

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

**Silenciamiento del gen que codifica para la
fosfolipasa C (PLC) en *Coffea arabica* L
mediante ARN de interferencia.**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en ciencias
presenta:**

Wilberth Alfredo Poot Poot

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

**Mérida Yucatán, México
2010**



Declaración de propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., y que dicha información le pertenece en los términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



Wilberth Alfredo Poot Poot

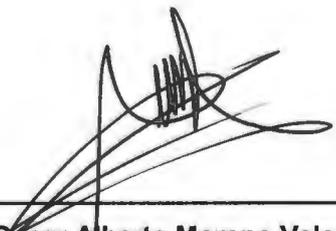
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **Silenciamiento del gen que codifica para la fosfolipasa C (PLC) en *Coffea arabica* L mediante ARN de interferencia** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (los) Dr. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor y César De los Santos Briones, dentro de la opción Biología Experimental, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela
Director Académico

AGRADECIMIENTOS

Agradezco particularmente a los Drs. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor y César de los Santos Briones por sus enseñanzas durante mi formación y al financiamiento recibido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a los proyectos C45798-Z y 98352, así como el apoyo económico recibido a través de la beca N° 157993 otorgada para la realización de esta tesis.

A la Dra. Karla Acosta Viana por facilitarnos las instalaciones del laboratorio para realizar parte del trabajo experimental de esta tesis.

Agradezco al M.C Armando Muñoz Sanchez por sus sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

Al comité tutorial por la revisión crítica de la tesis con la que enriquecieron el contenido de este trabajo.

A los compañeros de laboratorio Abril, Leticia, Fausto, Efraín, Betty, Arelly, Yahaira, Eduardo, César y Fernando por sus enseñanzas, sugerencias y momentos de diversión.

.....Y a ti Dios por permitirme estar aquí.

DEDICATORIA

A mis padres

Jerónimo y Rita Emiliana

A mis Hermanos

María Dionicia, Fátima Lorell y Marcelino

A mi esposa e hijos

Dianet del Rosario
Jade Siloé
César Alfredo

CONTENIDO

El presente informe tiene como objetivo principal presentar los resultados de la investigación realizada en el marco del proyecto de tesis titulado "Análisis de la percepción de los docentes sobre el uso de las tecnologías de la información y las comunicaciones en el aula". El estudio se desarrolló en el marco del programa de maestría en educación, específicamente en el área de pedagogía, de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

A lo largo de este documento se detallan los objetivos de la investigación, el marco teórico, el método de investigación, los resultados obtenidos y las conclusiones finales. Se espera que este informe sea de utilidad para los docentes y investigadores interesados en el tema.

El presente informe está estructurado de la siguiente manera: el primer capítulo presenta el contexto de la investigación, el segundo capítulo el marco teórico, el tercer capítulo el método de investigación, el cuarto capítulo los resultados y el quinto capítulo las conclusiones.

En conclusión, este estudio contribuye al conocimiento sobre la percepción de los docentes sobre el uso de las tecnologías de la información y las comunicaciones en el aula, lo que puede ser útil para diseñar estrategias de formación y apoyo pedagógico.

Finalmente, se agradece a los docentes que participaron en esta investigación por su colaboración y apoyo. Asimismo, se agradece a la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa por permitir el desarrollo de esta investigación.

.....

CONTENIDO

A mi familia

A mi familia y a todos los que me rodean

A mi familia

A mi familia y a todos los que me rodean

A mi familia

A mi familia y a todos los que me rodean

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xi	
ABSTRACT	xiii	
INTRODUCCIÓN	1	
CAPÍTULO I		
1.1	DESCUBRIMIENTO DEL ARN DE SILENCIAMIENTO	3
1.2	ETAPAS Y COMPONENTES DEL MECANISMO DE SILENCIAMIENTO POR ARNi	5
1.3	COMPONENTES DEL COMPLEJO EFECTOR DENOMINADO RISC	8
1.4	ARNs PEQUEÑOS EN PLANTAS	9
1.5	ARN DE INTERFERENCIA EN VIRUS	19
1.6	IMPORTANCIA DEL ARN DE INTERFERENCIA	22
1.7	FORMAS DE HACER ARN DE INTERFERENCIA	23
1.8	OBJETIVO GENERAL	27
1.9	OBJETIVOS PARTICULARES	27
1.10	JUSTIFICACIÓN	28
1.11	HIPÓTESIS	29
1.12	REFERENCIAS	30
CAPÍTULO II		
2.1	INTRODUCCIÓN	39
2.2	COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR	40
2.3	SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS DE MEMBRANAS	41
2.4	FOSFOLIPASAS	45

2.5	FOSFOLIPASAS C ESPECÍFICAS PARA FOSFOINOSÍTIDOS (PI-PLC)	46
2.6	GENES QUE CODIFICAN PARA PLC DE PLANTAS	48
2.7	FUNCIÓN DE LAS FOSFOLIPASAS C	50
2.8	REFERENCIAS	55
CAPÍTULO III		
3.1	INTRODUCCIÓN	61
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.2.1	Amplificación del dominio catalítico de la PLC	62
3.2.2	Vector de entrada (pENTR /D-TOPO)	64
3.2.3	Replicación y purificación del vector destino	65
3.2.4	Obtención del constructo de silenciamiento pTDT-ARNi-PLC mediante recombinación	66
3.2.5	Obtención y análisis de las clonas que contienen el fragmento de la PLC en sentido y antisentido	67
3.2.6	Secuenciación del fragmento clonado	68
3.2.7	Condiciones de cultivo de las suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L.	68
3.2.8	Obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares	69
3.2.9	Evaluación de la concentración de polietilenglicol (PEG) sobre la viabilidad de los protoplastos	70
3.2.10	Evaluación de la viabilidad de los protoplastos	70
3.2.11	Extracción de ARN para amplificar a la PLC y a la tubulina	71
3.2.12	RT-PCR	71
3.2.13	Transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG) 3,350	72
		73
3.3	RESULTADOS	
3.3.1	Amplificación del fragmento a clonar a partir del dominio catalítico de la PLC	73
3.3.2	Construcción del vector de entrada	74
3.3.3	Recombinación y construcción del vector para ARNi	75
3.3.4	Secuenciación del fragmento clonado	77
3.3.5	Obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares	78
3.3.6	Evaluación de la viabilidad de los protoplastos	79

3.3.7	Evaluación de la concentración de PEG sobre la viabilidad de los protoplastos	80
3.3.8	Extracción de ARN a partir de protoplastos	83
3.3.9	Transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG) 3,350	84
3.4	DISCUSIÓN	88
3.5	CONCLUSIONES	95
3.6	PERSPECTIVAS	97
3.7	REFERENCIAS	98
	APÉNDICE 1	103

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Ruta general de ARN de silenciamiento.	6
Figura 1.2. Organización general de los dominios en la ARNsa tipo III.	6
Figura 1.3. Organización general de los dominios en las proteínas argonautas.	7
Figura 1.4. Ruta de biogénesis de microARNs en animales y plantas.	11
Figura 1.5. Rutas de biogénesis de los microARNs.	12
Figura 1.6. Biogénesis de los ta-siARNs.	15
Figura 1.7. Componentes y biogénesis de los nat-siARNs en plantas.	17
Figura 1.8. Estructura general de los 21 U-ARNs.	19
Figura 1.9. Modelo esquemático del ARN de interferencia utilizando siARN sintéticos.	24
Figura 1.10. Estructuras de las moléculas de ARN hebras utilizadas para ARN de interferencia.	25

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Intermediarios de la ruta de fosfoinosítidos en plantas.	44
Figura 2.2. Sitio de hidrólisis del fosfolípido fosfatidilcolina (PC) por las enzimas PLD, PLC, PLA y PLB.	45
Figura 2.3. Dominios presentes en las fosfolipasas C de mamíferos y de plantas.	47
Figura 2.4. Efecto del aluminio en la transducción de señales mediada por fosfoinosítidos.	52
Figura 2.5. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos que forman el dominio catalítico X e Y de las PI-PLC de plantas.	54

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Clonación del dominio catalítico de la PLC de <i>C. arabica</i> , amplificación y clonación del fragmento de 281 pb.	63
Figura 3.2. Construcción del vector de entrada pENTR / D TOPO.	65
Figura 3.3. Mapa del vector destino pTDT-ARNi.	66
Figura 3.4. Construcción del vector pTDT-ARNi-PLC por recombinación.	67
Figura 3.5. Análisis de la orientación del fragmento de la PLC en clonas de <i>E. coli</i> .	68
Figura 3.6. PCR de gradiente para la amplificación del fragmento de 281pb de la PLC en gel de agarosa al 2%.	73
Figura 3.7. Construcción del vector de entrada.	75
Figura 3.8. Análisis de la orientación del fragmento en las clonas obtenidas de la recombinación en gel de agarosa al 1%.	76
Figura 3.9. Secuenciación y análisis del fragmento clonado de la PLC en el vector destino.	77
Figura 3.10. Células en suspensión de <i>C. arabica</i> y protoplastos observados al microscopio.	79
Figura 3.11. Viabilidad de protoplastos con diacetato de fluoresceína.	80
Figura 3.12. Tratamiento de protoplastos de 16 días del ciclo de cultivo de <i>C. arabica</i> con diferentes concentraciones de PEG.	82
Figura 3.13. Efecto de la velocidad de centrifugación sobre el número de protoplastos de <i>C. arabica</i> .	83
Figura 3. 14. Amplificación de la fosfolipasa C y de la tubulina a partir de ARN extraído de protoplastos de <i>C. arabica</i> .	84
Figura 3.15. Transformación de protoplastos con el constructo pTDT-ARNi-PLC por el método de PEG.	86
Figura 3.16. Silenciamiento de la PLC en protoplastos de <i>C. arabica</i> .	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Composición lipídica de diferentes membranas de 41
varias especies y tejidos.

Cuadro 3.1 Cebadores utilizados para la amplificación y clonación 64
del fragmento de 281 pb en pENTR.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
ARNm	ARN mensajero
siARN	Short-interfering ARN
dsARN	Double strand ARN
RISC	ARN induced silencing complex
DUF	Domain unknown function
RBD	ARN Binding Domain
AGO	Argonauta
PAZ	Piwi argonaute and zwiille
PIWI	P element-induced wimpy
RDRs	ARN-dependent ARN polymerase
HEN1	Hua enhancer 1
ta-siARN	Trans-acting siARN
nat-siARN	Natural antisense ARN
miARN	microARN
MIR	Genes MIR
UTR	Nontranslated sequence
pri-miARN	pri-miARN
pre-miARN	pre-miARN
HYL1	Hyponastic leave 1
TAS	Genes TAS
SGS3	Suppressor of gene silencing 3
rasi-ARN	Repeat-associated short interfering ARNs
scan ARN	scan ARN
lsiARN	Long siARN
21-U ARN	21-U ARN
piARN	Piwi-interacting ARNs
ToMV	Tomato mosaic virus
Hc-Pro	Potyvirus helper component proteinasa
VIGS	Virus induced gene silencing
PDS	Fitoeno desaturasa
Ch1I	Complejo magnesio quelatasa
ARNi	ARN de interferencia
shARN	Short hairpin
ACC oxidasa	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa

RESUMEN

El conocimiento de la función de cada uno de los componentes celulares es de importancia para poder entender y manipular cualquier célula o tejido. Por lo tanto, la transducción de señales mediada por las fosfolipasas es de interés debido a que la membrana plasmática es la barrera selectiva y el sitio de localización de proteínas y lípidos entre otros. La vía de señalización basada en fosfoinosítidos está localizada en las membranas y participa en diferentes procesos tales como los diferentes tipos de estrés entre los que se encuentran sequía, salinidad, ataque por patógenos y los metales. La fosfolipasa C (PLC) es una enzima que participa en esta vía de fosfoinosítidos produciendo dos segundos mensajeros de gran importancia celular. Es por esto, estamos interesados en desarrollar un protocolo de transformación y silenciamiento de la PLC utilizando protoplastos de *C. arabica* obtenidos a partir de suspensiones celulares.

En nuestro trabajo logramos observar que el uso de polietilenglicol (PEG) en una concentración al 20% permitió distinguir un mayor número de protoplastos transformados a pesar que esta concentración redujo la viabilidad. Así mismo, se pudo observar que la velocidad de centrifugación adecuada para recuperar los protoplastos después de la transformación fue de 70 x g por 6 minutos. Por otra parte, también otro de los factores de importancia fue el medio de cultivo, nosotros evaluamos los medios W5 y MMG en los que los protoplastos de *C. arabica* no lograron mantenerse viables por largo tiempo. Sin embargo, se logró cultivar a los protoplastos por más de dos semanas en el medio de aislamiento de protoplastos después de transformados.

En el experimento de silenciamiento por ARNi el tamaño del fragmento de 281 pb tomado del dominio catalítico de la PLC demostró tener la capacidad para inducir silenciamiento. Nuestros resultados indican que existe un

mayor grado de silenciamiento a las 48 horas posterior a la transformación al analizar la reducción del transcrito de la PLC. Sin embargo, fue posible observar que existe una reducción en el nivel del transcrito durante todos los tiempos con los niveles de expresión de los protoplastos testigo. Debido a esto consideramos que la obtención, transformación y silenciamiento en protoplastos de *C. arabica* constituye una buena herramienta biotecnológica para evaluar la función de uno o más genes.

ABSTRACT

Phospholipase C (PLC) is a key enzyme involved in the signaling pathway mediated by phosphoinositide second messengers. Due to this unique role of phospholipase C, we are interested in developing a transformation protocol to silence PLC using protoplasts isolated from *Coffea arabica*. In our work we found that the use of polyethylene glycol (PEG) at a concentration of 20% generated a large number of transformed protoplasts, although this concentration reduced viability. Also, we found that the centrifugation speed needed to recover the protoplasts after transformation was 70 x g. Another factor of importance to generate protoplasts was the culture medium; therefore, we evaluated both W5 and GMM media and found that protoplasts from *C. arabica* failed to remain viable for long in either medium. However, we were able to culture the protoplasts for more than two weeks in the protoplast isolation medium after processing. In addition, a fragment of 281 nucleotides taken from the catalytic domain of PLC was shown to be sufficient to induce silencing of PLC by RNAi. By measuring the levels of the PLC transcript, we found that there is a greater degree of silencing 48 hours after the transformation. However, it is possible to note a reduction in the level of the transcript at all evaluation times when compared to the levels of expression in the control protoplasts. Our results show that the silencing process in protoplasts from *C. arabica* is a good biotechnological tool to evaluate the function of genes.

INTRODUCCIÓN

Las células vegetales al igual que las animales presentan mecanismos celulares que les permiten actuar inmediatamente ante cambios que ocurren a su alrededor. Se ha observado que las plantas responden de manera diferente a cada uno de los estímulos ambientales. Los mecanismos de defensa pueden clasificarse en pasivos o activos. En el primer caso se incluyen las barreras estructurales como cutícula, compuestos antimicrobianos, el segundo caso ocurre como resultado de un ataque por patógeno. En este caso la planta para protegerse puede desencadenar una muerte celular programada o una resistencia sistémica adquirida. Otra barrera importante es la constituida por la membrana plasmática, la cual además de cumplir con esta función sirve de depósito de fosfolípidos y sitio de reacción para muchas enzimas. La fosfolipasa C (PLC) es una enzima que se ha visto que esta involucrada en diferentes respuestas a cambios ambientales en las plantas. Se ha mencionado que la PLC tiene una participación en la división celular, en sequía, en ataque por patógeno, en el crecimiento del tubo polínico y en la reducción del crecimiento radicular en presencia de iones metálicos es por esto que esta enzima es de importancia en la vía de transducción de señales mediadas por fosfoinosítidos.

