b>25.0</b>

2. Se mezcló por re suspensión suave y se colocó en el termociclador.
- 3 Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 12.



**Figura 12 Condiciones establecidas para oligonucleótidos sobreexpresión *AmROSI***

- 4 Se analizarón 3 μL del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2 %
- 5 Se almacenaron los productos de reacción a -20 °C.

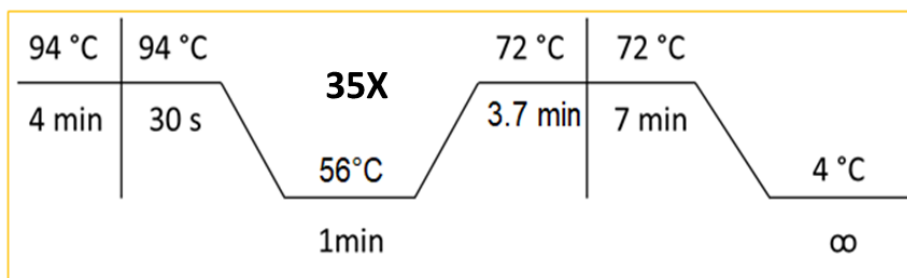
## 2.5.2 Amplificación por PCR del gen *AmSPL12*

1. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  de ADNc y se realizó la mezcla para la reacción de PCR en tubos estériles, como se muestra en la **Tabla 10**.

**Tabla 10** Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento *AmSPL12*

Mezcla Global	vol/Rx ( $\mu\text{l}$ )
Agua	17.4
10x Buffer	2.5
50mM $\text{MgSO}_4$	1.5
Iniciador Sentido ( <i>AmSPL12</i> )	1.0
Iniciador Antisentido ( <i>AmSPL12</i> )	1.0
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5
ADN	1.0
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1
<b>Volumen Total</b>	<b>25.0</b>

2. Se mezcló por resuspensión suave y se colocó en el termociclador.
3. Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 13.



**Figura 13** Condiciones establecidas para oligonucleótidos sobreexpresión *AmSPL12*

4. Se analizaron 3  $\mu\text{L}$  del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2 %
5. Se almacenaron los productos de reacción a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5.3 Ligación al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy**

El producto de elución del fragmento correspondiente al gen *AmROSI* y *AmSPL12* obtenidos por amplificación por PCR fueron ligados al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy Promega de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante.

- 1 Se realizó la reacción de ligación añadiendo a un tubo estéril los siguientes reactivos en el orden en que se muestra en la **Tabla 8**
- 2 Se mezcló por pipeteo suave.
- 3 Se incubó la reacción a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 h.

### **2.5.4. Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ )**

Se llevó a cabo el protocolo para transformación de las células de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) **Apendice A.3** se obtuvieron colonias que eran posibles transformantes las cuales se pusieron a crecer en caldo LB con Ampicilina y se dejó incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm durante 16 h.

### **2.5.5 Extracción de ADN plasmídico**

Una vez que se cumplió el periodo de 16 h, en los tubos donde se observe turbidez se llevará a cabo la extracción de ADN plasmídico (**Apendice A.4**), esta muestra se almaceno a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la comprobación mediante la enzima de restricción.

### **2.5.6 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco RI***

- 1 Se preparó la siguiente mezcla de reacción como se indica en la **Tabla 9** para cada muestra.
- 2 Se incubaron los tubos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %.

### 2.5.7 Digestión con la enzima de restricción *Sac I* para liberar el fragmento del gen *AmSPL12*

Se realizó la digestión con la enzima *Sac I* para liberar el fragmento del gen *AmSPL12*, la cual fue empleado para clonar el fragmento en el vector pBin35s-NOS

3. Se preparará la mezcla de reacción como se indica en la **Tabla 11** por cada muestra:

**Tabla 11** Mezcla de reacción de digestión *Sac I* para liberar el fragmento *AmSPL12*.

Reactivos	Vol/Rx (µl)
Agua Estéril	11
Buffer J	1.5
<i>Sac I</i> (Promega)	0.5
ADN	2 µl (2 µg/µL)
<b>Volumen Total</b>	<b>16</b>

4. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h y se comprobó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe DNA gel stain®

### 2.5.7 Transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de infiltración floral.

Una vez que ya se tenga la construcción confirmada en *A. thumefaciens* se llevara a cabo la transformación de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (**Apendice A.5**).

### 2.5.8 Analizar el patrón de expresión del gen *DEMETER* en plantas sobreexpresantes de *AmROSI* en *Arabidopsis thaliana*

En Phytozome, el portal Plant Comparative Genomics del Joint Genome Institute se buscaron las secuencias del gen *DEMETER*, en el programa Benchling se hizo el diseño de un par de oligonucleótidos que serán utilizados para el RT-PCR tiempo real y posteriormente se utilizó



el programa Amplifix para comprobar que los oligonucleótidos no forman estructuras secundarias y no son complementarios entre ellos.

De igual manera que en el caso del gen *AmROSI* se hará extracción de ARN para los tejidos a analizar y por medio de un RT-PCR se establecerán las condiciones de amplificación, las cuales se utilizarán para el Real-Time PCR.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Realizar un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de *AmROSI* y *AmSPL12* con las reportadas en otras especies

##### 3.1.1 Análisis *in silico* de *AmROSI* y *AmSPL12*

La secuencia de ADNc de *AmROSI* tiene una longitud total de 9938 pares de bases (pb) que consta de 20 exones y 19 intrones, un marco de lectura abierto de 6026 pb. La proteína consta de 1824 a.a con una masa molecular 156.5 kDa. La comparación de las secuencias de aminoácidos indicó la presencia de dominios que se detectan en proteínas similares a la familia DEMETER-LIKE como es el caso del dominio de unión hierro y azufre, dominio ENDO3c, Dominio Perm-CXXC se sabe que este dominio es homólogo al dominio de unión al zinc estructural de las deshidrogenasas de cadena media. El dominio clásico zf-CXXC se une a los dinucleótidos no metil-CpG, Dominio RRM\_DME. Se encontró que *AmROSI* es similar a *ROSI* y *DME* encontradas en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (35%) y cereales como *Oryza sativa* (28%), *Sorghum bicolor* (28%), *Hordeum vulgare* (28%) y *Triticum aestivum* (27%) (**Fig. 14**).



**Figura 14** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de DML en cereales conocidos. El alineamiento se hizo con *ROSI* descritas en cereales como *Oryza sativa* (>spC7IW64), *Sorghum bicolor* (>Sobic.004G149800.1), *Hordeum vulgare* (>CAQ58412.1) y *Triticum aestivum* (>AEF38424.1) y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (>AT2G36490.1). Las regiones características de la familia como el dominio Endonucleasa III son subrayado con color rosa, el dominio de unión a hierro y azufre con color naranja, dominio CXXC de color amarillo y el dominio RRM\_DME de color verde.

La secuencia de ADNc de *AmSPL12* tiene una longitud total de 4498 pares de bases (pb) que consta de 10 exones y 9 intrones, un marco de lectura abierto de 2838 pb. La proteína consta de 924 a.a con una masa molecular 104.142 kDa. La comparación en las secuencias de aminoácidos indicó la presencia de dos dominios específicos que se detectan en la familia de proteínas de unión a promotores de *Squamosa* (*SPL*) como es el caso del dominio SBP

(Dominio de unión a *Squamosa*) y un dominio transmembrana. Se encontró que *AmSPL12* es similar a *SPL12* encontradas en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (40%) y al cereal como *Oryza sativa* (18%) (Fig. 15).

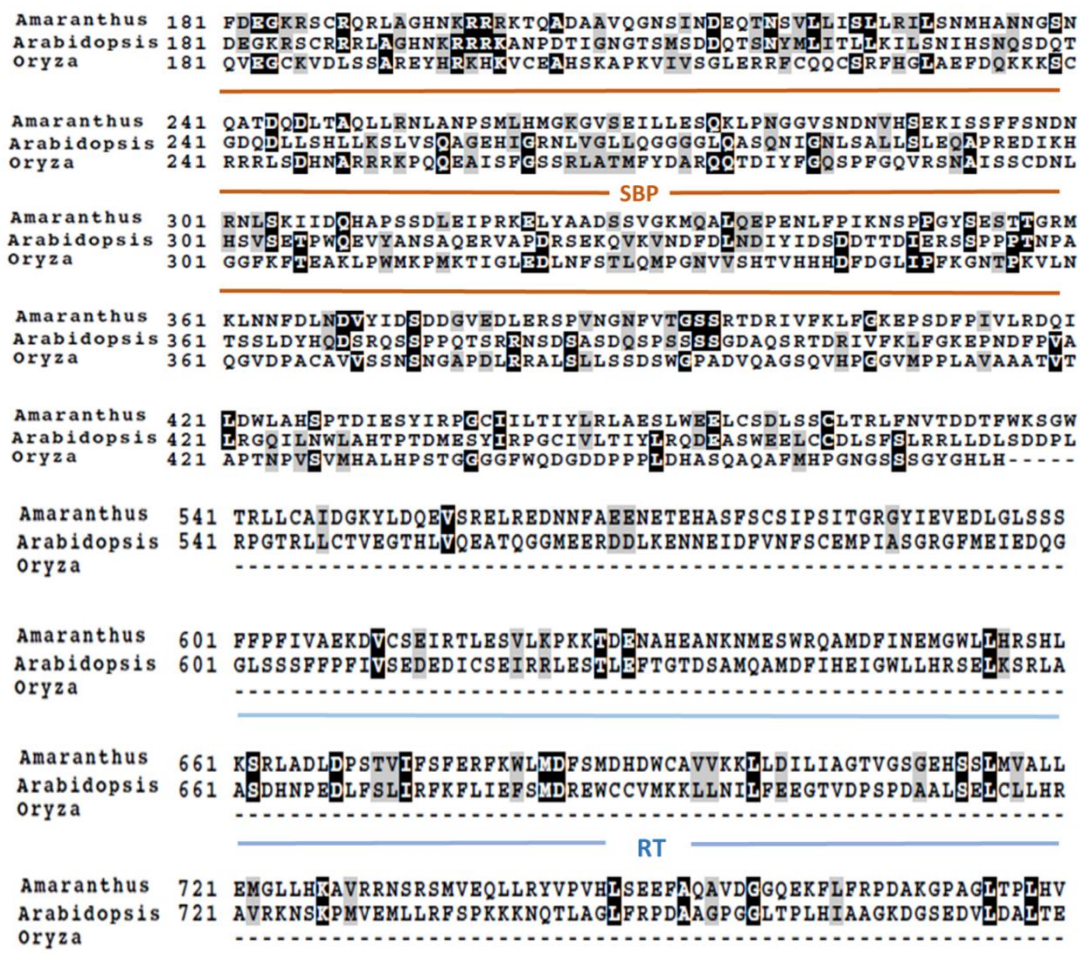


Figura 15 Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *SPL* en otras especies. El alineamiento se llevó a cabo con *SPL12* de amaranto y las descritas en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (>AT3G60030) y el cereal *Oryza sativa* (>XP\_015643452.1). Las regiones características de la familia *SPL* como el dominio SPB son subrayado con color café, el dominio transmembrana de color azul.