Por otra parte, el ARN de interferencia es un mecanismo utilizado en experimentos de regulación postranscripcional donde se desea evaluar la función de un gen. Este mecanismo se ha observado que es desencadenado por moléculas de ARN de doble cadena que posteriormente serán degradados a pequeños siARN. Estas últimas moléculas y junto con el complejo RISC realizan el corte y degradación de ARN mensajero (ARNm). Sin embargo, este mecanismo puede estudiarse en la planta completa o utilizar células vegetales sin pared. Actualmente el uso de protoplastos como modelos celulares para el silenciamiento de genes ha

aumentado grandemente, como resultado del corto tiempo en que se puede evaluar la función del gen en estudio. Por lo tanto, en este trabajo para el silenciamiento de la fosfolipasa C (PLC), se diseñó un vector plasmídico que contiene un fragmento de 281 pb de longitud de la PLC para realizar la transformación de los protoplastos de *C. arabica* obtenidos a partir de células en suspensión.

CAPÍTULO I

ARN de interferencia

1.1 DESCUBRIMIENTO DEL ARN DE SILENCIAMIENTO

La regulación epigenética de la expresión de genes es un cambio heredable que no puede ser explicado por un cambio en la secuencia de genes. Sin embargo, esta puede dar como resultado la represión o activación de la expresión de genes y por lo tanto referirse como un silenciamiento de genes o una activación de los mismos. No obstante, hace mucho tiempo se pensaba que la regulación ocurría solamente a nivel de ADN y de proteína y que el ARN únicamente funcionaba como un conector entre el ADN y la proteína. No fue hasta los años 90 que se descubrió que la regulación de los genes puede llevarse a cabo por pequeñas moléculas de ARN; este proceso fue observado en plantas, hongos, animales y ciliados. Así mismo, este proceso ocurría después de la transcripción, lo que permitió la introducción del término silenciamiento post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) o silenciamiento por ARNi (Matzke *et al.*, 2001). El silenciamiento post-transcripcional consiste en la degradación específica de una población de ARNs homólogos. Esto fue inicialmente observado después de la introducción de una copia extra (transgen) de un gen endógeno dentro de una planta (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol, 1990); en estos experimentos se pudo observar que tanto los ARNs producidos por el gen endógeno como los del transgen fueron degradados y este fenómeno fue nombrado como co-supresión. Tiempo después, este proceso fue observado en el hongo *Neurospora crassa* y recibió el nombre de "quelling" (Cogoni *et al.*, 1996; Romano y Macino, 2006).

El silenciamiento post-transcripcional reduce la acumulación de ARNm en el citoplasma pero sin afectar la transcripción. Los análisis detallados del

contenido de ARN en plantas que presentan silenciamiento post-transcripcional han revelado la presencia de productos intermediarios de la degradación del ARN blanco. Durante el silenciamiento del gen de la glucanasa se encontraron intermediarios de degradación de ARN de mayor tamaño así como de menor tamaño, los ARN de mayor tamaño surgen a partir de un procesado aberrante, mientras que los pequeños ARN corresponden a los subfragmentos del ARNm blanco, lo que sugiere que ocurre un corte inicial tipo endonucleolítico en el ARN seguido de un corte exonucleolítico (van Eldik *et al.*, 1998).

Por otra parte, el silenciamiento de los genes que codifican para la chalcona sintasa permitió observar la presencia de regiones internas complementarias por apareamiento de bases en estos genes, lo que originó la formación de estructuras de ARN de doble cadena y por consiguiente la degradación del ARN blanco (Metzlaff *et al.*, 1997). En trabajos sobre silenciamiento por ARNi se ha observado la acumulación de pequeñas moléculas de ARN de 20 a 25 nt (siARN) en sentido y antisentido; esta presencia sugirió que primero ocurre la formación de dsARN (ARN de doble cadena) y luego la degradación del ARN (Hamilton y Baulcombe, 1999). Sin embargo, la pregunta era ¿cómo se llevaba a cabo la formación de estas estructuras de doble cadena?. Lo que se pudo observar en estos trabajos fue que la presencia de ARN polimerasas era necesaria para que ocurriera el silenciamiento (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000). Estudios de silenciamiento en *Drosophila* revelaron que los pequeños siARN aparecieron a partir del ARN de doble cadena inyectado, el cual sirvió para la degradación de moléculas de ARN homólogos (Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000).

1.2 ETAPAS Y COMPONENTES DEL MECANISMO DE SILENCIAMIENTO POR ARNi

El silenciamiento por ARNi es un mecanismo altamente conservado entre los organismos eucarióticos. Sin embargo, existen diferencias en las distintas vías, lo que permite suponer que presentan especificidad y diversificación en las rutas entre los distintos reinos. Esta diversificación es observada principalmente en el reino vegetal (Baulcombe, 2004; Xie *et al.*, 2005).

Basado en los antecedentes de los trabajos sobre silenciamiento por ARNi se ha podido, de manera general, dividir en dos etapas este mecanismo de degradación de ARN de secuencia específica (figura 1.1) e identificar algunos de los genes involucrados en las diferentes etapas. En la primera etapa, se requiere como requisito la formación de ARN de doble cadena (dsARN), mientras que en la segunda, el dsARN es degradado por una ARNasa denominada Dicer que produce siARNs de doble cadena de 21 a 25 nucleótidos de longitud que finalmente se unen al complejo de silenciamiento (RISC, "RNA induced silencing complex") para iniciar con el corte y degradación del ARN mensajero blanco mediante un mecanismo dependiente de la secuencia complementaria al siARN (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hannon, 2002; Hutvagner y Zamore, 2002; Matzke *et al.*, 2001).

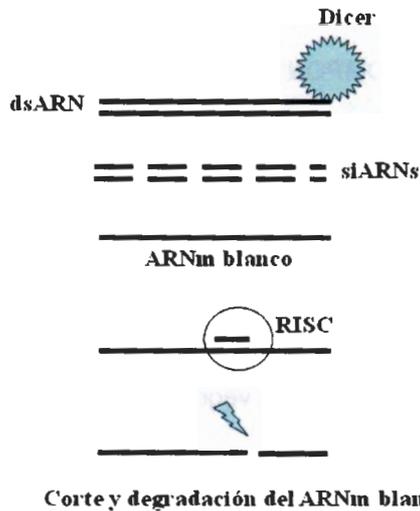


Figura 1.1. Ruta general de ARN de silenciamiento (Modificado de Agrawal *et al.*, 2003)

A través de estudios bioquímicos, genéticos y el uso de mutantes defectuosos en el silenciamiento de genes, se han podido descubrir los componentes moleculares esenciales y comunes en los procesos silenciamiento por ARNi. Entre estos se encuentran genes que codifican para las proteínas ARNsas tipo III (Dicer en animales y “Dicer-like” en plantas) que pertenecen a una familia de genes y degradan ARN de doble cadena (dsARN) para producir siARNs y por lo tanto iniciar el mecanismo de silenciamiento por ARNi.

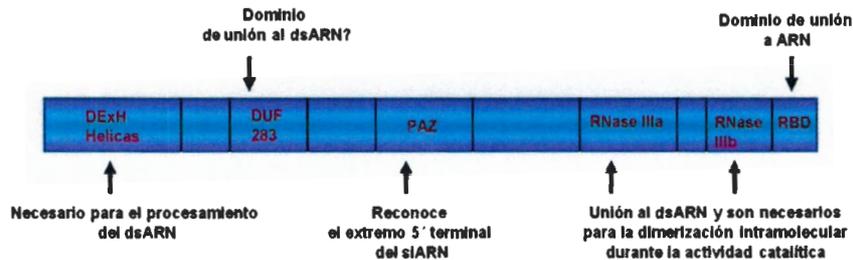


Figura 1.2. Organización general de los dominios en la ARNasa tipo III (Tomado de Naqvi *et al.*, 2009).

Estas ARNsas se caracterizan por contar con seis dominios distintos (figura 1.2): el dominio DExH helicasa amino terminal, el DUF 283, dos dominios ARNsas tipo III a y b, el dominio RBD de unión a ARN de doble cadena (dsARN) y el dominio PAZ que se une a los dos nucleótidos salientes del extremo 3' del ARN utilizado como sustrato. Así mismo, se ha observado que las ARNsas tipo III actúan como un dímero y digieren al dsARN con la ayuda de sus dos centros catalíticos compuestos (Agrawal *et al.*, 2003). En *Arabidopsis thaliana* y arroz se han identificado hasta el momento cuatro y seis enzimas Dicer respectivamente (Baulcombe, 2004; Xie *et al.*, 2005).

Otro de los componentes moleculares identificados en el silenciamiento de genes son las proteínas Argonautas (AGO) las cuales pertenecen a una familia de genes; en *Drosophila melanogaster* se conocen dos, en humanos cuatro y en *Arabidopsis thaliana* se conocen 10. Estas moléculas se asocian con los siARNs y los microARNs de manera específica (Sijen *et al.*, 2007). Las moléculas ARGONAUTAS se distinguen porque cuentan con tres dominios bien caracterizados (figura 1.3); un dominio PAZ en el extremo N-terminal y un dominio PIWI en el extremo C-terminal que se ha sugerido que interacciona con el dominio presente en Dicer y un dominio MID que reconoce los nucleótidos salientes del extremo 3' en el siARN (Carmichael *et al.*, 2004; Naqvi *et al.*, 2009).

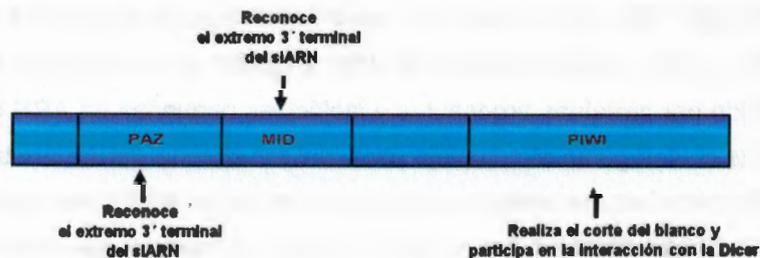


Figura 1.3. Organización general de los dominios en las proteínas argonautas (Tomado de Naqvi *et al.*, 2009).

Las ARNs polimerasas dependientes de ARN de cadena sencilla (RDRs) son otra clase de moléculas que participan en el silenciamiento. En *A. thaliana* se conocen seis proteínas, las cuales están involucradas en la diseminación del silenciamiento mediante la generación de siARNs secundarios. En principio se pensaba que las RDRs se encontraban solamente en las plantas (Dalmay *et al.*, 2000). Sin embargo, este tipo de polimerasa también se ha identificado en hongos y en *C. elegans* (Naqvi *et al.*, 2009). Así mismo, se han identificado proteínas con capacidad de adicionar grupos metilo a los siARNs como HEN1 (HUA ENHANCER1); otro tipo de ARN polimerasas identificadas son las ARN polimerasas nucleares IV y V, las cuales participan silenciando genes a través de la modificación de la heterocromatina (Pontes *et al.*, 2009) y finalmente el complejo efector de la ribonucleoproteína RISC (Sunkar *et al.*, 2007).

1.3 COMPONENTES DEL COMPLEJO EFECTOR DENOMINADO RISC

El mecanismo de ARN de interferencia inicia con el procesado de la doble cadena de ARN (dsARN) para dar lugar a la formación de pequeños ARNs (microARNs o siARNs) mediante la actividad de una ARNasa tipo III llamada Dicer (Meister y Tuschl, 2004). RISC es un complejo formado por proteínas y pequeños ARNs el cual es necesario para degradar ARN mensajero blanco o para reprimir la traducción hasta proteína. Se han realizado estudios para determinar cuales son los componentes moleculares de este complejo y los primeros resultados han arrojado que el complejo esta constituido por proteínas argonautas y moléculas pequeñas de ARN de 19-30 nt, las cuales guían al complejo para realizar el corte del ARNm blanco. Otros estudios han mencionado que además de las proteínas argonautas, el complejo puede contener helicasas, nucleasas y proteínas que unen ARN (Meister y Tuschl, 2004). MacRae y colaboradores (2008), demostraron

mediante experimentos *in vitro* que en humanos los componentes moleculares del complejo RISC eran nuevamente proteínas del tipo argonauta y una molécula pequeña de ARN que puede ser un microARN o un siARN. En este mismo trabajo se demostró que para el ensamble del complejo no se requiere ningún cofactor y tampoco una proteína chaperona y que la unión de la proteína argonauta al pequeño ARN facilita la separación del resto de las proteínas.

Por otra parte, un paso esencial para la formación de RISC es la separación de la doble hebra de siARN y la retención de la guía. También se ha mencionado que RISC es capaz de pasar por etapas intermedias hasta formar el complejo final (MacRae *et al.*, 2008). Kim y colaboradores (2007), demostraron que en la vía de ARN de interferencia de *Drosophila* existen dos formas del complejo RISC, pre-RISC y holo-RISC. El complejo holo-RISC está formado por la hebra guía unida a la proteína argonauta; por su parte, en el complejo pre-RISC la proteína argonauta se mantiene unida a la molécula de siARN de doble cadena y por lo tanto es considerada como un complejo intermediario. En este mismo trabajo se demostró, mediante experimentos *in vivo*, que es necesaria la eliminación de la hebra pasajera para mantener la actividad de corte de la proteína argonauta 2 (Ago 2) y por consiguiente una alta actividad de RISC.

1.4 ARNs PEQUEÑOS EN PLANTAS

Los pequeños ARNs son componentes importantes en la regulación de la expresión genética y su presencia en la mayoría de los genomas eucarióticos les ha permitido participar en la regulación génica en diversos procesos celulares, ya sea degradando el ARN mensajero o inhibiendo la traducción a proteína.

En *A. thaliana*, los pequeños ARNs de 21 a 24 nucleótidos (nt) de longitud funcionan tanto a nivel transcripcional, mediante la metilación del ADN, así como a nivel post- transcripcional, a través de la degradación del ARN mensajero blanco. En plantas se han identificado los siguientes tipos de pequeños ARN: microARN (miARN), trans-acting siARN (ta-siARN), nat-siARN (natural antisense) y los siARN (Vaucheret, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

Los microARNs son pequeños ARNs endógenos que son producidos por genes *MIR* y regulan genes distintos a su locus de origen y por lo tanto, la regulación a través de estos pequeños ARN es referido como un heterosilenciamiento (Vaucheret, 2006).

Así mismo, los miARNs parecen ser procesados a partir de un precursor tipo tallo-asa con una complementariedad imperfecta en sus bases y cuyo tamaño es aproximadamente de 70 nt, mientras que el microARN maduro de 21 nt reprime la expresión del gen por unión al extremo 3'UTR del ARN mensajero blanco (Bartel, 2004). Luego del descubrimiento de los pequeños ARNs con capacidad regulatoria, varios grupos de investigación emprendieron la búsqueda de más moléculas similares; el éxito fue impresionante ya que fue posible obtener ARNs de 21 a 24 nt en varias especies, como gusanos, mariposas, ratones, humanos y plantas. A partir de este descubrimiento, los ARNs pequeños que presentaban característica a *lin-4* y *let-7*, dos de los primeros miARNs descubiertos, fueron colectivamente llamados microARNs, mientras que aquellos que no cubrían estos requisitos fueron denominados como siARNs y se asumió que surgían de moléculas de ARN de mayor tamaño. Las dos vías de biogénesis de pequeños ARNs (miARNs) en animales y plantas se esquematizan en la figura 1.4 (Vaucheret, 2006).

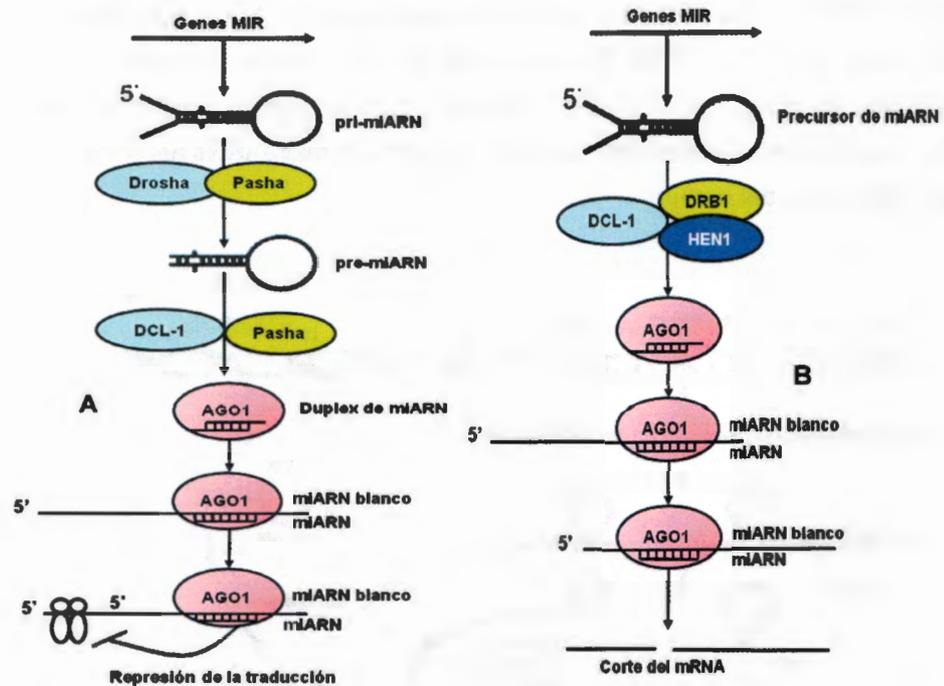


Figura 1.4. Ruta de biogénesis de microARNs en animales y plantas. A) Biogénesis en animales B) Biogénesis en plantas; AGO1, proteína Argonauta 1; Dcr-1, Pasha y DCL-1 enzimas que degradan ARN de doble cadena; HEN1 metilasa; DRB1 es una proteína que se une a ARN de doble cadena (Tomado de Vaucheret, 2006).

Aunque los microARNs de animales y plantas derivan de una estructura tipo tallo-asa con complementariedad imperfecta entre sus bases, su biogénesis presenta algunas diferencias. Los diferentes microARNs en animales a menudo son agrupados dentro de un precursor de ARN para transcribirse en forma policistrónica, mientras que los microARNs en plantas derivan de precursores individuales (Ambros, 2004; Bartel, 2004).

Además de la ruta de biogénesis canónica establecida para los microARNs donde se ha observado la participación de Drosha y Pasha, se ha determinado que en animales existe una ruta alternativa para la biogénesis de estos pequeños ARNs. En esta ruta, las secuencias intrónicas son capaces de generar microARNs llamados mirtrons. En la figura 1.5 se muestra tanto la ruta canónica para la biogénesis de microARNs así como la ruta alternativa del mirtron.

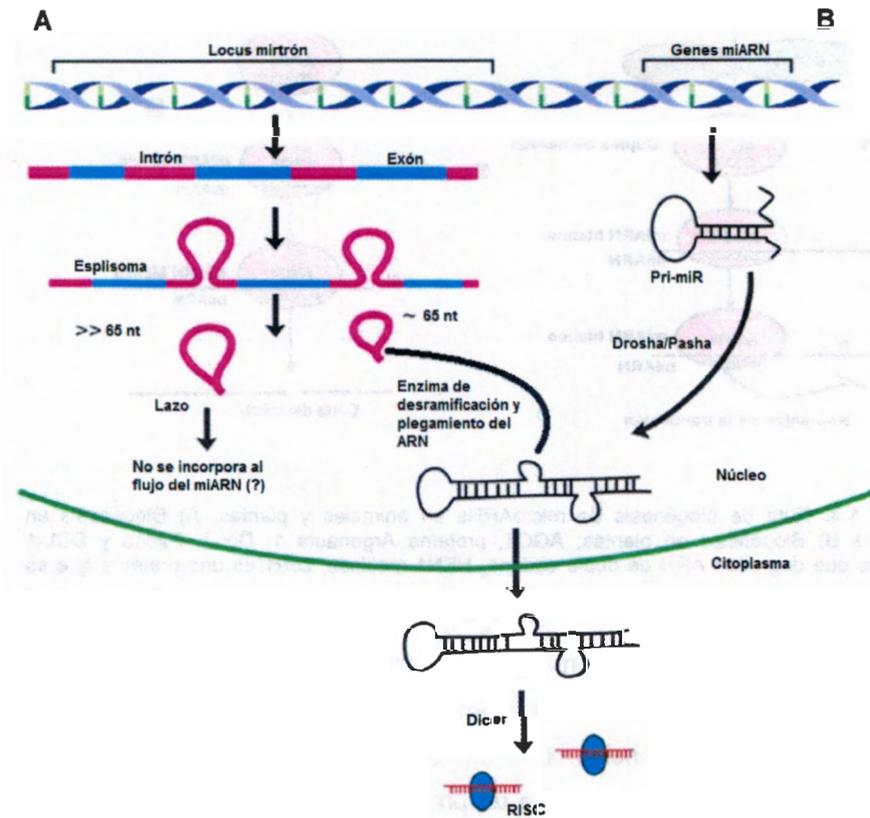


Figura 1.5. Rutas de biogénesis de los microARNs. A) Ruta canónica de biogénesis B) Ruta de los mirtrons para la biogénesis de microARNs (Tomado de Naqvi *et al.*, 2009).

La ruta de los mirtron se desvía de la ruta canónica de biogénesis de microARNs, debido a que no necesita de Drosha, que elimina el extremo del pri-mARN, para formar el pre-mARN. Por lo tanto el paso donde interviene Drosha se omite; entonces el complejo espiplómico se encarga de generar una estructura de ARN llamado lazo (Burge *et al.*, 1999; Krämer, 1996). Posteriormente, esta estructura de lazo será utilizada como sustrato por otra enzima denominada de-branching (Ooi *et al.*, 1998), la cual permite que la secuencia intrónica forme una estructura tallo-asa; una vez formada esta estructura el mirtron experimenta etapas similares a los de la ruta canónica para la biogénesis de microARN. En plantas y otros organismos no se ha demostrado su presencia, no obstante dado que los transcritos que dan lugar a los microARNs en plantas poseen secuencias intrónicas, es posible suponer la presencia de esta vía alternativa de los mirtron (Naqvi *et al.*, 2009).

Por otra parte, los microARNs son sintetizados en el núcleo como ARNs de aproximadamente 1000 nt. Los precursores de microARNs en animales (pri-miARN) adoptan estructuras tipo tallo-asa que en principio son cortados por la ARNasa tipo III denominada Drosha en cada brazo del tallo-asa para la liberación del pre-miARN (Zamore *et al.*, 2000). Este es posteriormente exportado al citoplasma por Exp 5 y cortado por la ARNasa tipo III llamada Dicer para liberar el asa y el duplex microARN/microARN que típicamente tiene dos nucleótidos salientes en los extremos 3' del duplex de igual manera que los siARN. Así mismo, se ha observado que tanto Drosha y Dicer son asistidas en el proceso de corte por proteínas que se unen de manera específica a ARN, Fasha y loquacious en *Drosophila* (Zamore *et al.*, 2000).

En plantas, la longitud de la estructura precursora del ARN tipo tallo-asa generalmente es de mayor que la de los animales y su procesamiento es realizado por DCL1. Esta ARNasa tipo III presenta tanto actividad Drosha

como Dicer y fue localizada en el núcleo (Kurihara y Watanabe, 2004; Park *et al.*, 2002). La DCL1 interactúa con HYL1 para hacer ambos cortes dentro del precursor de miARN para liberar el miARN/miARN duplex (Han *et al.*, 2004; Hiraguri *et al.*, 2005), entonces el miARN maduro es metilado por HEN1 como en los siARNs (Li y Ding, 2005; Yu y Kumar, 2003). La metilación probablemente protege a estos pequeños ARNs de la degradación y la poliuridinación; sin embargo, no se sabe si este proceso ocurre en otros reinos. Al igual que DCL1, HYL1 y HEN1 están localizadas en el núcleo, sugiriendo que el procesado del miARN es esencialmente nuclear (Park *et al.*, 2005).

Los miARN de animales y plantas, se asocian con una proteína Argonauta que forma parte del complejo ribonucleoproteína RISC (ARN-induced silencing complex); no obstante, la mayoría de los miARN en animales guían la represión de sus blancos seguido de una desestabilización del ARN mensajero (Bagga *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005), mientras que todos los miARNs probados en plantas guían el corte del ARN mensajero (ARNm) catalizado por la proteína Argonauta AGO1 (Kasschau *et al.*, 2003; Llave *et al.*, 2002).

A diferencia de los miARNs en animales, que solo muestran complementariedad limitada con su blanco en el extremo 5' del miARN, los miARNs en plantas muestran un alto grado de complementariedad con sus blanco así como lo hacen los siARN (Ambros, 2004; Kim, 2005).

Estudios en plantas han revelado que la gran mayoría de los pequeños ARN endógenos, cis-acting siARN de 24 nt de longitud, son procesados por DCL-3 a partir de la heterocromatina, los transposones y elementos repetidos (Xie *et al.*, 2004). Por su parte los miARNs que derivan de los genes MIR son procesados por DCL1, mientras que los trans-acting siARN son procesados por DCL-4 a partir de los genes *TAS* (Allen *et al.*, 2005;

Peragine *et al.*, 2004). Los genes *TAS* transcriben ARNs primarios de gran longitud que no codifican para proteínas y parece que su función es servir como precursores para la producción de los ta-siARNs (figura 1.6).

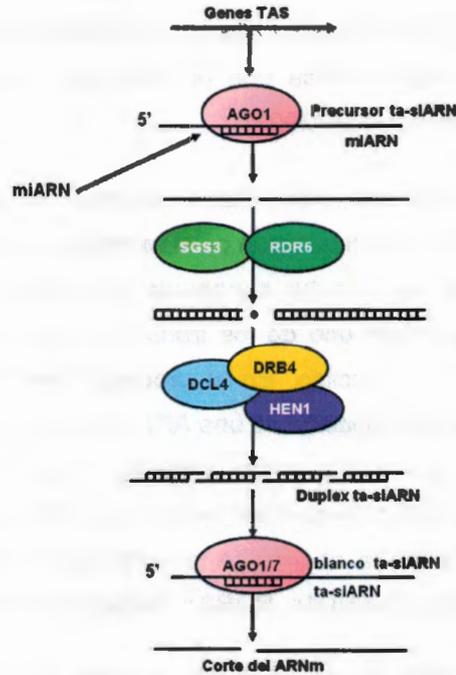


Figura 1.6. Biogénesis de los ta-siARNs (trans-acting siARNs). Estabilizador de ARN SGS3 (Supresor of gene silencing 3), ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6), ARNs III Dicer-like (DCL4), proteína de unión a dsARN (DRB4), ARN metilasa (HEN1), proteína Argonauta 1 (AGO1) (Tomado de Vaucheret, 2006).

El transcrito primario de *TAS* es cortado por un miARN, así la producción de ta-siARN requiere de las enzimas AGO1, DCL1, HEN1 y HYL1 (Allen *et al.*, 2005; Peragine *et al.*, 2004). La biogénesis de ta-siARN requiere de la actividad de SGS3 y RDR6, las cuales transforman una molécula de ARN de una hebra en una de doble hebra y posteriormente, esta doble hebra derivada a partir de RDR6, será procesada en ta-siARN de 21 nt por la DCL4, la cual se asocia con la proteína DRB4. Posteriormente estos siARN

se unen a su blanco para realizar el corte (Gascioli *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005). Al igual que los miARNs, los ta-siARNs son metilados por HEN1 y presentan un alto grado de complementariedad con sus blancos (Li y Ding, 2005); por otra parte se ha observado que algunos ta-siARNs pueden actuar en el núcleo sugerido por su alta complementariedad con el intrón de un pre-mARN, el cual codifica una proteína que contiene un dominio de unión a FAD (Vazquez *et al.*, 2004).

Finalmente, los cis-acting siARNs son una clase adicional de pequeños ARNs endógenos cuya función es la regulación de la expresión de genes en forma específica. En *A. thaliana*, se ha observado la interacción y el apareamiento entre dos transcritos; uno de los transcritos se expresa en forma constitutiva y el otro es inducible. En el procesamiento de estas moléculas, se ha detectado la participación de una ARNasa DCL2 (Borsani *et al.*, 2005). Cuando ambos transcritos están presentes, un nat-siARNs estable de 24 nt surge de la región de complementariedad correspondiente al gen inducido; así también se ha observado la participación de varias enzimas en su biogénesis (DCL2, NRPD1a, RDR6 y SGS3; figura 1.7).

Posteriormente, los nat-siARNs de 24 nt guían el corte del transcrito constitutivo y se establece una etapa para la producción secuencial de siARNs de 21 nt de longitud a través de la DCL1 y un corte posterior del transcrito constitutivo (Borsani *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Sin embargo, en un estudio realizado en plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino, la producción de nat-siARN de 21 nt no parece ser necesaria para controlar la expresión del transcrito constitutivo; esto fue comprobado a partir del resultado obtenido con mutantes en *dcl1* que acumulan nat-siARN de 24 nt de longitud pero no nat-siARN de 21 nt, ya que los niveles del transcrito fueron similares al control. A diferencia de los ta-siARNs que tienen la función de cortar diferentes transcritos, los nat-siARNs únicamente cortan

en *cis* (Wang *et al.*, 2005). La producción de nat-siARNs también se ha observado en plantas infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* como respuesta a esta infección. Así mismo, en este trabajo se indicó que el silenciamiento génico mediado por siARNs puede servir como un mecanismo para el reprogramado de la expresión de genes y la emisión de la respuesta de defensa por la planta (Agrawal *et al.*, 2003).

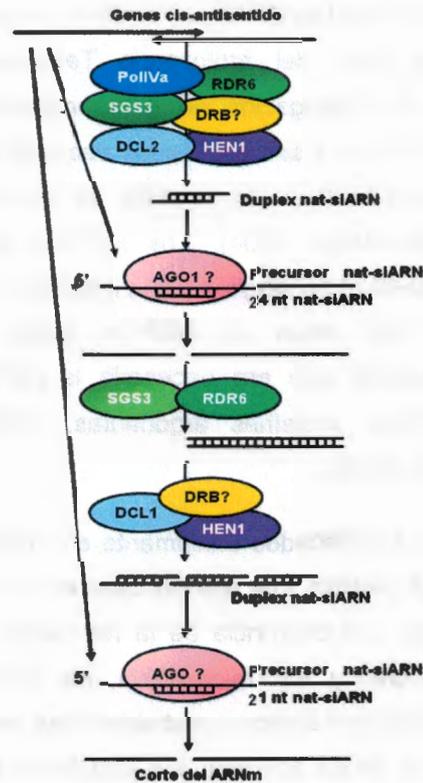


Figura 1.7. Componentes y biogénesis de los nat-siARNs en plantas. PolIVa, ARN polimerasa involucrada en el silenciamiento transcripcional; estabilizador de ARN SGS3 (Supresor of gene silencing 3); ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6); proteína de unión a dsARN (DRB4), ARN metilasa (HEN1) (Tomado de Vaucheret, 2006).