### 3.2 Analizar el patrón de expresión del gen *AmROS1* y *AmSPL12* durante el desarrollo floral de *Amaranthus hypochondriacus*

#### 3.1.2 Diseño de oligonucleótidos para *AmROS1* y *AmSPL12*

Una vez obtenidas las secuencias en el programa Benchling se generaron los oligonucleótidos para amplificar todo el gen, para el análisis de sobreexpresión (SE) y para la amplificación de la sonda (HIS) que se utilizara en la hibridación *in situ*, los oligonucleótidos utilizados

para *AmROS1* se muestran en la **Tabla 12** y los utilizados para *AmSPL12* se muestran en la **Tabla 13**.

**Tabla 12 Oligonucleótidos utilizados para el gen *AmROS1***

AmROS1 HIS S <b>5'CCAACAATCCAGCTCAACATGAA 3'</b>
AmROS1 HIS AS <b>5' CTGCATGGTAGGTATGAGCACG 3'</b>
AmROS1 SE S <b>5' AACCCGGGCCAAACTGGTTTTCTCACTCCCAA 3'</b>
AmROS1 SE AS <b>5' AACCCGGGACCTCTCCAGAAGCAATGTTGA 3'</b>

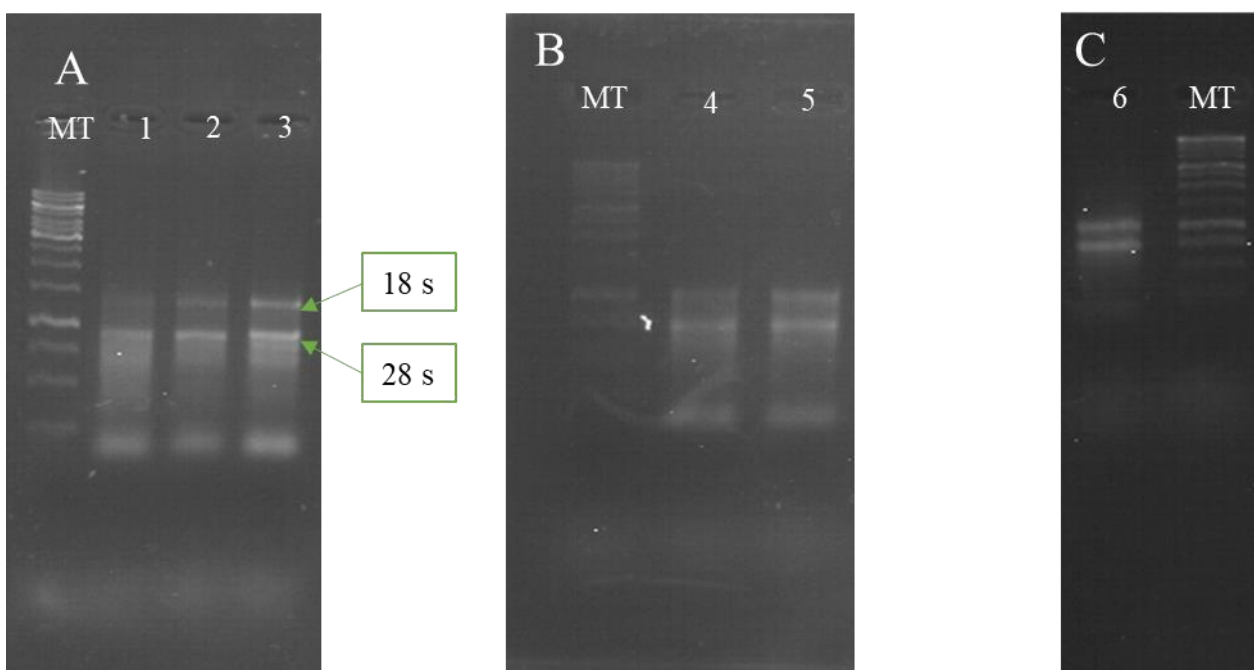
**Tabla 13 Oligonucleótidos utilizados para el gen *AmSPL12***

AmSQUA SHI S8 <b>5' TCGGGATAGCACAGGGGCAACA 3'</b>
AmSQUA SHI AS8 <b>5' TGCAACCTCGAAGCTCACAGCC 3'</b>
AmSQUA SE A <b>5' AAGAGCTCATGGAACAAGCTCACCGT 3'</b>
AmSQUA SE AS <b>5' AAGAGCTCCAAACCAGCAGGTCCCTT 3'</b>

### 3.1.3 Análisis de expresión durante el desarrollo de la planta

Un mes después de haber sembrado la semilla se hizo colecta de tépalo, gineceo, óvulo antes de fecundación y 4 semanas después de la siembra se hizo colecta esta vez del óvulo en etapas posterior a la fecundación; se guardó el tejido en N<sub>2</sub>

En la **Figura 16** se muestran las extracciones de ARN de hoja, talló, tépalo (Tep), gineceo (Gine), óvulo antes de fecundación (OA) y óvulo después de fecundación (OD), se tomaron 1 µg de la muestra de ARN total para llevar a cabo la síntesis de ADNc.



**Figura 16** Extracción de ARN de tejidos de *Amaranthus hypochondriacus* A) 1. Gineceo; 2. Tallo; 3. Hoja; B) 4. Óvulo antes de fecundación; 5. Óvulo después de fecundación; C) 6. Tépaló.

En la **tabla 14** se muestran las concentraciones obtenidas después de realizar la extracción de ARN.

**Tabla 14** Extracciones de ARN a tejidos de *Amaranthus hypochondriacus*

<b>Muestra</b>	<b>µg/MI</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Tallo</b>	0.6853	1.97	1.19
<b>Hoja</b>	5.80	1.99	1.94
<b>Óvulo antes de fecundación</b>	1.057	1.68	2.28
<b>Óvulo después de fecundación</b>	0.8636	1.85	2.01
<b>Tépalo</b>	0.7612	1.62	0.91
<b>Gineceo</b>	0.3596	1.92	0.95

Una vez sintetizada la primera cadena se llevó a cabo el análisis de tiempo real para medir los niveles de expresión.

### 3.1.4 Real-Time PCR

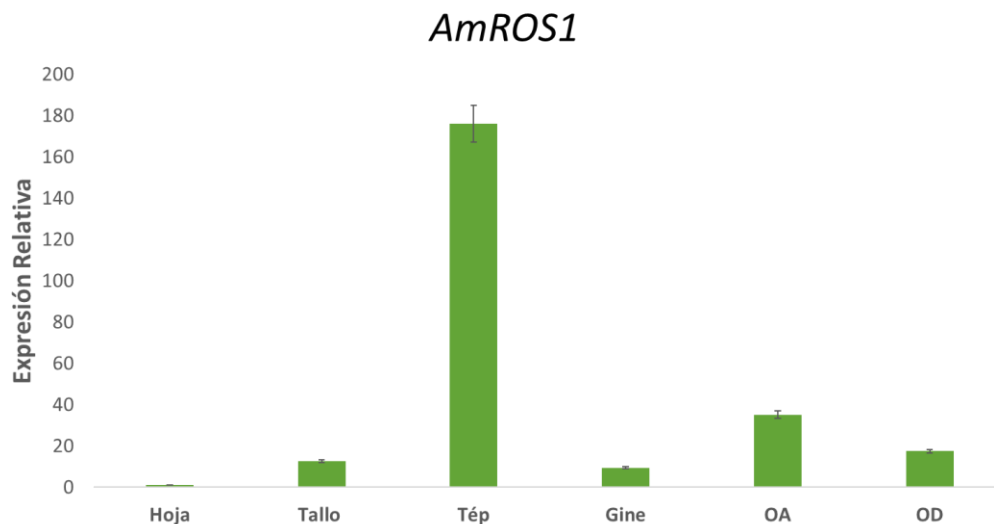
Una vez que se tuvieron los resultados del tiempo real de los genes *AmROS1* y *AmSPL12* se analizaron las melt peak, esta grafica te arroja la es la relación que hay entre la florescencia y la temperatura, esto para poder comprobar la especificidad de los oligonucleótidos y poder estar seguros que no se formaban productos diferentes.

Se tomó como gen constitutivo a Actina y como tejido de referencia la hoja una vez establecido esto se siguió la formula

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{(C_T \text{ gen de interes} - C_T \text{ control})_{Muestra A}}{(C_T \text{ gen de interes} - C_T \text{ control})_{Muestra B}}$$

$$Cambio = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

En la **figura 17** se muestran las gráficas de la expresión relativa de *AmROS1* en cada uno de los tejidos, donde se puede observar que se expresa más en tépalo y óvulo antes de la fecundación, esto lo esperábamos ya que en el fenotipo de la planta mutante *ros1* en *Arabidopsis thaliana* sus tejidos florales como sépalos y pétalos no se desarrollan, así como una alta tasa de óvulos se ve afectado en su desarrollo. Recordando que la desmetilasa *DEMETETER* está involucrada en la desmetilación del alelo materno la cual ocurre en la formación del óvulo y teniendo como premisa que *ROS1* cumple las funciones de *DEMETETER* en cereales, esto explicaría el por qué uno de los tejidos con mayor expresión de *ROS1* es el óvulo antes de la fecundación.



**Figura 17** Niveles de expresión *AmROS1* en tejidos de *Amaranthus Hypochondriacus*. Tep) Tépalo, Gine) Gineceo, OA) Óvulo antes de la fecundación, OD) Óvulo después de la fecundación. *Actina* y hoja, controles.

En la **figura 18** se muestra las gráficas de la expresión de *AmSPL12* en cada uno de los tejidos, donde se puede observar que se tiene mayor expresión en tépalo, óvulo antes de la fecundación, tallo, esto resultados comprueban el fenotipo mutante de *spl12* donde los tejidos florales como sépalos se desarrollan en estadios tempranos, en el tallo se ha descrito que las SPL pertenecientes a la clase 2 están involucrados en el desarrollo de tallo y raíz, y para el óvulo antes de fecundación aún no se ha descrito la participación de *SQUAMOSAI2* en este tejido.



**Figura 18 Niveles de expresión *AmSPL12* en tejidos de *Amaranthus Hypochondriacus*.** Tep) Tépallo, Gine) Gineceo, OA) Óvulo antes de la fecundación, OD) Óvulo después de la fecundación. *Actina* y hoja, controles.

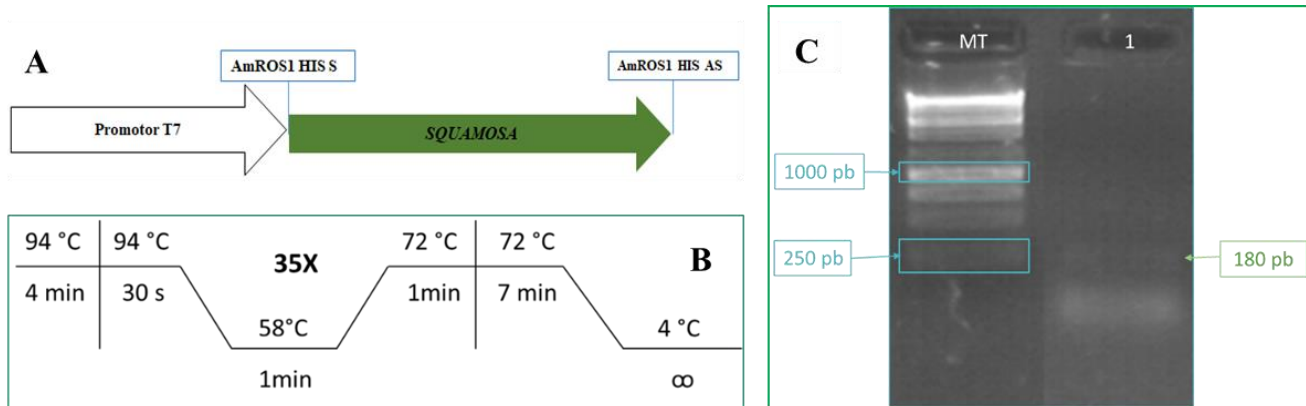
De acuerdo a lo obtenido en el análisis de expresión *AmROS1* y *AmSPL12* se observa que el patrón de expresión es muy parecido, aunque en niveles diferentes, lo que puede sugerir que pudieran estar relacionados.

### 3.3 Diseñar y clonar una sonda específica para realizar análisis de expresión mediante hibridación *in situ* para los genes *AmROS1* y *AmSPL12* durante el desarrollo del óvulo en Amaranto

#### 3.3.1 Amplificación por PCR de la sonda para *AmROS1*

Se llevó a cabo un PCR para amplificar el fragmento del gen *AmROS1* la cual denominamos sonda, en la **figura 19a** muestra una representación esquemática de la construcción que se utilizará para las hibridaciones *in situ*, en la **figura 19b** se muestran las condiciones utilizadas para amplificar la sonda y en la **figura 19c** se muestra el gel de agarosa al 2% donde se puede observar el amplicón de 180 pb.

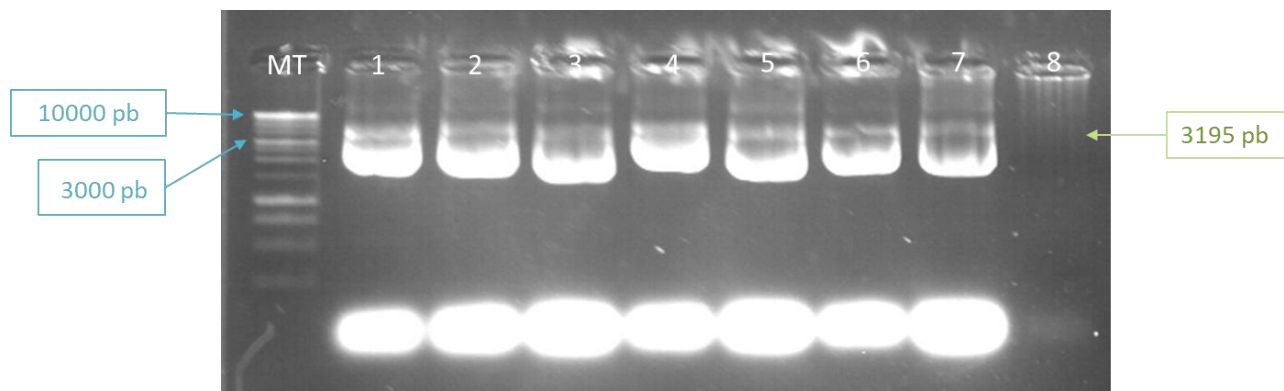




**Figura 19 Amplificación sonda *AmROSI*.** A) Representación esquemática de la construcción de sonda utilizando el promotor T7 B) Condiciones de amplificación C) MT. Marcador de tamaño, 1. PCR sonda *AmROSI*.

### 3.3.2 Ligación al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy

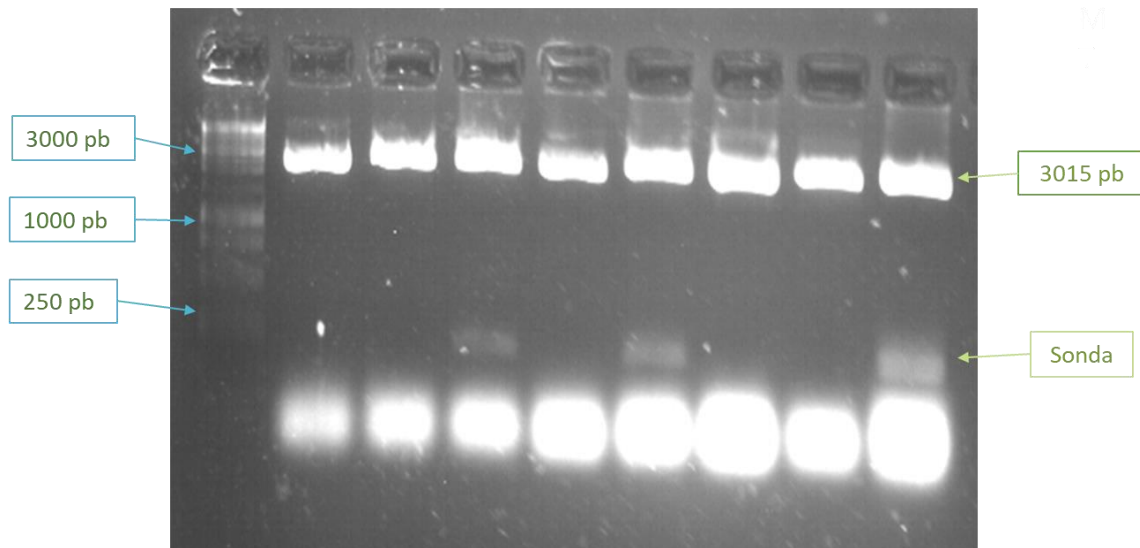
El fragmento de 180 pb se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy, se hizo extracción de ADN plasmídico, el cual se muestra en la **figura 20** con un tamaño de 3195 pb.



**Figura 20 ADN plasmídico sonda con pGEM<sup>®</sup>-T Easy.** A) MT. marcador de tamaño B) 1-8. ADN plasmídico.

### 3.3.3 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco RI*

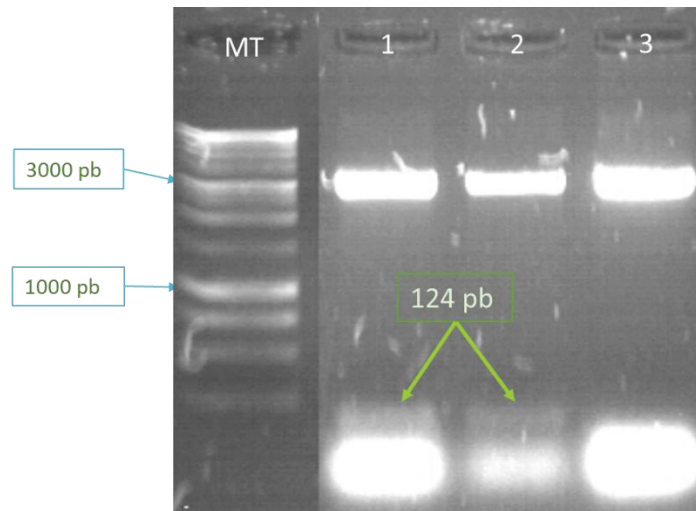
Se comprobó que en el ADN plasmídico que se obtuvo de las colonias que fueron picadas se encontrase la secuencia de 180 pb pertenecientes al tamaño de la sonda, se llevó a cabo la digestión con la enzima *Eco RI*, en la **figura 21** se muestra que al hacer la digestión si se liberó el fragmento del carril 3,5,8 perteneciente al tamaño de nuestra sonda, así como se observa una banda de 3015 pb perteneciente al tamaño del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy.