Recientemente se han descubierto otras clases de pequeños ARN: los rasiARNs (Repeat-associated short interfering ARNs) que son siARNs cuyo tamaño oscila entre 24 y 26 nt de longitud y son formados por eventos de transcripción descontrolados en loci de retrotransposones; así mismo, se ha observado que son generados por la dicer DCL3 y al igual que los tasiARNs estos también requieren de una ARN polimerasa dependiente de ARN para amplificar la señal (Pal-Bhadra *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2006).

Por su parte, los scan ARNs (scnARN) son siARNs de un tamaño de 29 nt y fueron detectados a partir del protozooario *Tetrahymena thermophila*. Durante el proceso de conjugación de este protozooario, los scnARNs derivan de los micronúcleos y son eliminados después de la formación de los macronúcleos; en esta etapa se necesita de una proteína argonauta Twil (Mochizuki y Gorovsky, 2004). Los lsiARNs (long siARNs) son pequeños ARNs de 30-40 nt de longitud y son inducidos en respuesta a una infección bacteriana. Esta clase de lsiARNs fueron descubiertos en *Arabidopsis* y se observó que era necesaria la participación de otras proteínas: DCL1, DCL4, proteínas argonautas, RDR6, HYL1 y HEN1 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006).

Otra clase de siARNs identificados únicamente en animales y *C. elegans*, son los 21U-ARN y los piARNs. Los piARNs caen en dos tamaños de 24-48 y 29-31 nt de longitud y a diferencia de la regulación postranscripcional negativa de los siARNs y los microARNs, los piARNs proporcionan estabilidad al ARN mensajero blanco y probablemente mejoran la traducción (Mochizuki y Gorovsky, 2004). Mientras, los 21U-ARNs fueron encontrados en dos regiones del cromosoma IV de *C. elegans* por Ruby y colaboradores (2006). Estos resultados dieron pie a la hipótesis de que estos pequeños ARNs, por tener similitud con los siARNs en plantas y con los scnARNs en la mosca, pueden modificar al oxígeno en su posición 2' o 3', pueden estar

involucrados en la reorganización de la cromatina y en la estabilidad del genoma; sin embargo, esto no se ha podido demostrar. No obstante se han detectado dos dominios conservados en estos pequeños ARNs, un dominio de ~34 de nt y un dominio de ~4 nt (figura 1.8).

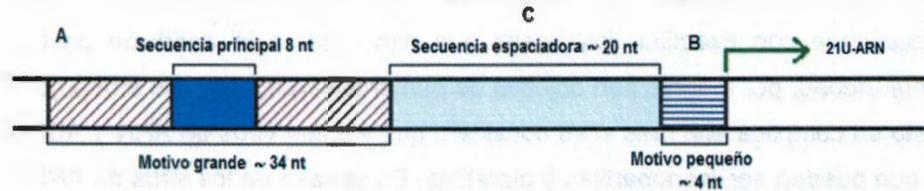


Figura 1.8. Estructura general de los 21U-ARNs. A) Motivo grande de ~34 nt de longitud con 8 nt centrales consenso CTGTTTCA; B) motivo pequeño de ~4 nt de longitud YRNT; C) secuencia espaciadora de ~19 a 27 pb (Tomado de Naqvi *et al.*, 2009).

A diferencia de los siARNs y los microARNs, los 21U-ARNs no requieren de un dsARN precursor; aparentemente su biogénesis depende de factores, los cuales detectan los residuos de uridina como el punto de referencia para iniciar el conteo de los 21U-ARNs. Estos pequeños ARNs fueron detectados principalmente tanto en regiones intergénicas como en intrónicas. Cada uno de estos ARNs pequeños son transcritos autónomamente sugiriendo que pudiera tratarse de genes independientes o que las secuencias flanqueantes 5' pueden funcionar como secuencias promotoras (Naqvi *et al.*, 2009; Ruby *et al.*, 2006).

1.5 ARN DE INTERFERENCIA EN VIRUS

El ARN de interferencia es un mecanismo que involucra supresión de la expresión del gen mediante el corte, degradación secuencia específica del ARN mensajero o por la inhibición de la traducción hasta proteína del mensajero. En plantas infectadas con virus, el silenciamiento citoplásmico por siARNs es considerado un mecanismo de defensa y se ha visto que es

desencadenado por dsARN. Estas moléculas de dsARNs pueden tener diferentes fuentes; pueden ser intermediarios provenientes de la replicación viral, pueden ser ARNs aberrantes o ARNs de cadena sencilla procesados a dsARN por una ARN polimerasa dependiente de ARN.

Los virus de plantas son patógenos pobremente controlados y se desconoce con exactitud las bases que dan lugar a la aparición de la enfermedad, por lo tanto son objetivo de numerosos estudios. Sin embargo, esto se complica aun más si se considera que existen virus de ARN y ADN y que pueden ser monopartitas y bipartitas. En el caso de los virus de ARN se ha sugerido que la molécula de dsARN resulta de la acción de ARN polimerasas dependientes de ARN que utilizan al virus de ARN como template y en esta etapa desencadenan el sistema del ARN de interferencia. El *Tomato mosaic virus* (ToMV) es un virus de ARN de cadena sencilla que pertenece al genero *Tobamovirus*; su genoma codifica para dos proteínas replicasas (130 kD y 180 kD) directamente de su genoma de ARN, una proteína denominada de movimiento y una proteína de cubierta. En este virus, la proteína de 130 kD presenta un dominio similar a ARN polimerasa dependiente de ARN y un nivel elevado de acumulación de aproximadamente 10 veces a la proteína de 180 kD (Kubota *et al.*, 2003).

Una pregunta que surgió después de estas observaciones fue ¿cómo los virus de ADN podían desencadenar ARN de interferencia? Los geminivirus son partículas virales (18X20 nm) que pueden contener uno o dos genomas de ADN de cadena simple en forma circular de 2.7 kb (Stanley y Gay, 1983). La familia *geminiviridae* se ha clasificado en base a la organización de su genoma en *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus* y *Topocuvirus*. La mayoría del género *begomovirus*, tienen dos componentes denominados ADN-A y ADN-B, los cuales son necesarios para la infectividad; sin embargo, también se han encontrado *begomovirus* con un solo componente

ADN-A (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A diferencia de los virus de ARN que presentan una etapa de dsARN durante su ciclo replicativo, los geminivirus que son virus de ADN de cadena sencilla no la presentan y en su lugar se ha hipotetizado que son capaces de desencadenar ARN de interferencia en el huésped por la producción de siARNs derivados del virus, mediante la interacción de dos transcritos virales, por abundancia de los ARN mensajeros o por la producción de transcritos con estructuras secundarias (Vanitharani *et al.*, 2005).

Los virus han desarrollado formas para contrarrestar o neutralizar el mecanismo de ARN de interferencia que permite a las plantas evitar su proliferación. Al respecto, se han observado que difieren tanto en estructura como en función. Se ha sugerido que la proteína "Potyvirus helper component proteinasa" (HC-Pro), uno de los primeros supresores identificados, probablemente inhiba el paso de mantenimiento del mecanismo de silenciamiento o la producción de siARN (Llave *et al.*, 2000; Mallory *et al.*, 2001). De igual manera, el cucumovirus 2b fue también uno de los primeros supresores del silenciamiento sistémico, posiblemente después de la generación de señal de silenciamiento (Brigneti *et al.*, 1998; Guo y Ding, 2002). Posteriormente, Silhavy y colaboradores (2002) reportaron que una proteína supresora tombusvirus p19 que es capaz de unirse a siARNs *in vitro* previene de esta forma la diseminación de la señal de silenciamiento.

Por otra parte, se ha observado que los virus se pueden utilizar para realizar el silenciamiento de genes endógenos, por lo tanto este fenómeno fue denominado como silenciamiento génico inducido por virus (Virus-induced gene silencing, VIGS). En plantas este tipo de silenciamiento es iniciado por vectores virales que llevan una porción del gen del cual van a suprimir su expresión (Kumagai *et al.*, 1995). Los genes que codifican para proteínas de

cubierta son indispensables en algunos virus durante un proceso de infección. Los genes de la cubierta AV1 del *Tomato golden mosaic virus* y del virus *Cabbage leaf curl virus* han sido utilizados para introducir insertos de tamaño entre 100-800 pares de bases. Entre los genes que se han silenciado utilizando este sistema se encuentran los que codifican para la fitoeno desaturasa (*PDS*), la cual es necesaria para la síntesis de pigmentos de tipo carotenoide y las que codifican para el complejo magnesio quelatasa (*ChlI*) el cual es importante para la producción de clorofila (Peele *et al.*, 2001; Turnage *et al.*, 2002; Vanitharani *et al.*, 2005).

1.6 IMPORTANCIA DEL ARN DE INTERFERENCIA (ARNi)

Durante mucho tiempo, el objetivo de los investigadores ha sido conocer la función de los genes que conforman a los genomas. Sin embargo, la función asignada a una mayoría de genes se ha realizado a través de su homología con genes previamente caracterizados. Una de las herramientas recién descubiertas que pudiera utilizarse para la evaluación de las funciones de los genes es el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi).

El ARNi ha revolucionado el estudio de la función de los genes y actualmente está siendo explorado como una herramienta terapéutica. Por ejemplo, el ARNi se ha utilizado para identificar productos genéticos esenciales para el crecimiento celular y de manera específica para la degradación de un producto oncogénico (Wilda *et al.*, 2002). También se ha utilizado el ARNi para prevenir infecciones virales por HIV y HCV en cultivos celulares y en animales (Park *et al.*, 2005). Estas observaciones abren la posibilidad de realizar estudios sobre nuevos genes en tratamientos contra el cáncer y antivirales usando siARN o shARN (short hairpin).

Así mismo, a través de procesos de este tipo se regula la expresión de una multitud de genes en una gran variedad de organismos eucariotas en

momentos clave del desarrollo. En algunos organismos como plantas e insectos, el silenciamiento por ARNi sirve además como defensa frente a virus, ya que la mayoría producen, en algún momento de la infección, ARNs de doble cadena que son reconocidos por la maquinaria celular y disparan una respuesta de degradación del ARN viral. Otro papel fundamental del silenciamiento por ARNi es el control de elementos transponibles, donde parece tener gran relevancia la metilación de estas secuencias de ADN en el genoma y la consecuente inhibición de la transcripción de estos elementos (Yu y Kumar, 2003).

1.7 FORMAS DE HACER ARN DE INTERFERENCIA

Desde la aparición de las pequeñas moléculas de ARN no codificantes y su función en diversos procesos celulares asociados al desarrollo y protección del genoma, se pudo observar que las pequeñas moléculas de ARN de doble hebra de 21nt de longitud (siARNs) fueron las mediadoras de silenciamiento postranscripcional o ARN de interferencia. Dado que el ARNi es un proceso de corte y degradación o represión de la traducción de ARN mensajeros blancos que ocurre a nivel postranscripcional, se han ideado formas de realizar la regulación de la expresión génica. Elbashir y colaboradores (2001), observaron que los siARN de 21nt de longitud podían obtenerse de manera sintética y transfectarse a células para realizar el silenciamiento de un gen de interés de secuencia específica. Estos siARNs se caracterizaban porque contaban en sus extremos 3' dos o tres nucleótidos salientes y simulaban aquellos producidos por la ribonucleasa Dicer a partir de ARN de doble cadena (dsARN). Colbere-Garapin y colaboradores (2005) incluyen en su trabajo un esquema de las etapas que experimentan los siARNs después de ser transfectados en la célula (figura 1.9).

Por otra parte, la eficiencia de los siARNs es mayor que los pequeños ARNs en antisentido. Una de las ventajas de los siARNs es que estos pueden aparearse completamente con su ARNm blanco. Al respecto han surgido diferentes programas de cómputo de empresas particulares que proporcionan guías para realizar el diseño y posteriormente realizar la síntesis de los siARNs (Ui-Tei *et al.*, 2004). Otra forma de obtener siARNs es a través de la síntesis *in vitro*; para ello se degrada ARN de doble hebra mediante la Dicer de igual manera como ocurre en la célula. Esta forma presenta una ventaja ya que es posible obtener un mayor número de siARNs que cubren una región mayor de siARN y por lo tanto mejoran la eficiencia (Yang *et al.*, 2002). Otro enfoque es utilizar la polimerasa T7 para realizar la transcripción de siARNs partiendo de templados de ADN pequeños que codifican para siARNs bajo el promotor T7 (Milligan *et al.*, 1987).

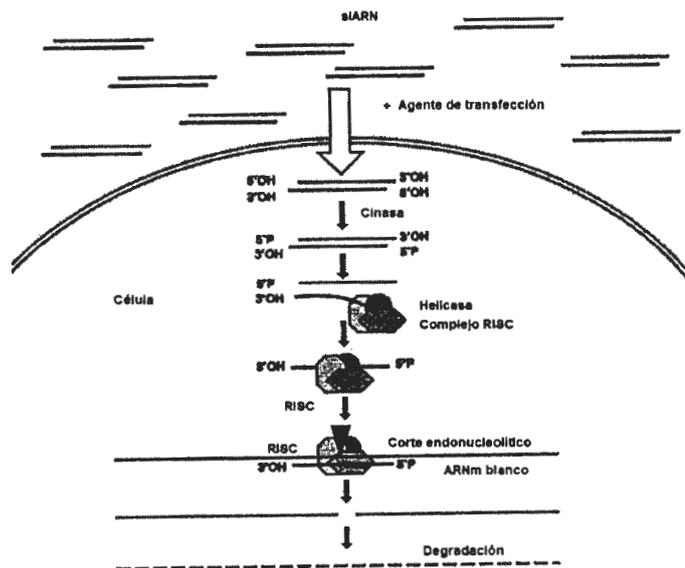


Figura 1.9. Modelo esquemático del ARN de interferencia utilizando siARN sintéticos. Una vez introducido el siARN sintético es fosforilado por una cinasa, luego desnaturalizado por una helicasa para asociarse con el complejo RISC. La hebra antisentido del siARN guía al complejo hacia su blanco, resultando la degradación del ARNm blanco (Tomado de Colbere-Garapin *et al.*, 2005).

Actualmente, otra manera de realizar ARNi es utilizando vectores que permitan construir estructuras de ARN de doble cadena tipo tallo-asa. Wesley y colaboradores (2001), describieron la importancia de los constructos de ARN para eficientizar el silenciamiento. A continuación se presentan algunas de estas estructuras (figura 1.10).

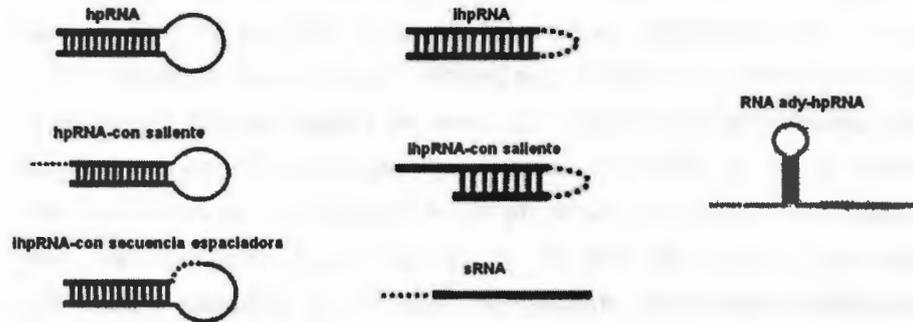


Figura 1.10. Estructuras de las moléculas de ARN utilizados para ARN de interferencia. hpARN, harpin loop ARN; hpARN, harpin loop con una secuencia de nucleótidos saliente; ihpARN, intrón harpin loop ARN con una secuencia de nucleótidos espaciadora; ihpARN, intrón harpin loop ARN; ihpARN-saliente, intrón harpin loop ARN con una secuencia de nucleótidos saliente; ARN ady-hpARN, ARN del gen blanco adyacente a harpin loop presente en el vector; sARN, ARN de cadena sencilla (Tomado de Wesley *et al.*, 2001).