**Figura 21 Digestión sonda con *Eco RI*.** A) MT. Marcador de tamaño B) 1-8. Digestión ADN plasmidico con *Eco RI*.

### 3.3.4 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Sty I*

Se hizo una segunda digestión con la enzima *Sty I* para poder saber en qué sentido se clonó nuestro fragmento esto con respecto al promotor T7. En la **figura 22** se muestra que al hacer la digestión y está en sentido al promotor T7 se liberará un fragmento de 124 pb pero si se clonó en antisentido se liberará un fragmento menor a 50 pb por lo cual no se observa ninguna banda en el gel de agarosa al 2%, por lo tanto tenemos una clona en antisentido que será utilizada para la hibridación *in situ*.



**Figura 22 Digestión sonda con *Sty I*.** A) MT. Marcador de tamaño B) 1-3 Digestión ADN plasmídico con *StyI*.

Recordando que a diferencia del qRT-PCR la hibridación *in situ* nos indica en que células del tejido se expresa *AmROSI* y *AmSPL12*, el tejido que será utilizado para este análisis es la inflorescencia la cuales ya se tiene fijadas en bloques de parafina, se tomó el tejido cada semana a partir del desarrollo de la panoja. Este estado se observa entre 30 a 50 días después de la siembra

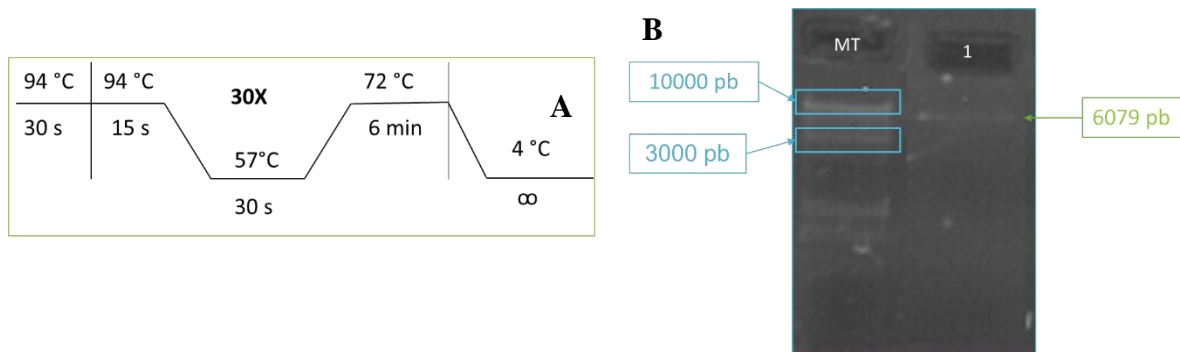
Hasta el momento no se tiene antecedentes de hibridaciones *in situ* en *Arabidopsis thaliana* o en otras especies para *ROSI* y *SPL12*, pero basándonos a lo ya reportado lo que se podría esperar en el caso de *ROSI*, de acuerdo a la hipótesis de que *ROSI* en amaranto lleva a cabo la función de *DEMETER* se tendría expresión en el óvulo antes de la fecundación en la célula central ya que la desmetilación del alelo materno que lleva a cabo *DEMETER* en *Arabidopsis thaliana* es antes de la fecundación y el caso del óvulo después de la fecundación se podría esperar que sea en el endospermo ya que se ha reportado que *ROSI* en trigo y cebada se encarga del almacenamiento de proteínas como la glutenina que se acumulan en el endospermo.

### **3.4 Diseñar una estrategia para la generación de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de los genes *AmROSI* y *AmSPL12***

#### **3.4.1 Amplificación por PCR del fragmento del gen *AmROSI***

Se llevó a cabo un PCR para amplificar el gen *AmROSI* con un tamaño esperado de 6079 pb en la **figura 23a** se muestran las condiciones utilizadas para amplificar el gen y en la **figura**

**23b** se muestra el gel de agarosa al 1.2% donde se puede observar el amplicón de 6079 pb aproximadamente.

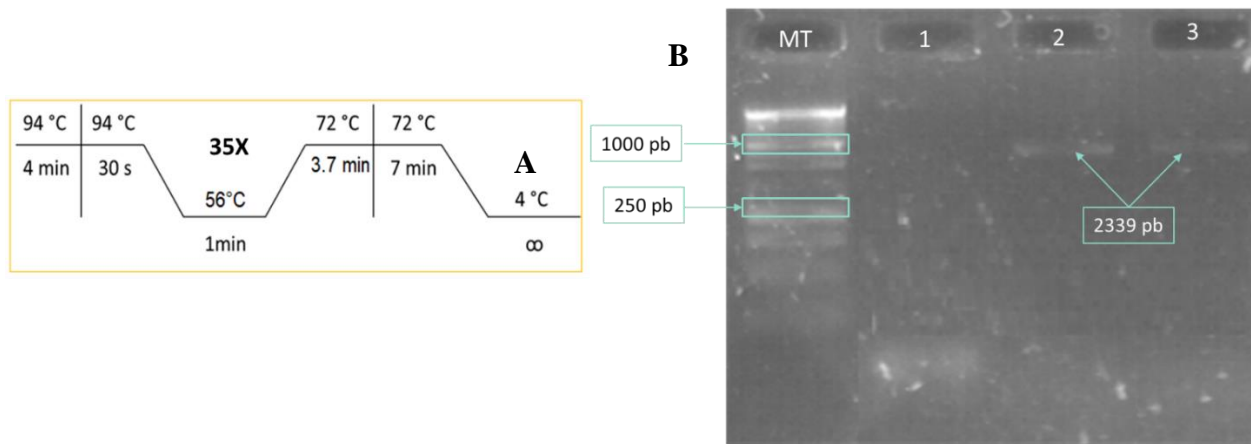


**Figura 23 Amplificación gen *AmROSI*.** A) Condiciones de amplificación B) MT. Marcador de tamaño, 1. PCR gen *AmROSI*.

Hasta el momento no se ha reportado una línea sobreexpresantes de *ROSI* en *Arabidopsis thaliana* pero ya que en la línea mutante carece de órganos florales como sépalos y pétalos, en la línea sobreexpresante se tendría todo lo contrario se esperaría plantas con más flores, mayor rendimiento de semilla ya que en la línea mutante se tiene 50% de semillas abortadas, también se tendría una planta que podría adaptarse a estrés ya sea biótico o abiótico ya que se ha reportado que *ROSI* regula 30% de los genes inducidos por el ácido abscísico.

### 3.4.2 Amplificación por PCR del fragmento del gen *AmSPL12*

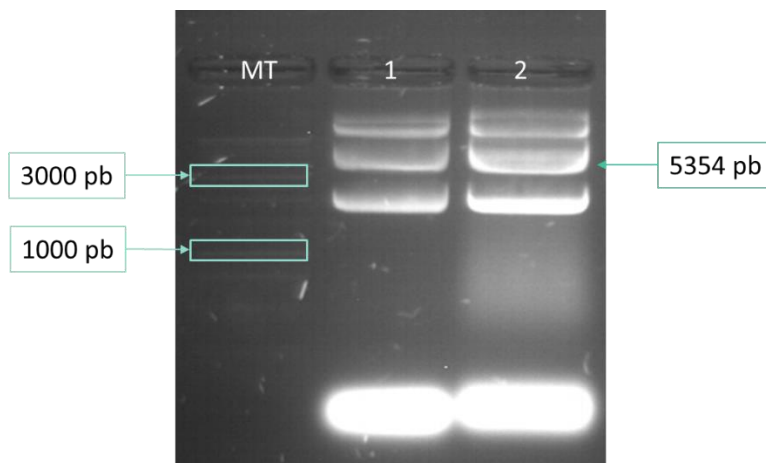
De igual manera por PCR se amplificó *AmSPL12* con un tamaño esperado de 2339 pb en la **figura 24a** se muestran las condiciones utilizadas para amplificar el gen y en la **figura 24b** se muestra el gel de agarosa al 1.2% donde se puede observar el amplicón de 2339 pb aproximadamente



**Figura 24 Amplificación gen *AmSPL12*.** A) Condiciones de amplificación B) MT. Marcador de tamaño, 1. Control negativo, 2 PCR gen *AmSPL12* a 55, 3 PCR gen *AmSPL12* a 57.

### 3.4.3 Ligación gen *AmSPL12* al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy

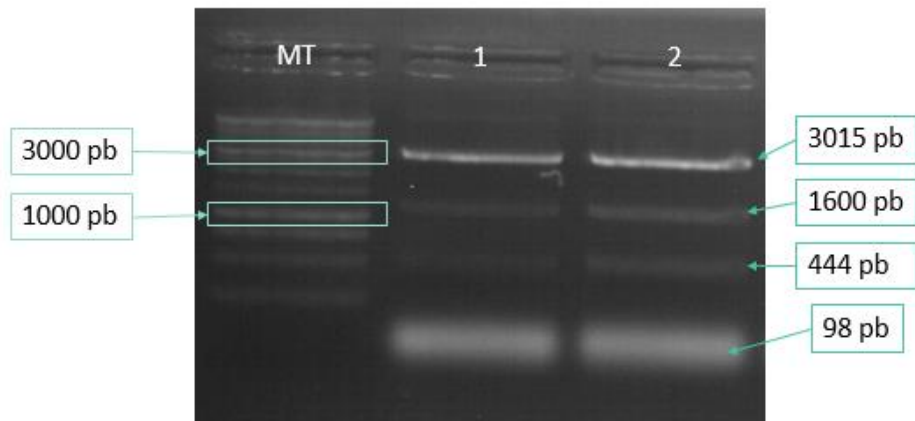
El fragmento de 2339 se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy, se hizo extracción de ADN plasmídico, el cual se muestra en la **figura 23** con un tamaño de 5354 pb.