En estos reportes se pudo observar que aquellos constructos de ARN de doble cadena proporcionan mayor eficiencia en el silenciamiento de genes. Esta misma característica fue observada por Xiong y colaboradores (2005), cuando realizaron el silenciamiento del gen que codifica para la ACC oxidasa que participa en la ruta de síntesis de etileno; así mismo, el vector que transcribía el constructo de ARN de doble cadena con el intrón pequeño proporcionaba mayor eficiencia al utilizarse en el mecanismo de ARNi. Se ha mencionado que la eficiencia es mayor en los constructos de ARN de tallo-asa comparados con aquellos que no forman estructuras tallo-asa; esto es debido principalmente a la carencia de una región intrónica que permita

la separación de la secuencia en sentido de la antisentido del gen. Al respecto se mencionó que la eficiencia se debía al intrón, el cual facilitaba el plegamiento de estas dos hebras formando así dsARN para iniciar el silenciamiento (Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2005).

Debido al avance en el conocimiento sobre el ARNi, se ha podido evaluar cuál es la función de los genes dentro de los diversos procesos celulares y la manera de realizar esta evaluación puede ser a través del uso de vectores que transcriban constructos de ARN tallo-asa o mediante las moléculas efectoras de siARN que pueden obtenerse por síntesis *in vitro* como previamente se mencionó o a través de síntesis química. De manera general, el uso de siARNs en sistemas animales es una forma que permite controlar la expresión de genes de manera transitoria, ya que el uso de moléculas de ARN de más de 30 nt de longitud desencadenan una respuesta de degradación inespecífica de ARN. Sin embargo, a pesar de que el siARNs en plantas no es muy utilizado, es posible regular la expresión de genes en forma transitoria transformando modelos celulares como los protoplastos, por lo tanto el interés por esta forma de silenciar un gen esta creciendo. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la obtencion de un modelo celular que permita estudiar la función de la PLC mediante el mecanismo de ARN de interferencia.

1.8 OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo para la obtención de un modelo celular que permita estudiar la función de la PLC mediante el mecanismo de ARN de interferencia.

1.9 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener protoplastos a partir de células en suspensión de *C. arabica* L.
- Seleccionar el medio de cultivo apropiado para el mantenimiento de los protoplastos viables después de la transformación.
- Clonar un fragmento de 281 pb de la región catalítica de la PLC en el vector pTDT-ARNi para inducir ARN de interferencia.
- Transformar protoplastos de *C.arabica* L con un vector que induzca un mecanismo de ARN de interferencia.
- Evaluar la transformación de los protoplastos de *C. arabica* mediante la proteína roja fluorescente PTDT.
- Evaluar el silenciamiento de la PLC en los protoplastos transformados.

1.10 JUSTIFICACIÓN

La fosfolipasa C (PLC) es una enzima que participa en la vía de señalización mediada por fosfoinosítidos, en animales está ampliamente estudiada y se ha reportado que existen varias isoenzimas. En plantas poco se conoce sobre estas y se ha sugerido que los genes identificados hasta ahora pertenecen a una sola familia. El problema aumenta más ya que se desconocen los mecanismos que regulan la función de esta enzima. No obstante, se sabe que participa en la transducción de señales de diversos factores ambientales, como son sequia, ataque por patógenos, salinidad entre otros. Utilizando como modelo suspensiones celulares de *Coffea arabica* se desea conocer los mecanismos de regulación y el cómo participa en la conversión de señales externas en internas y producir una respuesta celular. Hasta este momento en el grupo de trabajo se conoce la secuencia del sitio catálico de esta enzima. En este estudio se pretendió utilizar un fragmento de esta región para el establecimiento de un protocolo basado en protoplastos de *C. arabica* para realizar el silenciamiento de la PLC por ARN de interferencia debido a que es un sistema de silenciamiento transitorio y que nos permitirá determinar la respuesta de los protoplastos a diferentes condiciones ambientales de una manera controlada en función del tiempo. Este trabajo, sentará las bases para analizar cuál es la función de esta fosfolipasa C, considerando que en el futuro será necesario confrontar los resultados obtenidos en el sistema de protoplastos de suspensiones celulares con un sistema de protoplastos de mesófilo (tejido organizado) por ejemplo, y poder determinar si la respuesta en estos modelos es diferente una vez que se haya silenciado al gen de la PLC. Dado que el silenciamiento está basado en la secuencia codificante de la región del sitio catalítico podría esperarse que en los tejidos desdiferenciados se vea una respuesta diferente de aquellos donde hay un grado de organización y en

los cuales pudieran existir otras proteínas que cumplan la misma función metabólica que la PLC.

1.11 HIPÓTESIS

Si el fragmento seleccionado de 281 pb a partir del dominio catalítico de la PLC tiene un efecto para inducir silenciamiento de este gen, entonces deberíamos observar una reducción en el nivel del transcrito al analizar a los protoplastos transformados de *C. arabica*.

1.12 REFERENCIAS

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., y Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 67: 657-685.

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., y Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*. 121: 207-221.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431: 350-355.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., y Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 122: 553-563.

Bartel, D. P. (2004). microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281-297.

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*. 431: 356-363.

Bernstein, E., Denli, A. M., y Hannon, G. J. (2001). The rest is silence. *RNA*. 7: 1509-1521.

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., y Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*. 123: 1279-1291.

Brigneti, G., Voinet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., y Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *European Molecular Biology Organization Journal*. 17: 6739-6746.

Burge, C. B., Tuschl, T., y Sharp, P. A. (1999). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome, in *The RNA world*, Gestelant, R. F. (ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. pp. 525-560.

Carmichael, J. B., Provost, P., Ekwall, K., y Hobman, T. C. (2004). Ago1 and Dcr1, two core components of the RNA interference pathway, functionally diverge from Rdp1 in regulating cell cycle events in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*. 15: 1425-1435.

Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., y Macino, G. (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *European Molecular Biology Organization Journal*. 15: 3153-3163.

Colbere-Garapin, F., Blondel, B., Saulnier, A., Pelletier, I., y Labadie, K. (2005). Silencing viruses by RNA interference. *Microbes and Infection*. 7: 767-775.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., y Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*. 101: 543-553.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniovskaya, A., Lendeckel, W., y Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *European Molecular Biology Organization Journal*. 20: 6877-6888.

Gascioli, V., Mallory, A. C., Bartel, D. P., y Vaucheret, H. (2005). Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current Biology*. 15: 1494-1500.

Guo, H. S. y Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *European Molecular Biology Organization Journal*. 21: 398-407.

Hamilton, A. J. y Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286: 950-952.

Han, M. H., Goud, S., Song, L., y Fedoroff, N. (2004). The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 101: 1093-1098.

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., y Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18: 71-106.

Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*. 418: 244-251.

Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., y Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 57: 173-188.

Hutvágner, G. y Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development*. 12: 225-232.

Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., y Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell*. 4: 205-217.

Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J. K., Staskawicz, B. J., y Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 103: 18002-18007.

Kim, K., Lee, Y. S., y Carthew, R. W. (2007). Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA*. 13: 22-29.

Kim, V. N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and Cells*. 19: 1-15.

Krämer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual Review Biochemistry*. 65: 367-409.

Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., y Meshi, T. (2003). Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*. 77: 11016-11026.

Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., y Grill, L. K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 92: 1679-1683.

Kurihara, Y. y Watanabe, Y. (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 101: 12753-12758.

Li, H. W. y Ding, S. W. (2005). Antiviral silencing in animals. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 579: 5965-5973.

Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., y Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433: 769-773.

Llave, C., Kasschau, K. D., y Carrington, J. C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 97: 13401-13406.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., y Carrington, J. C. (2002). Cleavage of *Scarecrow*-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*. 297: 2053-2056.

MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., y DouDNA, J. A. (2008). *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 105: 512-517.

Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., y Vance, V. B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*. 13: 571-583.

Matzke, M. A., Matzke, A. J. M., Pruss, G. J., y Vance, V. B. (2001). RNA-based silencing strategies in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*. 11: 221-227.

Meister, G. y Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431: 343-349.

Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D., y Flavell, R. B. (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell*. 88: 845-854.

Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W., y Uhlenbeck, O. C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Research*. 15: 8783-8798.

Mochizuki, K. y Gorovsky, M. A. (2004). Conjugation-specific small RNAs in tetrahymena have predicted properties of scan (scn) RNAs involved in genome rearrangement. *Genes & Development*. 18: 2068-2073.

Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Rémoué, K.,

Sanial, M., Vo, T. A., y Vaucheret, H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*. 101: 533-542.

Napoli, C., Lemieux, C., y Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell*. 2: 279-289.

Naqvi, A. R., Islam, M. N., Choudhury, N. R., Nirupam, R. C., y Haq, Q. R. (2009). The fascinating world of RNA interference. *International Journal of Biological Sciences*. 5: 97-117.

Ooi, S. L., Samarsky, D. A., Fournier, M. J., y Boeke, J. D. (1998). Intronic snoRNA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the lariate-debranching enzyme: intron length effects and activity of a precursor snoRNA. *RNA*. 4: 1096-1206.

Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., y Gandhi, S. G. (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*. 303: 669-6672.

Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., y Chen, X. (2002). Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 12: 1484-1495.

Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., y Poethig, R. S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 102: 3691-3696.

Peele, C. G., Jordan, C. V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L., y Robertson, D. (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*. 27: 357-366.

Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., y Poethig, R. S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development*. 18: 2368-2379.

Pontes, O., Costa-Nunes, P., Vithayathil, P., y Pikaard, C. S. (2009). RNA polymerase V functions in *Arabidopsis* interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway. *Molecular Plant*. 2: 700-710.

Romano, N. y Macino, G. (2006). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*. 6: 3343-3353.

Ruby, J. G., Jan, C., y Player, C. (2006). Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*. 127: 1193-11207.

Salto, K., Nishida, K. M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H., y Siomi, M. C. (2006). Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the drosophila genome. *Genes & Development*. 20: 2214-2222.

Sijen, T., Steiner, F. A., Thijssen, K. L., y Plasterk, R. H. A. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*. 315: 244-247.

Silhavy, D., Molnar, A., Luccioli, A., Szitty, G., Hornyik, C., Tavazza, M., y Burgyan, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *European Molecular Biology Organization Journal*. 21: 3070-3080.

Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., y Waterhouse, P. M. (2000). Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*. 407: 319-320.

Stanley, J. y Gay, M. R. (1983). Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature*. 301: 260-262.

Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., y Zhu, J. K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*. 12: 301-309.

Turnage, M., Muangsan, N., Peele, C. G., y Robertson, D. (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 30: 107-114.

Ui-Tel, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., y Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research*. 32: 939-948.

van der Krol, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. 2: 291-299.

van Eldik, G. J., Litiere, K., Jacobs, J. J., Van Montagu, M., y Cornelissen, M. (1998). Silencing of beta-1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucleic Acids Research*. 26: 5176-5181.

Vanitharani, R., Chellappan, P., y Fauquet, C. M. (2005). Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science*. 10: 144-151.

Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*. 20: 759-771.

Vazquez, F., Gascioli, V., Crété, P., y Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology*. 14: 346-351.

Wang, X. J., Gaasterland, T., y Chua, N. H. (2005). Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*. 6: 1-11.

Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G., y Waterhouse, P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*. 27: 581-590.

Wilda, M., Fuchs, U., Wossmann, W., y Borkhardt, A. (2002). Killing of leukemic cells with a *BCR/ABL* fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*. 21: 5716-5724.

Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., y Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *Public Library of Science Biology*. 2: 0642-0652.

Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., y Carrington, J. C. (2005). Dicer-like 4 functions in *trans*-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America*. 102: 12984-12989.

Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Li, X., Han, P. L., y Fan, H. Q. (2005). Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Reports*. 23: 639-646.

Yang, D., Buchholz, F., Huang, Z., Goga, A., Chen, C. Y., Brodsky, F. M., y Bishop, J. M. (2002). Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 9942-9947.

Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., y Poethig, R. S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development*. 19: 2164-2175.

Yu, H. y Kumar, P. P. (2003). Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports*. 22: 167-174.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., y Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101: 25-33.

Zhang, X., Henderson, I. R., Lu, C., Green, P. J., y Jacobsen, S. E. (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 4536-4541.

CAPÍTULO II

Fosfolípidos de membrana y transducción de señales

2.1 INTRODUCCIÓN

Durante su ciclo de vida, las plantas están continuamente expuestas a diversos estímulos ambientales. Por lo cual tiene que convertir las señales externas en internas y desencadenar o reprogramar la síntesis de sus transcritos y emitir una respuesta de adaptación o de muerte celular para protegerse. La respuesta ante un estímulo varía de acuerdo a la edad de la planta o de la célula; en una célula madura, la respuesta puede ser fisiológica y/o bioquímica. Mientras que en una célula en crecimiento, la respuesta es de tipo morfológico y de desarrollo.

Lo interesante en una planta es la manera en la cual regula e integra la o las señales para emitir una respuesta que le permitirá adaptarse a un cambio ambiental. Así, es posible mencionar que las plantas utilizan una red de transducción de señales en su interior, entre sus células y en la planta completa. El calcio participa en una gran variedad de rutas de transducción de señales en las que se encuentran involucradas proteínas, segundos mensajeros localizados en el citoplasma y en la membrana plasmática. Por su parte, las cinasas son proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos, los genes que codifican para éstas representan el 3 o 4% del genoma.

En plantas como en animales, varios sistemas de transducción de señales involucran a la vía de señalización de los fosfoinosítidos (PI), donde las fosfolipasas C específica para fosfoinosítidos (PI-PLC) tiene la función de generar dos segundos mensajeros: el inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3) y el

diacilglicerol (DAG) a través de la hidrólisis del fosfatidil 4, 5 bifosfato (PIP₂). Las PLCs son reguladas por un gran número de factores ambientales como son: la osmolaridad, la salinidad, el estrés oxidativo, los metales y los patógenos.

2.2 COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR

Las membranas son una barrera física tipo bicapa que separa el contenido celular del exterior y el contenido de los organelos del citoplasma. También son sitios en los cuales pueden ocurrir diversas reacciones químicas. La membrana plasmática presenta una función en diversos procesos como la organización, la expansión y la maduración celular. Las membranas celulares están constituidas por lípidos, proteínas y carbohidratos (Conn *et al.*, 2001).

Las membranas de las células vegetales, consisten de lípidos, proteínas y carbohidratos en una proporción molecular de aproximadamente 40:40:20. Esta mezcla lipídica contiene fosfolípidos, glicolípidos y esteroides de la misma manera que en animales. Así mismo, los fosfolípidos son los lípidos más abundantes y se caracterizan por tener una cabeza polar cargada y una cola hidrofóbica hidrocarbonada, mientras que las proteínas pueden ser periféricas e integrales. Los lípidos no se encuentran fijos por enlaces covalentes sino que son unidades móviles, por lo tanto las membranas pueden asumir diferentes formas sin alterar las interacciones hidrofóbicas que estabilizan su estructura. Estudios realizados sobre fosfolípidos en la bicapa han permitido revelar que estas moléculas pueden difundirse lateralmente, rotar, flexionar su extremo carbonado y experimentar un cambio de posición tipo flip-flop (Staehelein y Newcomb, 2000).

Por otra parte, la composición de lípidos en las membranas plasmáticas varía de un órgano a otro en una misma planta y entre órganos idénticos en diferentes plantas (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Composición lipídica de diferentes membranas de varias especies y tejidos.