**Figura 25 ADN plasmídico *AmSPL12* con pGEM<sup>®</sup>-T Easy.** MT. Marcador de tamaño, 1 y 2 ADN plasmídico.

### 3.4.4 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción *Eco RI*

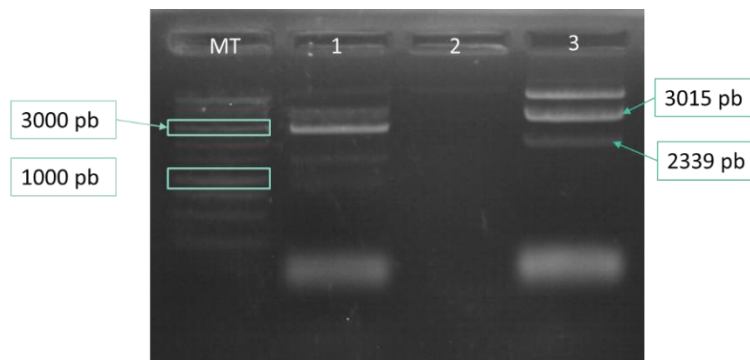
Para comprobar que el ADN plasmídico tenía la secuencia de 2339 pb, correspondiente a *AmSPL12*, se llevó a cabo la digestión con la enzima *Eco RI* esta enzima hace cortes internos al fragmento por lo tanto en la **figura 26** se muestran las bandas de los cortes múltiples que se produjeron y una banda de 3015 pb perteneciente al tamaño del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy.



**Figura 26 Digestión *Eco RI*.** MT. Marcador de tamaño, 1 y 2 ADN Digestión *Eco RI*. La banda con el tamaño de 3015 pb pertenece al tamaño del vector pGEM®-T Easy, las bandas de 1600 pb, 444 pb y 98 pb son los fragmentos pertenecientes a los cortes múltiples que hace la enzima *Eco RI* al gen *AmSPL12*.

### 3.4.5 Digestión con la enzima de restricción *Sac I* para liberar el fragmento del gen *AmSPL12*

Una vez que se comprobó que se tenía el inserto ahora se quería liberar el fragmento para poder ligarlo al vector de sobreexpresión pBin35s-NOS esto se hizo mediante la digestión con la enzima *Sac I*, en la **figura 27** se muestra la digestión con *Sac I* y el fragmento liberado.



**Figura 25 Digestión *Sac I*.** MT. Marcador de tamaño, 3 ADN Digestión *Sac I*. La banda con el tamaño de 3015 pb pertenece al tamaño del vector pGEM®-T Easy, la banda de 2339 pb pertenece al gen *AmSPL12*.

En el caso de *SPL12* no se ha reportado una línea sobreexpresantes en *Arabidopsis thaliana* pero ya que en la línea mutante presenta floración temprana, se ve afectada la morfología de la hojaya tejidos florales no se desarrollan y en el caso de las hojas caulinares no se desarrollan,

se podría esperar que en la línea sobreexpresante tenga un retraso en sus desarrollo, ya sea que no presente floración en el tiempo establecido, se tendría un mayor rendimiento en los tejidos florales ya que es allí donde se más se expresa *SPL12*, un tallo más largo y un número mayor de hojas caulinares que la tipo silvestre. Se ha reportado que el mecanismo de señalización del ácido abscísico es activado por *SPL12* cuando la planta presenta estrés por calor por lo tanto la planta sobreexpresante tendría tolerancia a este tipo de estrés.

### 3.4.6 Diseño de oligonucleótidos para *DEMETER*

Para poder comprobar que *ROSI* regula a *DEMETER* en la desmetelación del alelo materno durante el desarrollo del óvulo se analizará el patrón de expresión de *DEMETER* en la línea sobreexpresante de *ROSI* esperando que este se vea afectado, es decir que no solo se tendría expresión en la célula central que es donde *DEMETER* se expresa si no que se expresaría en todos los tejidos donde *ROSI* se exprese, pero si no se observa cambio en el patrón de expresión entonces se llegaría a la conclusión de que *ROSI* no regula a *DEMETER* en *Arabidopsis thaliana*.

En la **tabla 15** se muestran los oligonucleótidos diseñados para analizar niveles de expresión de *DEMETER*.

**Tabla 15 Oligonucleótidos para *DEMETER***

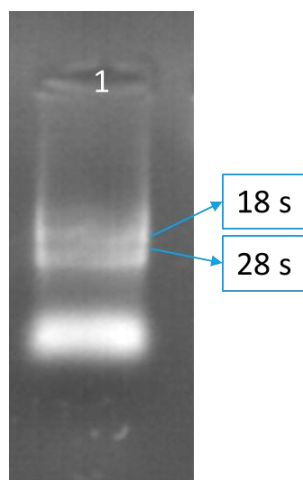
*AtDEMETER qPCR-S1*

**5' ATCGCCTGGGCTTCGACCTCAT 3'**

*AtDEMETER qPCR-AS1*

**5' AGGAGCCCTGCTTCTCTGGCAT 3'**

En la **figura 28** se muestra la extracción de ARN total en botones de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre.



**Figura 28** Extracción ARN botón floral *Arabidopsis thaliana*. 1 Botón.

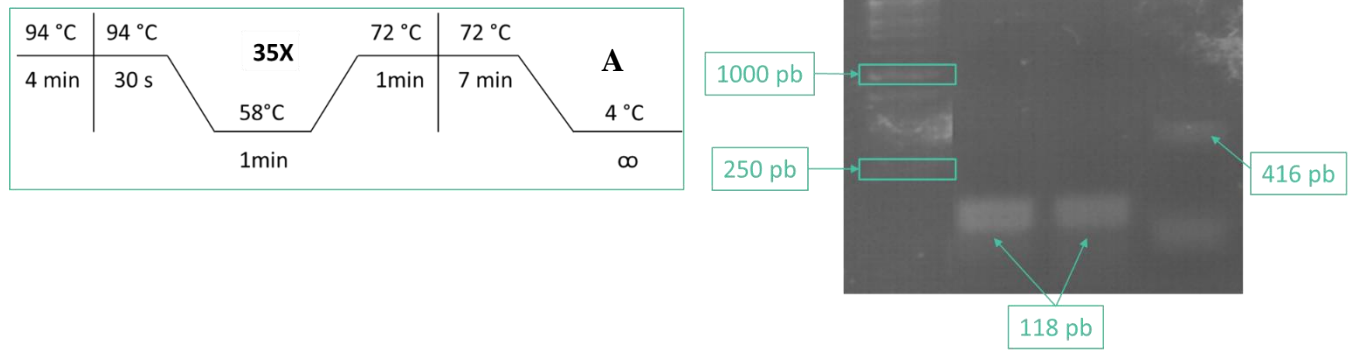
En la **tabla 16** se muestran las concentraciones obtenidas después de realizar la extracción de ARN.

**Tabla 16** Extracción de ARN de botón *Arabidopsis thaliana*

<b>Muestra</b>	<b>µg/ml</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Botón</b>	0.7202	1.98	1.12

Una vez sintetizada la primera cadena se llevó a cabo el PCR para establecer las condiciones de amplificación que se muestran en la **figura 29a** y en la **figura 29b** se muestra la banda perteneciente a 118 pb.





**Figura 29 Condiciones de amplificación gen *DEMETER*.** A) Condiciones de amplificación B) MT. Marcador de tamaño, 1. PCR gen *DEMETER* a 55°C, 2 PCR gen *DEMETER* a 58, 3 PCR gen *DEMETER* fragmento 416 pb.

## IV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante los alineamientos de secuencias de *AmROSI* con las desmetilasas encontradas en *Arabidopsis thaliana*, arroz, cebada, trigo y sorgo, se encontró que *AmROSI* conserva las regiones características de la familia, como el dominio endonucleasa III, el dominio de unión a hierro y azufre, CXXC, RRM\_DME, dominios propios de la familia DEMETER-LIKE.

Los resultados obtenidos mediante los alineamientos de secuencias de *AmSPL12* con las *SPL12* reportadas en *Arabidopsis thaliana* y arroz, muestran la presencia de dos dominios específicos que se detectan en proteínas similares a la familia *SPL* como es el caso del dominio SBP (Dominio de unión a *Squamosa*) y un dominio transmembrana.

Mediante el análisis de la expresión relativa de *AmROSI* en hoja, tallo, tépalo, gineceo, óvulo antes de fecundación y óvulo después de fecundación se obtuvo que *AmROSI* se expresa más en tépalo y óvulo antes de fecundación esto confirmando el fenotipo de la mutante de *ros1* en *Arabidopsis thaliana* y podría ser importante en etapas de diferenciación del gametofito femenino.

La expresión relativa del gen *AmSPL12* mediante análisis de RT-PCR tiempo real en diferentes tejidos florales y muestra mayor expresión en tépalo, óvulo antes de la fecundación y tallo, estos resultados comprueban el fenotipo mutante de *spl12* donde los tejidos florales como sépalos se desarrollan en estadios tempranos, en tallo se ha descrito que las *SPL* pertenecientes a la clase 2 están involucrados en el desarrollo de tallo y raíz, y para el óvulo antes de fecundación aún no se ha descrito la participación de *SPL12* en este tejido, esto sugiere que *AmSPL12* podría ser importante en las etapas de diferenciación del gametofito femenino.

## V. PERSPECTIVAS

Realizar los análisis de expresión durante el desarrollo óvulo mediante la técnica de hibridación *in situ* para ambos genes.

Generar líneas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de los genes de amaranto *AmROSI* (*35S:AmROSI*) y *AmSPL12* (*35S:AmSPL12*) y analizar complementación de la mutante endógena de *Arabidopsis*, para complementar el análisis funcional.

Analizar el patrón de expresión de DEMETER en la línea sobreexpresante de *35S:AmROSI* y *35S:AmSPL12*, así como otros genes relacionados.

## VI. REFERENCIAS

- Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11796-11801
- Andreuzza S, Li J, Guitton AE, Faure JE, Casanova S, Park JS *et al* (2010) DNA LIGASE I exerts a maternal effect on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 137:73–81
- Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P., & Baulcombe, D. C. (2005). Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *The Plant Journal*, 43(6), 837-848.
- Ayala, G. A. V., Escobedo, L. D., Cortés, E. L., & Espitia, R. E. (2012). El cultivo de amaranto en México, descripción de la cadena, implicaciones y retos. *Amaranto: ciencia y tecnología*, 315-330.
- Barrales-López, A., Guevara-Olvera, L., Espitia-Rangel, E., González-Chavira, M. M., Bernardino-Nicanor, A., Gonzalez-Cruz, L., ... & Acosta-García, G. (2018). Female gametogenesis and early seed development in *Amaranthus hypochondriacus* L. *Botanical Sciences*, 96(3), 383-394.
- Bartee, L., Malagnac, F., & Bender, J. (2001). Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & development*, 15(14), 1753-1758.
- Bartee, L., Malagnac, F., & Bender, J. (2001). Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & development*, 15(14), 1753-1758.
- Bauer, M. J., & Fischer, R. L. (2011). Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Current opinion in plant biology*, 14(2), 162-167
- Bauer, M.J., and Fischer, R.L. (2011). Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 162-167.

- Becker, R., E.L. Wheeler, K. Lorenz, A.E. Stafford, O.K. Grosjean, A.A. Betschart and R.M. Sanders. 1981. A compositional study of amaranth grain. *J. Food Sci.* 46(4): 1175 – 1180
- Betschart, A. A., D.W. Irving, A.D. Shepherd, E.L. Wheeler and R.M. Saunders. 1979. Nutritional studies on *Amaranthus hypochondriacus* and its milling fractions. Proceedings of the Second Amaranth Conference. Rodale Press Inc., Emaus, PA. pp. 59-65.
- Bird A, Wolffe AP. Methylation induces repression-belts, braces and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-4.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Birkenbihl, R. P., Jach, G., Saedler, H., & Huijser, P. (2005). Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of molecular biology*, 352(3), 585-596.
- Birkenbihl, R. P., Jach, G., Saedler, H., & Huijser, P. (2005). Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of molecular biology*, 352(3), 585-596.
- Brenner, D. 1990. seed shattering control with indehiscent utricles in grain *Amaranthus*. *Legacy* 3:2-3
- Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2002). Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*, 12(13), 1138-1144.
- Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2002). Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*, 12(13), 1138-1144.
- Cardon, G. H., Höhmann, S., Nettessheim, K., Saedler, H., & Huijser, P. (1997). Functional analysis of the Arabidopsis thaliana SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *The Plant Journal*, 12(2), 367-377.
- Cardon, G., Höhmann, S., Klein, J., Nettessheim, K., Saedler, H., & Huijser, P. (1999). Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene*, 237(1), 91-104.

- Chao, L. M., Liu, Y. Q., Chen, D. Y., Xue, X. Y., Mao, Y. B., & Chen, X. Y. (2017). Arabidopsis transcription factors SPL1 and SPL12 confer plant thermotolerance at reproductive stage. *Molecular plant*, 10(5), 735-748.
- Choi Y., Gehring M., Johnson L., Hannon M., Harada J. J., Goldberg R. B., Jacobsen S. E., Fischer R. L. (2002) Cell 110, 33–42
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., ... & Fischer, R. L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell*, 110(1), 33-42.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303.
- Downton, W. J.S. 1973. Amaranthus edulis: A high lysine grain amaranth. *World Crops*, 25(1):20
- Drews, G. N., & Koltunow, A. M. (2011). The female gametophyte. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Duan CG, Wang X, Tang K, Zhang H, Mangrauthia SK, Lei M *et al* (2015) MET18 connects the cytosolic iron–sulfur cluster assembly pathway to active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 11:e1005559
- Duarte-Correa, A. L. Jokl and R. Carlsson, R. 1986. Amino acid composition of some *Amaranthus* spp. Grain proteins and of its fractions. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 36:466-476
- Espitia, R. E. 1991b. Estabilidad del rendimiento en amaranto. p. 65 *In*: Primer congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos, 22-27 sep. México.
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and proteína requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Meeting. WHO, Geneva.
- Feine, L. B., Harwood, R., Kauffman, S. C. and Senft, J. P. 1979. Amaranth: gentle giant of the past and the future. *En*: G. A. Ritchie (Ed.). *New Agricultural Crops*. AAAS Selected Symposium 38. Westview Press, Boulder, CO. pp. 41-63
- García, L. A., M.A. Alfaro and R. Bressani. 1987. Digestibility and nutritional value of crude oil from three amaranth species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64(3):371-375.

- Garcia-Aguilar, M., Michaud, C., Leblanc, O., & Grimanelli, D. (2010). Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *The Plant Cell*, 22(10), 3249-3267
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, 124,495-506.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., David, L., & Zhu, J. K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, 111(6), 803-814.
- Guitton, A. E., & Berger, F. (2005). Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(8), 750-754.
- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., & Luo, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418(1-2), 1-8.
- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., & Luo, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418(1-2), 1-8.
- Horn, P. J., & Peterson, C. L. (2002). Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*, 297(5588), 1824-1827.
- Hsieh TF, Ibarra CA, Silva P, Zemach A, Eshed-Williams L, Fischer RL *et al* (2009) Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science* 324:1451–1454
- Jenuwein, T., & Allis, CD (2001). Traducir el código de histonas. *Science* , 293 (5532), 1074-1080.
- Jilani A, Ramotar D, Slack C, Ong C, Yang XM, Scherer SW *et al* (1999) Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem* 274:24176–24186
- Johnston, A. J., & Gruissem, W. (2009). Gametophyte differentiation and imprinting control in plants: Crosstalk between RBR and chromatin. *Communicative & integrative biology*, 2(2), 144-146.

- Jorgensen, S. A., & Preston, J. C. (2014). Differential SPL gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in *Mimulus* and *Arabidopsis*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 73, 129-139
- Jullien PE, Mosquna A, Ingouff M, Sakata T, Ohad N, Berger F (2008) Retinoblastoma and its binding partner
- Kankel, M. W., Ramsey, D. E., Stokes, T. L., Flowers, S. K., Haag, J. R., Jeddelloh, J. A., ... & Richards, E. J. (2003). *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 163(3), 1109-1122.
- Kankel, M. W., Ramsey, D. E., Stokes, T. L., Flowers, S. K., Haag, J. R., Jeddelloh, J. A., ... & Richards, E. J. (2003). *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 163(3), 1109-1122.
- Kaur, S., Singh, N., & Rana, J. C. (2010). *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus caudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours. *Food chemistry*, 123(4), 1227-1234.
- Klein, J., Saedler, H., & Huijser, P. (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Molecular and General Genetics MGG*, 250(1), 7-16.
- Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R. P., Depege, N., Huijser, P., & Merchant, S. (2005). A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), 18730-18735.
- Latrasse, D., Benhamed, M., Henry, Y., Domenichini, S., Kim, W., Zhou, D. X., & Delarue, M. (2008). The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC plant biology*, 8(1), 121.
- Leal, M. R., Dinkova, T. D., & Quintero, M. (1998). La metilación del ADN y su manifestación en las plantas. *Revista CENIC.: Ciencias biológicas*, 29(1), 3.
- Lee J, Jang H, Shin H, Choi WL, Mok YG, Huh JH (2014) AP endonucleases process 5-methylcytosine excision intermediates during active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 42:11408–11418



- Lei M, Zhang H, Julian R, Tang K, Xie S, Zhu JK (2015) Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:3553–3557
- Li Y, Cordoba-Canero D, Qian W, Zhu X, Tang K, Zhang H *et al* (2015a) An AP endonuclease functions in active DNA demethylation and gene imprinting in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 11:e1004905
- Li Y, Duan CG, Zhu X, Qian W, Zhu JK (2015b) A DNA ligase required for active DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Cell Res* 25:757–760
- Li, Y., Kumar, S., & Qian, W. (2018). Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. *Plant cell reports*, 37(1), 77-85.
- Liang, X., Nazarenus, T. J., & Stone, J. M. (2008). Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 47(12), 3645-3653.
- Lieber, D., Lora, J., Schrempp, S., Lenhard, M., & Laux, T. (2011). Arabidopsis WIH1 and WIH2 genes act in the transition from somatic to reproductive cell fate. *Current Biology*, 21(12), 1009-1017.
- Lindahl, T. and Wood, R.D. (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897–1905
- Lindroth, A. M., Cao, X., Jackson, J. P., Zilberman, D., McCallum, C. M., Henikoff, S., & Jacobsen, S. E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 292(5524), 2077-2080.
- Lindroth, A. M., Cao, X., Jackson, J. P., Zilberman, D., McCallum, C. M., Henikoff, S., & Jacobsen, S. E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 292(5524), 2077-2080.
- Luo M, Taylor JM, Spriggs A, Zhang H, Wu X, Russell S *et al* (2011) A genome-wide survey of imprinted genes in rice seeds reveals imprinting primarily occurs in the endosperm. *PLoS Genet* 7:e1002125
- Martínez Salvador, L. (2016). Seguridad alimentaria, autosuficiencia y disponibilidad del amaranto en México. *Problemas del desarrollo*, 47(186), 107-132.

- Martinez-Macias MI, Qian W, Miki D, Pontes O, Liu Y, Tang K *et al* (2012) A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 45:357–370
- McCullough, A.K., Dodson, M.L. and Lloyd, R.S. (1999) Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 255–285
- Nakao M (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 2001; 278: 25-31
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S. and Verdine, G.L. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.* 6, 968–980
- National Research Council. Amaranth(1984) : Modern prospects for an ancient Crop; National Academy Press: Washington DC, 1984
- Nieto, C.1990. El cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE.
- Nonomura, K. I., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Suzuki, T., Miyao, A., Hirochika, H., & Kurata, N. (2003). The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *The Plant Cell*, 15(8), 1728-1739
- Nonomura, K. I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., & Kurata, N. (2007). A germ cell-specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *The Plant Cell*, 19(8), 2583-2594.
- Oke, O.L. 1979. Amaranth in Nigeria. En: Proceedings of the Second Amaranth Conference. Rodale Press Inc., Emaus, PA. EUA. pp. 22-29.
- Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimaneli, D., ... & Vielle-Calzada, J. P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, 464(7288), 628

- O'Neill RJW, Oneill MJ, Graves JAM (1998). Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodeling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* ; 393: 68-72.
- Ortega-Galisteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldan-Arjona T (2008). Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol.* ;67:671–681.
- Paulsen M, Ferguson-Smith AC (2001). DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* ; 195: 97-110.
- Pedersen B., Hallgren, L. Hansen, I. y Eggum, B. O. 1987b. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*). 2. as a supplement to cereals. *Plant Foods Human Nutr.* 36: 325- 334.
- Pedersen, B., L.S. Kalinowski and B.O.Eggum. 1987a. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*). 1. Protein and minerals of raw and processed grain. *Plant Foods Human Nutr.* 36: 309-324
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H., Ballinger, T., Henikoff, S., & Fischer, R. L. (2007). DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6752-6757.
- Porr, Madeleine (2012), “El amaranto- pequeñas semillas con fuerzas colosales” (consultado en mayo de 2014), disponible en [http://www.el-panalegre.org/Guia\\_Amaranto.pdf](http://www.el-panalegre.org/Guia_Amaranto.pdf)
- Raissig, M.T., Baroux, C., and Grossniklaus, U. (2011). Regulation and flexibility of genomic imprinting during seed development. *Plant Cell* 23, 16-26.
- Razin, A., & Riggs, A. D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science*, 210(4470), 604-610.
- Richards, E. J., & Elgin, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4), 489-500
- Riese, M., Zobell, O., Saedler, H., & Huijser, P. (2008). SBP-domain transcription factors as possible effectors of cryptochrome-mediated blue light signalling in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*, 227(2), 505-515.