Tipo de lípidos	Cebada raíces	Cebada hojas	<i>Arabidopsis</i> hojas	Espinacas hojas
Fosfolípidos	26	44	47	64
Esteroles libres	57	35	38	7
Estéril glucósidos	7	---	5	---
Glucósidos estéril acetilados	---	---	3	13
Glucocerebrosidos	9	16	7	14

(Tomado de Staehelin y Newcomb, 2000).

Como puede observarse en el cuadro 2.1 las membranas de las raíces de cebada presentan el doble de esteroles libres que fosfolípidos. Sin embargo, en hojas la proporción es contraria al de las raíces, mientras que la proporción de fosfolípidos a esteroles libres en hojas de espinacas es de 9:1 (cuadro 2.1). Esta variabilidad observada en las membranas indica que las enzimas celulares pueden funcionar de manera diferente dependiendo del ambiente lipídico (Staehelin y Newcomb, 2000).

2.3 SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS DE MEMBRANAS

Los fosfolípidos son los componentes principales y vitales en todas las membranas y desempeñan funciones en procesos tales como la transducción de señales, la forma de la estructura del citoesqueleto y el tráfico membranal. Así mismo, los fosfolípidos pueden funcionar como cofactores para enzimas localizadas en las membranas y relacionadas en la transducción de señales. Los fosfolípidos y catabolitos relacionados (lisofosfolípidos) pueden cambiar las propiedades físicas de las membranas

para incrementar o reducir el flujo de iones, el transporte membranal, la formación de vesículas y los procesos de endo y exocitosis (Cowan, 2006).

La hidrólisis de los fosfolípidos de las membranas es realizada por un grupo de enzimas denominadas fosfolipasas, las cuales participan en procesos de señalización produciendo segundos mensajeros y productos lipídicos intermediarios como los lisofosfolípidos. Estas enzimas han sido clasificadas como fosfolipasas A (PLA), C (PLC) y D (PLD) (Wang, 2005).

Un análisis detallado del genoma de *A. thaliana* reveló la presencia de numerosos genes que participan en la vía de señalización de fosfatidilinositol (Lin *et al.*, 2004). Entre estos se encuentran genes que codifican para fosfatidilinositol fosfatasas, fosfatidilinositol fosfato cinasas, fosfolipasas, inositol polifosfato fosfatasas e inositol polifosfato cinasas. Lin y colaboradores (2004) analizaron el perfil de expresión en tejidos tratados con auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides, ácido salicílico, ácido jasmónico o factores como la temperatura, salinidad y sequía, confirmando que estos genes relacionados a la ruta de fosfoinosítidos fueron diferencialmente expresados, pero que las diferentes isoformas fueron expresadas en tejidos y/o ambientes específicos.

Las fosfolipasas específicas para fosfoinosítidos (PI-PLC) están íntimamente involucradas en las respuestas mediadas por citocininas (Repp *et al.*, 2004), mientras que las fosfolipasas A (PLA2) están relacionadas con la elongación celular mediada por auxinas y en la biosíntesis de ácido jasmónico (Lee *et al.*, 2003; Ryu, 2004; Scherer, 2002). La actividad de la PLD se ve afectada en presencia de ácido abscísico (ABA) y por etileno, lo que permitió sugerir una posible función en las rutas de señalización de ABA y etileno (Fan *et al.*, 1997).

Los fosfolípidos fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) representan los lípidos más abundantes en membranas vegetales, mientras que el fosfatidilglicerol (PG), el fosfatidilinositol (PI) y la fosfatidilserina se encuentran en menor cantidad (Frentzen, 2004). En plantas el fosfatidilglicerol y el PI son formados a partir de ácido fosfatídico (PA) mediante una serie de reacciones que ocurren a través de la vía citidin difosfato diacilglicerol (CDP-diacilglicerol), glicerol-3-fosfato y mio-D-inositol para obtener PG y PI respectivamente. Otra ruta minoritaria pero de importancia para la síntesis de PG es a través de la actividad enzimática catalizada por la PLD por hidrólisis del difosfatidilglicerol o glicerólisis de otros fosfolípidos (Frentzen, 2004).

El PI es fosforilado por varias cinasas en diferentes posiciones (3,4,5) del anillo del inositol. Entre los derivados fosforilados de PI, los más importantes desde el punto de vista biológico son el fosfatidilinositol-4-fosfato y el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. Sin embargo, el fosfatidilinositol-3-fosfato se ha demostrado que tiene una función en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por ABA durante el cierre de los estomas (Park *et al.*, 2003). Es importante mencionar que estos fosfatidilinositol fosfatados, normalmente se encuentran en bajos niveles en las membranas, típicamente entre 1 a 3% con respecto a la concentración de PI y el equilibrio en la parte interna de la membrana es logrado por procesos continuos de fosforilación y defosforilación por enzimas específicas. La vía de señalización de los fosfoinosítidos ha sido ampliamente estudiada en los animales. En la figura 2.1 se muestra la vía de señalización por fosfoinosítidos la cual inicia con la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) por la cinasa PI4K y posteriormente por otra cinasa PIP5K para dar lugar a la formación del PIP₂. Luego, este fosfoinosítido es utilizado por la fosfolipasa C para producir dos segundos mensajeros: el inositol 1, 4, 5 trifosfato (InsP(1, 4, 5)P₃) y el diacilglicerol (DAG). En

animales, el IP₃ permite la liberación de calcio del retículo endoplásmico, mientras que en plantas se ha sugerido que el IP₃ puede ser fosforilado hasta IP₆ (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003) e IP₅ y liberar calcio a partir de vacuola, mitocondria y cloroplasto (Zonia y Munnik, 2006). Mientras que el DAG en animales es capaz activar a la proteína cinasa (PKC), en plantas es fosforilado por la DAG cinasa para dar lugar al segundo mensajero importante el ácido fosfatídico (van Leeuwen *et al.*, 2004).

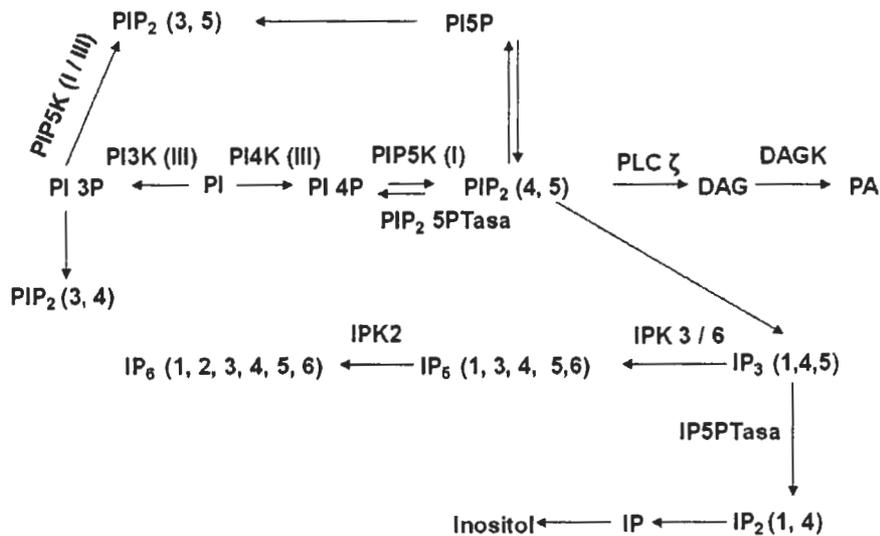


Figura 2.1. Intermediarios de la ruta de fosfoinosítidos en plantas. IP, inositol fosfato; IP PTasa, inositol fosfato fosfatasa; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; DAGK, diacilglicerol cinasa; PA ácido fosfatídico; PIP, fosfatidilinositol fosfato; PI4P, fosfatidilinositol-4-fosfato; PI3P, fosfatidilinositol-3-fosfato; PI5P, fosfatidilinositol-5-fosfato; PIP₂(4,5), fosfatidilinositol-4,-5-bifosfato; PIPK, fosfatidilinositol-fosfato-cinasa (Tomado de Boss *et al.*, 2008).

2.4 FOSFOLIPASAS

El catabolismo de los fosfolípidos de membrana es un proceso esencial en la cascada de señalización mediada por lípidos y también para mantener el equilibrio dentro del simplasto. Las fosfolipasas son las enzimas involucradas en el catabolismo de fosfolípidos y están involucradas en respuestas ante diversos factores bióticos y abióticos.

Las fosfolipasas son clasificadas como fosfolipasas D (PLD), C (PLC), A2 (PLA₂), A1 (PLA₁) de acuerdo a su sitio de hidrólisis en el fosfolípido como se muestra en la figura 2.2.

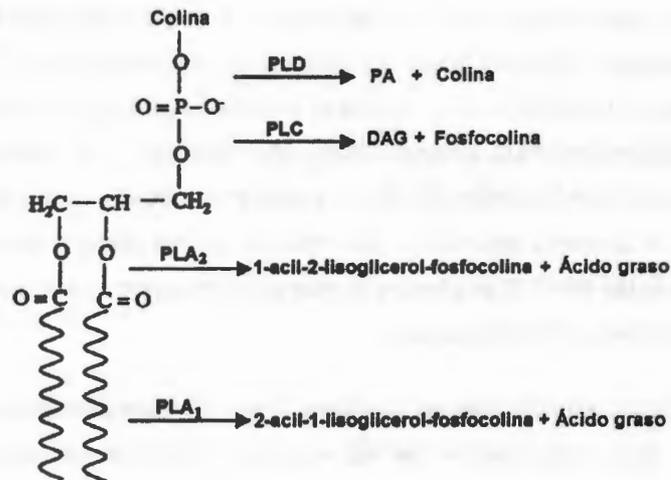


Figura 2.2. Sitio de hidrólisis del fosfolípido fosfatidilcolina (PC) por las enzimas PLD, PLC, PLA. Las flechas debajo de las fosfolipasas indican el sitio de corte y los productos obtenidos. PA, ácido fosfatídico; Colina; DAG, diacilglicerol; Fosfocolina; Ácido graso (Tomado de Wang, 2001).

La PLA₁ y la PLA₂ hidrolizan al fosfolípido para producir ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Balsinde *et al.*, 1999). La PLC hidroliza el enlace éster glicerofosfato para producir DAG y un grupo polar (Wang, 2001). La PLD hidroliza el enlace fosfodiésterico terminal de los fosfolípidos a ácido fosfatídico (PA) y una cabeza polar soluble en agua. Estas fosfolipasas pueden ser divididas en sub familias basado en la similitud de sus secuencias, propiedades bioquímicas y en su función biológica (Wang, 2001).

2.5 FOSFOLIAPASAS C ESPECÍFICAS PARA FOSFOINOSÍTIDOS (PI-PLC)

De acuerdo a la selectividad hacia el sustrato y a la función celular, las fosfolipasas C pueden dividirse en tres clases: a) fosfolipasas específicas para fosfoinosítidos; b) fosfolipasas no específicas, referidas como PC-PLC, que hidrolizan al fosfolípido de membrana fosfatidil colina y c) fosfolipasas glicosil-fosfatidilinositol-PLC (Wang, 2001). En animales, las fosfolipasas específicas para fosfoinosítidos (PI-PLC), están involucradas en respuesta a hormonas y a diversos estímulos. Así mismo, se ha podido detectar la presencia de estas PI-PLC en plantas lo que permite suponer que presentan funciones similares en los vegetales.

Hasta el momento en animales se han identificado 13 isoenzimas de la PLC (figura 2.3), cuya clasificación se ha realizado tomando en cuenta su estructura y mecanismo de activación. Estas se han agrupado en seis clases, clase β (4), clase γ (2), clase δ (3), clase ϵ (1), clase ζ (1) (Saunders *et al.*, 2002) y clase η (2) (Hwang *et al.*, 2005).

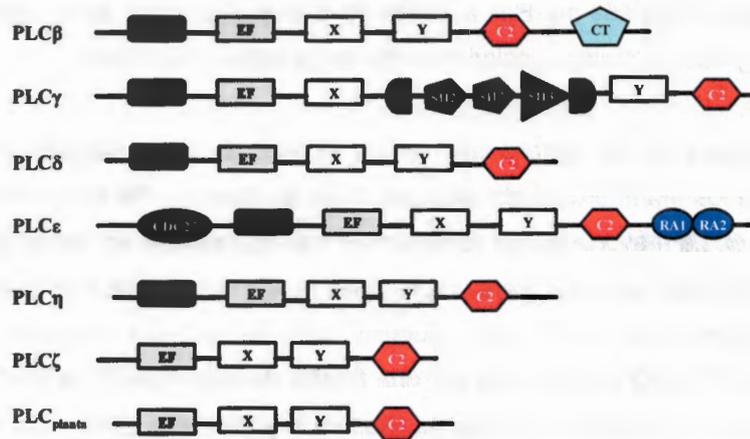


Figura 2.3. Dominios presentes en las fosfolipasas C de mamíferos y de plantas. PH, dominio homólogo a plekstrina sitio de unión a fosfolípidos de la membrana; EF-Hand, dominio de unión a iones calcio; X e Y, dominio catalítico altamente conservado entre las PLC; SH₂, SH₃ dominios (Src-homology) sitios de interacción con receptores PDGF y EGF; C2, dominio de unión a calcio; RA1 y RA2, dominios de interacción con proteínas G de la familia Ras; CDC25, dominio de intercambio de nucleótidos de guanina por proteínas de la familia de las Ras (modificado de McCudden *et al.*, 2005; Nakahara *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2005).

También se han identificado dos enzimas, la PLC-L1 y la PLC-L2 que poseen todos los dominios comunes a las PLCs; sin embargo, estos no presentan actividad catalítica debido a que los residuos involucrados en la actividad son reemplazados con otros aminoácidos (Kanematsu *et al.*, 2002; Otsuki *et al.*, 1999). Todas las fosfolipasas C presentan dominios catalíticos con secuencias altamente homólogas (40-60% de identidad) y son nombradas como X e Y, además pueden estar presentes otros dominios como el dominio C2 el cual regula la unión a lípidos vesiculares de manera dependiente a calcio, el dominio PH (homólogo a pleckstrina) el cual se une a fosfoinosítidos de la membrana, los dominios Src, localizados entre los dominios X e Y, los cuales se ha determinado que presentan una función importante en la activación por señales mitogénicas (Kamat y Carpenter, 1997; Kim *et al.*, 2002). Sin embargo, en plantas el dominio PH está ausente, por lo tanto se desconoce con exactitud como es que inicia la

hidrólisis del PIP₂. La PLC- ϵ , puede estar involucrada en la ruta de señalización mediada por Ras a través del dominio RasGEF en la región N-terminal y dos dominios asociados a Ras en la región C-terminal.

La estructura de las fosfolipasas de las plantas tiene un parecido con la PLC- ζ de los mamíferos dado que carece de un dominio PH en su extremo N-terminal. La mayoría de las fosfolipasas son expresadas en varios tejidos y presentan por lo tanto diversas funciones en las respuestas celulares. De igual manera, las PLCs son reguladas por mecanismos diferentes por ejemplo, la PLC- β es regulada por una familia de proteínas G, la PLC- γ es regulada por fosforilación en tirosina (Rebecchi y Pentylala, 2000) y la PLC- ϵ por G α_{12} y Ras (Song *et al.*, 2001).

2.6 GENES QUE CODIFICAN PARA PLC DE PLANTAS

En el genoma de *A. thaliana*, se han identificado 9 genes con homología a PI-PLC. Todos estos genes se expresan en diversos tejidos de la planta, pero los péptidos codificados por AtPLC8 y AtPLC9 son inactivos debido a una sustitución de aminoácidos en el dominio Y. Mientras que el análisis realizado en la secuencia de ADNc de AtPLC7 reflejó que el transcrito puede presentar un corte y empalme, lo que daría origen a una proteína potencialmente inactiva. Por lo tanto son 6 los genes (AtPLC1-6) que codifican para la PI-PLC en *A. thaliana* (Hunt *et al.*, 2004). Sin embargo, en un trabajo mas reciente se logró aislar un ADNc completo que codifica para AtPLC7 (Número de accesión en GenBank NM_115452) y estos autores mencionan que lo más probable es que este ADNc codifique una proteína activa (Tasma *et al.*, 2008).