- Rodriguez-Dorantes, M., Tellez-Ascencio, N., Cerbon, M. A., Lopez, M., & Cervantes, A. (2004). DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 56(1), 56-71.
- Sánchez M. A. 1980. Potencial agroindustrial del Amarantho. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México, D.F. 238 p.
- Sauer, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-616.
- Senft, J.P. 1979. Protein quality of amaranth grain. En: Proceedings of the Second Amaranth Conference. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. p. 43-45.
- Sheridan, W. F., Golubeva, E. A., Abrhamova, L. I., & Golubovskaya, I. N. (1999). The mac1 mutation alters the developmental fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the maize anther. *Genetics*, 153(2), 933-941.
- Singh, M., Goel, S., Meeley, R. B., Dantec, C., Parrinello, H., Michaud, C., ... & Grimanelli, D. (2011). Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *The Plant Cell*, 23(2), 443-458.
- Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. 1988. Composition of the seeds of some Amaranthus species. *J. Food Sci.* 42: 325-331.
- Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzic M, Becker JD, Feijo JA *et al* (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136:461–472
- Sommer, F., Kropat, J., Malasarn, D., Grosseohme, N. E., Chen, X., Giedroc, D. P., & Merchant, S. S. (2010). The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains. *The Plant Cell*, 22(12), 4098-4113
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W. R., & Bäurle, I. (2014). Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell*, 26(4), 1792-1807
- Tapia, M. 1997. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. 2a Edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- Tariq, M., & Paszkowski, J. (2004). DNA and histone methylation in plants. *TRENDS in Genetics*, 20(6), 244-251

- Unte, U. S., Sorensen, A. M., Pesaresi, P., Gandikota, M., Leister, D., Saedler, H., & Huijser, P. (2003). SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(4), 1009-1019.
- Velasco L., Ana Ma. y Samuel L. Villela F. (2016), “El amaranto”, en *Revista Arqueología Mexicana*, vol. xxiii-núm. 138, mayo, México.
- Vietmeyer N. 1982. Nueva Gloria del amaranto. *Ceres* 5:43-46
- Wang X, Li Q, Yuan W, Cao Z, Qi B, Kumar S *et al* (2016) The cytosolic Fe-S cluster assembly component MET18 is required for the full enzymatic activity
- Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H., Mitra, S. and Hazra, T.K. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol. Cell* 15, 209–220
- Williams, S.D. and David, S.S. (1998) Evidence that MutY is a monofunctional glycosylase capable of forming a covalent Schiff base intermediate with substrate DNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 5123–5133
- Wolffe AP, Matzke MA(1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*; 286: 481-6.
- Yamaguchi, T., Lee, D. Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., & Hirano, H. Y. (2006). Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 18(1), 15-28.
- Yang, W. C., & Sundaresan, V. (2000). Genetics of gametophyte biogenesis in Arabidopsis. *Current opinion in plant biology*, 3(1), 53-57.
- Yang, Z., Wang, X., Gu, S., Hu, Z., Xu, H., & Xu, C. (2008). Comparative study of SBP-box gene family in Arabidopsis and rice. *Gene*, 407(1-2), 1-11.
- Zemach, A., Kim, M.Y., Silva, P., Rodrigues, J.A., Dotson, B., Brooks, M.D., and Zilberman, D. (2010). Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18729-18734.
- Zhao, X., De Palma, J., Oane, R., Gamuyao, R., Luo, M., Chaudhury, A., ... & Bennett, J. (2008). OsTDL1A binds to the LRR domain of rice receptor kinase MSP1, and is required to limit sporocyte numbers. *The Plant Journal*, 54(3), 375-387.

- Zhao, Y., Lin, S., Qiu, Z., Cao, D., Wen, J., Deng, X., ... & Li, X. (2015). MicroRNA857 is involved in the regulation of secondary growth of vascular tissues in Arabidopsis. *Plant physiology*, *169*(4), 2539-2552.
- Zharkov, D.O., Ishchenko, A.A., Douglas, K.T. and Nevinsky, G.A. (2003) Recognition of damaged DNA by Escherichia coli Fpg protein: insights from structural and kinetic data. *Mutat. Res.* *531*, 141–156.
- Zhu JK (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* *43*:143–166

## VII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	1 semestre	2 semestre						3 semestre					4 semestre					
	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
Siembra de Amarantho	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
Elaboración de protocolo		X																
Diseño de Oligonucleotidos	X	X	X															
Extracción de ARN				X	X		X			X								
Real-Time PCR					X			X			X							
Diseño de sonda					X													
Hibridaciones <i>in situ</i>						X	X	X	X	X	X							
Ligación en pGEM							X	X	X	X								
Siembra de <i>Arabidopsis thaliana</i>							X	X	X	X	X	X						
Transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>								X	X	X								
Análisis de Fenotipo									X	X	X	X						
Presentación del protocolo						X						X					X	
Revisión de Tesis														X	X	X	X	

## **VIII. APENDICE**

### **APENDICE A**

#### **A.1 Extracción de ARN: Método del TRIzol® Reagent.**

##### **Preparación del material**

- a) Preparar una solución de dietilpolicarbonato (DEPC) 0.1% en etanol absoluto y dejar en agitación toda la noche. Cerrar el frasco perfectamente.
- b) Sumergir en esa solución todo el material que estará en contacto con la muestra de extracción de ARN (puntas para pipetas, tubos eppendorf, tubos para PCR, mortero y pistilo, cámara de electroforesis, espátula). Cubrir los recipientes con papel aluminio para evitar la volatilización del etanol y dejar en tratamiento por 24 horas.
- c) Recuperar la solución de DEPC. Escurrir y dejar volatilizar el etanol restante del material hasta que esté completamente seco.
- d) Esterilizar el material tratado con DEPC y usarlo para la extracción de ARN.

##### **Protocolo de extracción de ARN**

1. En un mortero estéril y congelado con Nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>), colocar el tejido de la planta (no debe exceder más del 10% del volumen de TRIzol a utilizar) y adicionar N<sub>2</sub> en exceso. Ya evaporado el N<sub>2</sub> pulverizar perfectamente el tejido congelado evitando que se descongele. Si es necesario, agregar más N<sub>2</sub>. Transferir el tejido pulverizado a un tubo eppendorf tratado con DEPC, estéril y congelado.
2. Agregar 1mL de TRIZOL e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada 1mL de TRIZOL adicionado. Agitar por inversión lenta por 15 segundos e incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12 000rpm por 15 minutos a 4°C (la fase acuosa contiene el ARN).
4. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 0.5 mL de isopropanol frío por cada 1 mL de TRIZOL adicionado. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante.



5. Lavar 2 veces la pastilla con 1mL de etanol al 75% por cada 1mL de TRIZOL. Agitar suavemente y centrifugar a 7 500 rpm por 5 minutos a 4°C.
6. Voltar el tubo sobre una sanita y dejar secar la pastilla por 15 minutos evitando que seque completamente.
7. Disolver el ARN en 15 µL de agua destilada estéril libre de RNAsas (agua estéril con DEPC). NO SE PIPETEA, DEJAR QUE SE DISUELVA SOLO.
8. Calentar a 55-60°C por 10 minutos y de inmediato poner en hielo.
9. El producto de la reacción se podrá analizar en un gel de agarosa desnaturalizante (DEPC) al 1.2 %.
10. Utilizar de inmediato para la síntesis de cDNA o almacenar a -70°C.

## **A.2 Hibridación *in situ***

### Preparación de portaobjetos y cubreobjetos

1. Remojar portaobjetos en ácido nítrico concentrado durante 30 min.
2. Lavar durante al menos 1 h en varios cambios de agua destilada y luego drenar
3. Envolver durante 15 minutos en acetona y luego drenar.
4. Envolver en papel de aluminio y calentar en placa de calentamiento a 180 ° C durante > 2 Hr.
5. Cuando los portaobjetos estén secos añadir 4 µL de poli-L-lisina (1 mg / mL en agua esterilizada en autoclave) y dibujar en una película sobre el portaobjetos usando un cubreobjetos. Si no se forma una película, a continuación, las diapositivas no están lo suficientemente limpia, trate de lavar de nuevo en acetona fresca.
6. Deje los portaobjetos en placa de calentamiento 42 ° C durante la noche para que se sequen, luego guárdelos en una caja.
7. Para preparar cubreobjetos, lavar en acetona durante 15 minutos. y calentar como el portaobjeto

### Corte de tejido

Cortar el bloque de cera a una forma trapezoidal, dejando alrededor de 2 mm de cera alrededor el tejido (más de esta no ayudará a seccionar, y dará a un menor número de secciones por portaobjetos)

Montar el bloque de tal manera que la más larga de las dos caras paralelas es en la parte inferior (es decir. es el primero en golpear la cuchilla).