En *Solanum tuberosum* se han identificado tres genes que codifican para PI-PLC: StPLC1, StPLC2 y StPLC3, estas secuencias mostraron los dominios catalíticos X y Y y el dominio C2, de igual manera estas enzimas

demonstraron preferencia catalítica sobre PIP₂ y fueron dependientes para su actividad de concentraciones de Ca²⁺ a 10 μM e inhibidas por concentraciones equimolares de Al³⁺; es importante mencionar que estos genes fueron expresados en diferentes partes de la planta (Kopka *et al.*, 1998).

A partir de una biblioteca de ADNc de *Zea mays* se identificó una PI-PLC la cual fue nombrada como ZmPLC; este gen codifica para un péptido de 586 aminoácidos, así mismo, se observó que su expresión se ve afectada bajo condiciones de alta salinidad, sequía, frío y bajas condiciones osmóticas (Zhai *et al.*, 2005). Venkataraman y colaboradores (2004) reportaron la clonación y caracterización de un ADNc que codifica para una PLCδ a partir *Pisum sativum* (PsPLC). En este trabajo, la secuencia de aminoácidos deducida presentó un 75-80% de identidad a otras PLC de plantas; sin embargo, al expresar y obtener una proteína recombinante no desarrolló afinidad por PIP₂ a pesar de que presentó todos los residuos requeridos para presentar actividad catalítica.

Pan y colaboradores (2005) detectaron actividad de PI-PLC en protoplastos de polen de *Lilium davidi*. En este trabajo aislaron dos ADNc para PI-PLC, los cuales nombraron como LdPLC1 y LdPLC2, las secuencias de aminoácidos deducida para las dos PI-PLC contienen el dominio X, Y y C2. Un análisis en BLAST demostró una identidad del 60-65% a las otras PLC reportadas, observando la expresión de ambos genes en granos de polen.

Dowd y colaboradores (2006) con la finalidad de conocer cuales son los factores que regulan el crecimiento del tubo polínico, clonaron un ADNc a partir de *Petunia inflata* y observaron que se trataba de una PLC, a este ADNc la nombraron Pet-PLC. Mediante la inactivación de Pet-PLC demostraron que este es necesario para el crecimiento del tubo polínico y

para la fertilización, puesto que los fenotipos observados presentaron un crecimiento apical alterado, una modificación en la estructura del citoesqueleto y una deslocalización del crecimiento de la punta del tubo polínico y una variación en el gradiente de calcio citosólico.

2.7 FUNCIÓN DE LAS FOSFOLIPASAS C

En animales el metabolismo de los fosfoinosítidos está involucrado en varios procesos celulares como: secreción de hormonas, la transducción de señales por neurotransmisores, el crecimiento celular, el tráfico vesicular, la regulación de la función de canales iónicos y la regulación del citoesqueleto (Fukami, 2002; Nakahara *et al.*, 2005).

En plantas, la actividad de las PLC fue primeramente identificada en membrana plasmática de raíz de avena (Tate *et al.*, 1989), posteriormente fue identificada en otras especies vegetales (Cho *et al.*, 1995; Melin *et al.*, 1992). Por lo tanto es posible suponer que las PI-PLC identificadas en plantas, al igual que en animales, presenten funciones importantes. Las PI-PLC están involucradas en respuestas relacionadas a una gran variedad de estímulos, incluyendo estrés ambiental (Legendre *et al.*, 1993), gravedad (Perera *et al.*, 1999), ataque por patógenos (Stevenson *et al.*, 2000), polinización (Wang, 2001), estrés por aluminio (Martínez-Estévez *et al.*, 2003), en la vía de señalización mediada por ácido abscísico (Lee *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2004; Sanchez y Chua, 2001) y la muerte celular en tomate mediada por aluminio (Yakimova *et al.*, 2007).

Así mismo, Tasma y colaboradores (2008) observaron como los 9 genes de las diferentes fosfolipasas en *A. thaliana* se expresaban diferencialmente dependiendo del tipo de estímulo aplicado (salinidad, ABA, nutrientes, frío y deshidratación) y que esta expresión diferencial también ocurre en los diferentes órganos de la planta (tallo, flores y raíces). Sin embargo, la

fosfolipasa AtPLC2 también se expresa en forma constitutiva. Finalmente, las PI-PLC en plantas y animales presentan funciones importantes que las hacen de interés para la investigación en diferentes procesos celulares.

Martínez-Estevéz y colaboradores (2003) encontraron que en células en suspensión de *C. arabica*, la presencia de Al^{3+} tiene dos efectos sobre la actividad de la PLC, uno a períodos cortos de un minuto en donde se pudo observar un incremento en la actividad de la enzima; sin embargo en períodos de tiempo de una hora, la actividad de esta enzima se ve abatida. En este mismo trabajo el aluminio tiene la habilidad de afectar la actividad enzimática de las lípido cinasas involucradas en la señalización mediada por fosfoinosítidos, principalmente la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K), la fosfatidilinositol 5-fosfato cinasa (PIP5K) y la diacilglicerol cinasa; los resultados de este trabajo sugieren que el Al^{3+} es capaz de alterar el metabolismo de fosfolípidos de la membrana, afectando no solo a la PLC sino también a otras enzimas involucradas en la señalización.

Ramos-Díaz y colaboradores (2007) demostraron detalladamente que el aluminio inhibe la formación de un segundo mensajero importante, el ácido fosfatídico (PA) formado por la vía de la PLC, por lo tanto, fue necesario evaluar el efecto del inhibidor U73122 sobre esta enzima y posteriormente evaluar la cantidad de PA producido a partir de PLC y PLD. En su trabajo propone un modelo donde expone las vías que pudieran alterarse al afectar la actividad de la PLC (figura 2.4).

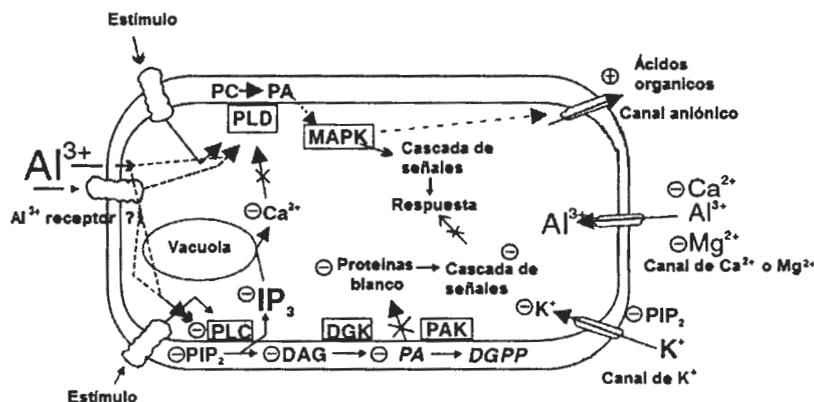


Figura 2.4. Efecto del aluminio en la transducción de señales mediada por fosfoinosítidos (Tomado de Ramos-Díaz *et al.*, 2007).

En éste modelo, el aluminio puede competir por los canales de calcio y magnesio u otros iones (Rengel y Robinson, 1989; Ryan *et al.*, 1995), modificar la actividad de la PLC por interacción con PIP_2 o por interacción directa con la enzima PLC (Martínez-Estévez *et al.*, 2003; Verstraeten *et al.*, 2003). También puede afectar los niveles de otros lípidos como PIP_2 (Liu *et al.*, 2005). Así mismo, el Al^{3+} puede afectar a otras cascadas de señales como las que involucran a las proteínas cinasas activadas por mitógenos, MAPKs (Arroyo-Serralta *et al.*, 2005; Osawa y Matsumoto, 2001) y también afectar la actividad de algunas enzimas relacionadas con el ciclo celular como a la cinasa dependiente de ciclina (Valadez-González *et al.*, 2007).

Echevarria-Machado y colaboradores (2005) demostraron que por su carácter de moléculas con carga positiva las poliaminas putrescina, espermina y espermidina pueden interactuar con los fosfolípidos de las membranas y afectar en forma diferencial a cada uno de los componentes

de la vía de señalización mediada por fosfoinosítidos. En su trabajo, la putrescina es capaz de reducir los niveles de la actividad de la PLC, aumentar la actividad de la fosfolipasa D y mantener la actividad de los lípidos cinasas. Por su parte, la espermina y la espermidina estimulan marcadamente a las lípido cinasas y como consecuencia el aumento de dos lípidos el PI4P y el PIP₂; sin embargo, las actividades de la PLD y la PLC no se modificaron como ocurrió con la putrescina.

Yakimova y colaboradores (2007) demostraron que las células tratadas con 100 µM de AlCl₃, presentaron síntomas de muerte celular, condensación nuclear y citoplásmica. Sin embargo, en este estudio el uso antioxidante de inhibidores de proteasas, caspasas e inhibidores de PLC y PLD revierte la muerte celular. Sugiriendo, a partir de estos resultados, que a bajas concentraciones de este metal se estimulan las vías de señalización mediadas por la PLC y la PLD, permitiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y posteriormente la muerte celular.

En raíces transformadas de *Catharantus roseus* se ha observado que pueden existir más de una PLC como lo indica el análisis realizado en extractos membranales y solubles. Sin embargo, cada una de las actividades enzimáticas de las PLCs fueron inhibidas con 100 µM del inhibidor neomicina. Así mismo, se ha mencionado que algunos iones pueden afectar la actividad de la PLC y también se ha observado que esta enzima necesita de Ca²⁺ para su actividad. También se ha evaluado el efecto de los cationes divalentes Ni²⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ sobre la actividad de los dos extractos en presencia de Ca²⁺. La actividad membranal fue la más afectada por el ion Cu²⁺ (Piña-Chable *et al.*, 1998).

La PLC de *C. arabica* al igual que otras ha sido ampliamente estudiada y en presencia de iones de Al³⁺ esta se ve afectada en sus niveles de expresión. Sánchez-Cach y colaboradores (2008) clonaron la región catalítica de 926

pb (308 aminoácidos) de la PLC de café (figura 2.5). Se determinó que la PLC de café, nombrada como CaPLC (Número de accesoión en GenBank EU574912), presentó una identidad del 99% en la secuencia de aminoácidos con *Glicina max* y un 60-77 % de similitud con *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa* y *Zea mays*. Este cADN se expresó en *E. coli* en donde se determinó la masa molecular teórica de la proteína (34.7 kDa), el punto isoelectrico teórico (5.31) y la actividad enzimática (34.23 nmol/min /mg proteína).

Como se ha mencionado en este capítulo, la PLC es una enzima involucrada en la transducción de señales de diversos estímulos y la generación de los segundos mensajeros IP₃ y PA los cuales se han visto que participan en la regulación de diversos procesos. Es por esto que el interés de éste trabajo fue el de evaluar el silenciamiento del gen que codifica para la PLC empleando como modelo protoplastos de *C. arabica* y utilizando el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi).

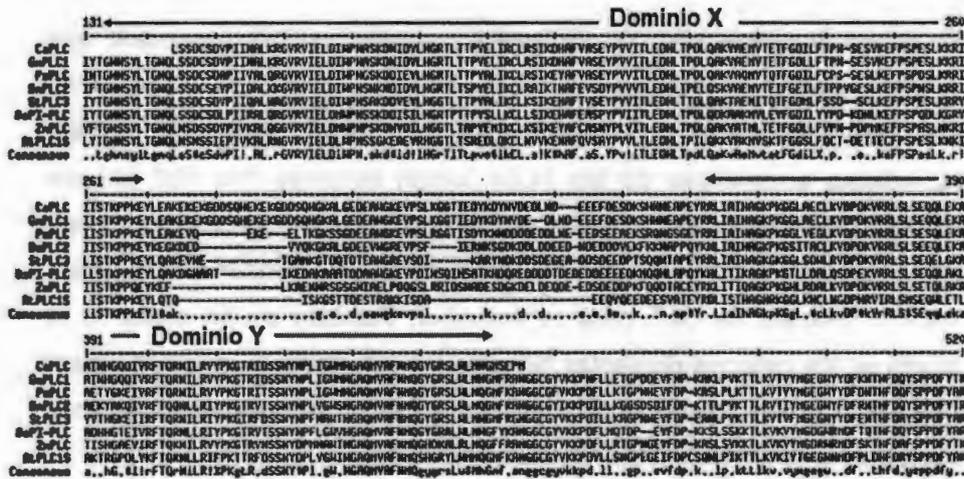


Figura 2.5. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos que forman el dominio catalítico X e Y de las PI-PLC de plantas. Organismo y número de acceso; *Coffea arabica* (CaPLC, EU574912); *Glycina max* (GmPLC1, U25027); *Pisum sativum* (PsPLC, Y15253); *Brassica napus* (BnPLC2, AF108123); *Solanum tuberosum* (SiPLC3, X94289); *Oryza sativa* (OsPI-PLC, AF332874); *Zea mays* (ZmPLC, AY536525); *Arabidopsis thaliana* (AtPLC1s, D38544) (Tomado de Sánchez-Cach *et al.*, 2008).

2.8 REFERENCIAS

Arroyo-Serralta, G. A., Ku-González, A., Hernández-Sotomayor, S. M. T., y Zúñiga-Aguilar, J. J. (2005). Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 27-35.

Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., y Dennis, E. A. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39: 175-189.

Boss, W., Lynch, D. V., y Wang, X. (2008). Lipid-mediated signaling. En: Y. Zhenbiao (Ed.). *Intracellular signaling in plants*. Riverside, CA, USA. pp. 202.

Cho, M. H., Tan, Z., Erneux, C., Shears, S. B., y Boss, W. F. (1995). The effects of mastoparan on the carrot cell plasma membrane polyphosphoinositide phospholipase C. *Plant Physiology*. 107: 845-856.

Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G., y Doi, R. H. (2001). La célula: organización bioquímica. En: Limusa wiley (Ed.). *Bioquímica fundamental*. México. pp. 307.

Cowan, A. (2006). Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*. 48: 97-109.

Dowd, P. E., Coursol, S., Skirpan, A. L., Kao, T. H., y Gilroy, S. (2006). Petunia phospholipase C1 is involved in pollen tube growth. *The Plant Cell*. 18: 1438-1453.

Echevarria-Machado, I., Ramos-Díaz, A., Brito-Agáez, L., Racagni-Di Palma, G., Loyola-Vargas, V. M., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2005). Polyamines modify the components of phospholipids-based signal transduction pathway in *Coffea arabica* L. cells. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 874-881.

Fan, L., Zheng, S., y Wang, X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*. 9: 2183-2196.

Frentzen, M. (2004). Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 270-276.