Cortar las cintas de la sección a 7 -10µm espesor. Flotador en agua estéril sobre portaobjetos recubiertos a continuación, colocar en 42 ° C placa de calentamiento durante unos minutos hasta que la cinta se aplane. Escorra el exceso de agua, y presiona con el tejido objetivo.

Dejar en la placa de calentamiento durante la noche para que seque.

### **Etiquetado de sondas.**

1. Configurar las reacciones en el banco (no en hielo)

#### **Mezcla de reacción:**

- 9.5 µl dH<sub>2</sub>O
  - 2.5 µl 10 X T7 buffer
  - 1 µl RNase inhibidor
  - 2.5 µl 5mM ATP
  - 2.5 µl 5mM GTP
  - 2.5 µl 5mM CTP
  - 2.5 µl 1mM DIG-UTP
  - 1 µl de ADN (1-0,5 g)
  - 1 µl T7 polimerasa
2. Incubar durante 40 minutos a 37 ° C.
  3. Para detener la reacción anterior:
    - 75 µl 1 MS.
    - 2 µl tRNA (100 mg / ml).
    - 1 µl de DNasa (libre de RNasa).
  4. Incubar durante 10 minutos. a 37 ° C.
  5. Precipitado agregar
    - 100 µl 3.8M NH<sub>4</sub>Ac.
    - 600 µl EtOH (frío).
  6. -20 ° C durante la noche (o 10 minutos. En hielo).
  7. Centrifugar 10 mins a 4 ° C (13.000 a 15.000 rpm).
  8. 100-200 µl de 70% de EtOH / NaCl 0,15 M (hielo).
  9. Centrifugar y eliminar el sobrenadante, secar al aire a temperatura ambiente.
  10. Resuspender en 50 µl de H<sub>2</sub>O (estéril).
  11. Añadir 50 µl de solución reguladora de carbonato 200 mM de pH 10.
  12. Incubar a 60 ° C hasta precipitar.
  13. Almacenar a -20 ° C durante 2 h.
  14. Centrifugar, lavar y secar.
  15. Resuspender en 50 µl de TE.

## Cronograma de hibridación *in situ*

### Primer día:

#### 3 TRATAMIENTO PREVIO DE TEJIDO

1. Preparar las siguientes soluciones (comience con el paraformaldehído) utilizando el cilindro de vidrio se enjuaga con el agua estéril. Use agua destilada estéril para todas las soluciones antes del tratamiento con RNasa. Para medir volúmenes menores a 50 µl. Los volúmenes son suficientes para dos estantes de portaobjetos. Ponga las soluciones:

- **Histoclear 1 y 2**
- **100% de etanol y 2**

**Tabla 17 Soluciones para tratamiento previo del tejido.**

	<b><u>100%</u> <u>de</u> <u>etanol</u></b>	<b><u>8,5% de</u> <u>solución</u> <u>salina</u></b>	<b><u>H2O</u></b>
- 95% de etanol ( <b>300 ml</b> ):	285 ml	30 ml	15 ml
- 85% de etanol, 0,85% de solución salina( <b>300 ml</b> ):	255 ml	30 ml	15 ml
- 50% de etanol, 0,85% de solución salina ( <b>300 ml</b> ):	150 ml	30 ml	120 ml
- 30% de etanol, 0,85% de solución salina ( <b>300 ml</b> ):	90 ml	30 ml	180
- 0,85% de solución salina ( <b>300 ml</b> ):	-	30 ml	270 ml

- **PBS y 2** (300 ml cada uno):
  - 10 XPBS 2x 30ml
  - H<sub>2</sub>O 2x 270 ml
- **Pronasa 0,125 mg / ml** en buffer pronasa (300 ml):
  - 20x buffer Pronasa 15 ml
  - H<sub>2</sub>O 2x 284ml
  - Pronasa de stock 40 mg / ml (frío) 1 ml
- **Glicina 0,2%** en PBS (300 ml)
  - 10x PBS 30ml
  - H<sub>2</sub>O 264ml
  - Glicina de almacén 10% (frío) 6ml

- **4% de para formaldehído** en PBS (300 ml):
 

10x PBS	30ml
H <sub>2</sub> O	270 ml
Paraformaldehído	12g
- **Anhídrido acético** en 0,1 M de trietanolamina pH 8 (600 ml):
 

trietanolamina 2M	30ml
H <sub>2</sub> O	570ml
anhídrido acético	3 ml

2. Coloque los portaobjetos en placas de acero inoxidable y pase por las soluciones:

<b>Campa de extracción</b>	Histoclear 1	10'
<b>Cubierta</b>	Histoclear 2	10'
	100% de etanol 1	1'
	100% de etanol 2	30 "
	95% de etanol	30 "
	85% de etanol, 0,85% de solución salina	30 "
	50% de etanol, 0,85% de solución salina	30 "
	30% de etanol, 0,85% de solución salina	30 "
	0,85% de solución salina	2'
	PBS 1	2'
	Pronasa	10'
	Glicina	2'
	PBS 1	2'
<b>Campa de extracción</b>	Paraformaldehído	10'
<b>Cubierta</b>	PBS 1	2'

	PBS 2	2'
<b>Campa de extracción</b>	Anhídrido acético	10'
<b>Cubierta</b>	PBS 2	2'
	0,85% de solución salina	2'

3. Deshidratar el tejido a través de lavados con etanol (30% hasta el 100%).

### **A.3 Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* (DH5α)**

- 1 Se descongelarán las células (50 µL) por 5 min en hielo.
- 2 Se centrifugará el producto de ligación brevemente
- 3 Se adicionarán 2 µL de producto de ligación a la alícuota de células, se mezclará suavemente.
- 4 Posteriormente se incubará el tubo en hielo por 30 min.
- 5 Concluidos los 30 min se realizará el choque térmico a 42 °C durante 45 seg en termoblock.
- 6 Se incubará nuevamente el tubo en hielo durante 2 min.
- 7 Se adicionarán 250 µL de medio SOC a 4 °C
- 8 Se incubarán en agitación (250 rpm) a 37 °C durante 1 h.
- 9 Antes de cumplirse el tiempo de incubación se añadirán los reactivos de selección a cajas Petri con agar LB y ampicilina (concentración final de 50 µg/mL), se esparcirán con una varilla de vidrio, 12.5 µL de IPTG (100 mM) y 10 µL de X-gal por toda la superficie del agar y se incubará la caja durante 30 min a 37 °C.
- 10 Se sembrarán las células en la caja Petri suavemente para evitar daño celular y se incubarán durante 16 h a 37 °C.
- 11 Se observará el crecimiento de colonias blancas y azules, siendo las blancas las de interés.

#### **A.4 Extracción de ADN plasmídico**

Una vez que se haya picado aquellas colonias de color blanco se deja incubando en tubos Falcon en caldo LB durante 16 h. Una vez que se observe crecimiento o densidad celular se llevara a cabo la extracción de ADN plasmídico.

1. Se etiquetarán tubos Eppendorf de manera que permita identificar cada colonia y su respectivo tubo Falcon.
2. Bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar se vaciarán 1.5 mL de cultivo de los tubos Falcon a los tubos Eppendorf y se centrifugará a 13 000 rpm durante 5 min. Se desechará el sobrenadante y se rellenarán los tubos con cultivo, repitiéndose este paso 3 veces en total.
3. Se adicionarán 250  $\mu$ L de solución de suspensión P1 a la pastilla y se agitarán en Vortex hasta homogeneidad.
4. Se adicionará 250  $\mu$ L de solución de lisis P2, se mezclará por inversión 5 veces e incubará a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Se añadirán 350  $\mu$ L de solución de neutralización P3, se mezclarán los tubos por inversión 5 veces y se incubarán por 5 min.
6. Se centrifugarán los tubos a 13 000 rpm durante 15 min y se transferirán 750  $\mu$ L aproximadamente del sobrenadante a un tubo nuevo y estéril con ayuda de una micropipeta para evitar contaminación con la proteína precipitada.
7. Se agregará a cada tubo una cantidad de isopropanol igual al sobrenadante recuperado, se homogenizarán por inversión e incubarán a temperatura ambiente durante 15 min.
8. Se centrifugarán a 13 000 rpm por 15 min
9. Se retirará el sobrenadante y se agregarán 500  $\mu$ L de etanol al 70 %. Se homogenizará la pastilla por medio de vortex y se centrifugarán a 13 000 rpm durante 5 min.
10. Se descartará el sobrenadante y se secarán las pastillas a temperatura ambiente colocando los tubos de manera un poco inclinados por 1 h.
11. A cada tubo se agregarán 20  $\mu$ L de agua destilada estéril.
12. Se comprobarán las extracciones mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % y se almacenará el ADN restante a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **A.5 Transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de infiltración floral.**

La clona de *A. thumefaciens* que contiene la construcción, se pone a crecer en 50 mL de LB adicionado con los siguientes antibióticos Rifampicina (50mg /mL), Streptomina (100 mg/mL) y el antibiótico de la construcción Kanamicina (50 mg/mL) a una temperatura de 28°C y 250 rpm durante 24 h. Este cultivo se utilizó para inocular 500 mL de medio LB adicionando con los mismos antibióticos de sección, se incubó a 28°C y 250 rpm durante 24 h. Una vez pasado este tiempo el cultivo se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min con la finalidad de obtener la pastilla celular. La pastilla obtenida se resuspende en 500 mL de medio de infiltración, cuya composición es la siguiente:

Sales MS 2.2 g/L

Sacarosa 5% (p/v)

Silwete 77 0.02% (v/v)

Preparado el medio de infiltración, se sumergen las plantas de *A. thaliana* que ya presenten botones teniendo cuidado de que el medio tenga constante agitación. Las plantas permanecen sumergidas durante 1 min y posteriormente se colocan en una posición horizontal. Las plantas se cubren con una bolsa de plástico y se colocan alejadas de la luz por 24 h. Al día siguiente las plantas se colocan en posición vertical, se les retira la bolsa y se colocan en la cámara de crecimiento a una temperatura de 22°C y en fotoperiodo 12 h luz y 12 h oscuridad. Las plantas se riegan con agua destilada estéril.