- Fukami, K. (2002).** Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *The Journal of Biochemistry*. 131: 293-299.
- Hunt, L., Otterhag, L., Lee, J. C., Lasheen, T., Hunt, J., Shinozaki, K., Sommarin, M., Gilmour, D. J., Pical, C., y Gray, J. E. (2004).** Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms. *New Phytologist*. 162: 643-654.
- Hwang, J. I., Oh, Y. S., Shin, K. J., Kim, H., Ryu, S. H., y Suh, P. G. (2005).** Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC- ϵ . *Biochemical Journal*. 389: 181-186.
- Kamat, A. y Carpenter, G. (1997).** Phospholipase C- γ : Regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 8: 109-117.
- Kanematsu, T., Jang, I. S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Kakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N., Hirata, M., y Nakayama, K. I. (2002).** Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA_(A) receptor function. *European Molecular Biology Organization Journal*. 21: 1004-1011.
- Kim, M. J., Kim, E., Ryu, S. H., y Suh, P. G. (2002).** The mechanism of phospholipase C- γ regulation. *Experimental and Molecular Medicine*. 32: 101-109.
- Kopka, J., Pical, C., Gray, J. E., y Muller-Rober, B. (1998).** Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiology*. 116: 239-250.
- Lee, H., Mills, L. N., Pical, C., Leckie, C. P., Aitken, F. L., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., Mcainsh, M. R., Hetherington, A., y Gray, J. E. (2003).** Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *The Plant Journal*. 34: 47-55.
- Lee, H. Y., Bahn, S. C., Kang, Y. M., Lee, K. H., Kim, H. J., Noh, E. K., Palta, J. P., Shin, J. S., y Ryu, S. B. (2003).** Secretory low molecular weight phospholipase A₂ plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 15: 1990-2002.
- Legendre, L., Yueh, Y. G., Crain, R., Haddock, N., Heinsteins, P. F., y Low, P. S. (1993).** Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *The Journal Biological Chemistry*. 268: 24559-24563.

Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E. A. C., Webb, A. A. R., Manison, N. F., Brownlee, C., Skepper, J. N., Chen, J., Prestwich, G. D., y Brearley, C. A. (2003). Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 10091-10095.

Lin, W. H., Ye, R., MA, H., Xu, Z. H., y Xue, H. W. (2004). DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Research*. 14: 34-45.

Liu, K., Li, L., y Luan, S. (2005). An essential function of phosphatidylinositol phosphates in activation of plant shaker-type K⁺ channels. *The Plant Journal*. 42: 433-443.

Martínez-Estévez, M., Palma, G. R. D., Muñoz-Sánchez, J. A., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V. M., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology*. 160: 1297-1303.

Pical, C., Sandelius, A. S., Melin, P. M., y Sommarin, M. (1992). Polyphosphoinositide phospholipase C in plasma membranes of wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant Physiology*. 100: 1296-1303.

Mills, L. N., Hunt, L., Leckie, C. P., Aitken, F. L., Wentworth, M., Mcainsh, M. R., Gray, J. E., y Hetherington, A. M. (2004). The effects of manipulating phospholipase C on guard cell ABA-signalling. *Journal of Experimental Botany*. 55: 199-204.

McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., y Willard, F. S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62: 551-577.

Nakahara, M., Shimosawa, M., Nakamura, Y., Irino, Y., Morita, M., Kudo, Y., y Fukami, K. (2005). A novel phospholipase C, PLC η_2 , is a neuron-specific isozyme. *The Journal of Biology Chemistry*. 280: 29128-29134.

Osawa, H. y Matsumoto, H. (2001). Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root Apex. *Plant Physiology*. 126: 411-420.

- Otsuki, M., Fukami, K., Kohno, T., Yokota, J., y Takenawa, T. (1999).** Identification and characterization of a new phospholipase C-like protein, PLC-L2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 266: 97-103.
- Pan, Y. Y., Wang, X., Ma, L. G., y Sun, D. Y. (2005).** Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from *Lilium davidi* pollen. *Plant Cell Physiology*. 46: 1657-1665.
- Park, K. Y., Jung, J. Y., Park, J., Hwang, J. U., Kim, Y. W., Hwang, I., y Lee, Y. (2003).** A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiology*. 132: 92-98.
- Perera, I. Y., Heilmann, I., y Boss, W. F. (1999).** Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 5838-5843.
- Piña-Chable, M. L., De los Santos-Briones, C., Muñoz-Sánchez, J. A., Echevarría-Machado, I., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1998).** Effect of different inhibitors on phospholipase C activity in *Catharantus roseus* transformed roots. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 56: 19-31.
- Ramos-Díaz, A., Brito-Argáez, L., Munnik, T., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2007).** Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta*. 225: 393-401.
- Rebecchi, M. J. y Pentylala, S. N. (2000).** Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews*. 80: 1291-1335.
- Rengel, Z., y Robinson, D. L. (1989).** Competitive Al^{3+} inhibition of net Mg^{2+} uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. *Plant Physiology*. 91: 1407-1413.
- Repp, A., Miraki, K., Mittman, F., y Hartman, E. (2004).** Phosphoinositide-specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*. 40: 250-259.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., y Randall, P. J. (1995).** Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Functional Plant Biology*. 22: 531-536.

Ryu, S. B. (2004). Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends in Plant Science*. 9: 229-235.

Sanchez, J. P. y Chua, N. H. (2001). *Arabidopsis* PLC₁ is required for secondary responses to abscisic acid signals. *The Plant Cell*. 13: 1143-1154.

Sánchez-Cach, L. A., Ortiz-García, M. M., Minero-García, Y., Muñoz-Sánchez, J. A., Hernández-Sotomayor, S. M. T., Suárez-Solis, V. M., y De los Santos-Briones, C. (2008). Isolation of cDNA encoding the catalytic site of phosphatidylinositol specific phospholipase C from *Coffea arabica* L. *Plant Signaling & Behavior*. 3: 913-916.

Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., y Lai, F. A. (2002). PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129: 3533-3544.

Scherer, G. F. E. (2002). Secondary messengers and phospholipase A₂ in auxin signal transduction. *Plant Molecular Biology*. 49: 357-372.

Song, C., Hu, C. D., Masago, M., Kariya, K. I., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T., y Kataoka, T. (2001). Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras. *The Journal Biological Chemistry*. 276: 2752-2757.

Staelin, L. A. y Newcomb, E. H. (2000). Membrane structure and membranous organelles. En: B. B. Buchanan, W. Gruissem, y R. L. Jones (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. pp. 2.

Stevenson, J. M., Perera, I. Y., Heilmann, I., Persson, S., y Boss, W. F. (2000). Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science*. 5: 252-258.

Tate, B. F., Schaller, G. E., Sussman, M. R., y Crain, R. C. (1989). Characterization of a polyphosphoinositide phospholipase C from the plasma membrane of *Avena sativa*. *Plant Physiology*. 91: 1275-1279.

Tasma, I. M., Brendel, V., Whitham, S. A., y Bhattacharyya, M. K. (2008). Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 627-637.

van Leeuwen, W., Okresz, L., Bogre, L., y Munnik, T. (2004). Learning the lipid language of plant signalling. *Trends in Plant Science*. 9: 378-384.

Valadez-González, N., Colli-Mull, J., Brito-Argáez, L., Muñoz-Sanchez, J. A., Zúñiga-Aguilar, J. J., Castaño, E., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2007). Differential effect of aluminum on DNA synthesis and CDKA activity in two *Coffea arabica* cell lines. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 69-77.

Venkataraman, G., Goswami, M., Tuteja, N., Reddy, M. K., y Sopory, S. K. (2004). Isolation and characterization of a phospholipase C delta isoform from *pea* that is regulated by light in a tissue specific manner. *Molecular Genetics and Genomics*. 270: 378-386.

Verstraeten, S. V., Villaverde, M. S., y Oteiza, P. I. (2003). Al³⁺-mediated changes on membrane fluidity affects the activity of PI-PLC but not of PLC. *Chemistry and Physics of Lipids*. 122: 159-163.

Wang, X. (2001). Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 211-231.

Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology*. 139: 566-573.

Yakimova, E. T., Kapchina-Toteva, V. M., y Woltering, E. J. (2007). Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology*. 164: 702-708.

Zhai, S., Sui, Z., Yang, A., y Zhang, J. (2005). Characterization of a novel phosphoinositide-specific phospholipase C from *Zea mays* and its expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 27: 799-804.

Zonia, L. y Munnik, T. (2006). Cracking the green paradigm: functional coding of phosphoinositide signals in plant stress responses. *Subcellular Biochemistry*. 39: 205-236.

CAPÍTULO III

Silenciamiento transitorio de la fosfolipasa C

Parte de estos resultados fueron enviados para su publicación a la revista Molecular Biotechnology

3.1 INTRODUCCIÓN

Se ha considerado que la tecnología del ADN recombinante puede funcionar como una herramienta para la manipulación genética y el mejoramiento de diversos cultivos, sin embargo, la aplicación de esta tecnología demanda formas eficientes de transferencia del material genético dentro de las células y poder generar plantas fértiles. Por esta razón se han desarrollado diferentes técnicas para la introducción de material genético foráneo. Entre los métodos de transferencia de material genético se encuentran: la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, la transformación por electroporación mediante la generación de poros transitorios en la membrana plasmática (Fromm *et al.*, 1986), la transformación por biobalística a través del uso de micropartículas de oro (Klein *et al.*, 1987), la transformación por polietilenglicol-calcio (PEG-Ca²⁺) a través de liposomas (Deshayes *et al.*, 1985) y la transformación por microinyección (Crossway *et al.*, 1986).

Los protoplastos son células sin pared celular; este tipo de células son ampliamente utilizados en estudios donde se evalúa la función de genes involucrados en procesos celulares y también son utilizados en estudios de fusión de protoplastos para la obtención de plantas con resistencia a herbicidas. Los protoplastos han permitido evaluar la función de genes en breve tiempo, mediante el empleo de genes reporteros y como resultado, el desarrollo de diferentes métodos de transformación, siendo una de las más utilizadas la electroporación. Este método consiste en la generación de

poros temporales en la membrana plasmática mediante la aplicación de una corriente eléctrica.

La transformación transitoria es utilizada para la evaluación de la función de genes en rutas metabólicas durante períodos cortos de tiempo (Barandiaran *et al.*, 1998; Ferrer *et al.*, 2000). Este sistema de transformación no involucra la incorporación del material genético en el genoma de la planta y es de gran utilidad en especies vegetales que son recalcitrantes y por lo tanto difíciles de transformar (Spolaore *et al.*, 2001).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Amplificación del dominio catalítico de la PLC

A partir de un fragmento de ADNc de 926 pb que codifica para el dominio catalítico de la fosfolipasa C (Sánchez-Cach *et al.*, 2008), se amplificó un fragmento de 281 pb por PCR y se clonó en el vector pENTR/D TOPO, los cebadores utilizados para la amplificación (FPLC y RPLC) y el tamaño del fragmento clonado se muestran en la figura y cuadro 3.1. Al cebador forward FPLC se le agregó la secuencia **CACC** para dirigir la clonación en el vector pENTR/D TOPO. Se realizó la secuenciación del fragmento clonado para confirmar que lo que se clonó fue el tamaño y la secuencia de la PLC.

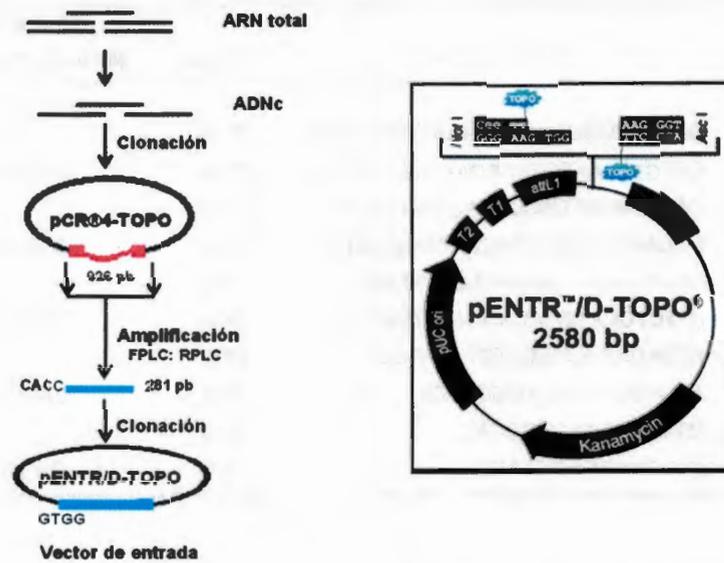


Figura 3.1. Clonación del dominio catalítico de la PLC de *C. arabica*, amplificación y clonación del fragmento de 281 pb para la construcción del vector de entrada, pENTR/D-TOPO.

Cuadro 3.1. Cebadores utilizados para la amplificación y clonación del fragmento de 281 pb en pENTR.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Longitud	Tamaño del producto esperado
FPLC1	GGTTGTCGGGTGATTGAATTGGACATA	27 nt	
RPLC1	CATGTAAATGCAACCATCTGAGCTCC	27 nt	926 pb
FPLC	CACCCAAACCACCTAAGGAGTACC	24 nt	
RPLC	CCCAGCATGAATTGCAATTAGGCG	24 nt	281 pb
WRKY5'	GCAGAGGAGGAGAAGCTTCTAG	22 nt	
WRKY3'	CTTCTCAACCACAGGAATTCATC	24 nt	150 pb
Ftubulina 1	ATGAGAGAGTGCATCTCCATCC	22 nt	
Rtubulina 1	ATGAGCTGCTCAGGGTGGA	19 nt	278 pb
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	16 nt	
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17 nt	600 pb

3.2.2 Vector de entrada (pENTR /D-TOPO)

El producto de PCR fue clonado en el vector pENTR/D-TOPO de acuerdo al procedimiento proporcionado por el proveedor (ENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Invitrogen). El producto de la ligación fue introducido a células competentes de *E. coli* DH5α por el método de electroporación. Las células de *E. coli* fueron crecidas después de la electroporación en medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) a 37°C por 30 minutos y luego se plaquearon 100 µL de la suspensión celular de *E. coli* en cajas petri con agar LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L y agar 15 g/L) adicionadas con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente se seleccionaron 10 colonias de las placas que presentaron crecimiento y estas fueron crecidas en medio LB líquido con kanamicina (50 µg/mL) a 37°C por 24 horas. Posteriormente mediante PCR en colonia se seleccionaron las colonias que presentaban el fragmento clonado de 281 pb. Finalmente las colonias que amplificaron el fragmento

de 281 pb se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina con el estuche comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (Birnboim y Doly, 1979).

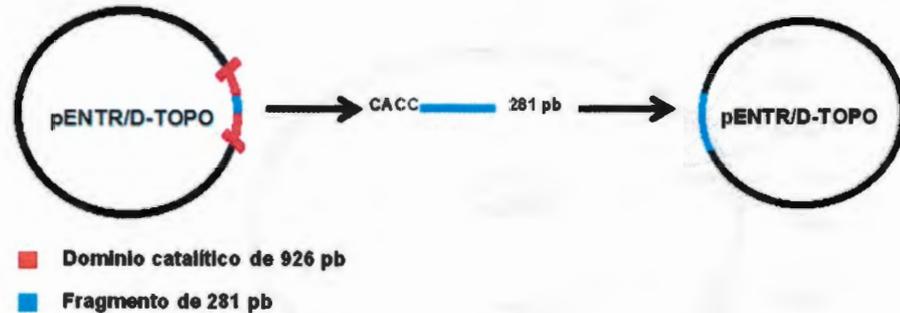


Figura 3.2. Construcción del vector de entrada.

3.2.3 Replicación y purificación del vector destino

Para la replicación del vector destino pTDT (figura 3. 3) se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5α con 2 μg/μL de ADN plasmídico. Después se plaquearon 100 μL de la suspensión celular en cajas petri con agar LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L y agar 15 g/L) adicionado con el antibiótico espectinomicina (100 μg/mL) y las cajas fueron incubadas por 24 horas a 37°C. Para la purificación del ADN plasmídico, se seleccionaron 10 colonias de las cajas petri que presentaron crecimiento y se sembraron en medio LB líquido adicionado con espectinomicina (100 μg/mL) y se incubaron por 24 horas a 37°C, posteriormente se les extrajo el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina con el estuche comercial de GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (Birnboim y Doly, 1979).

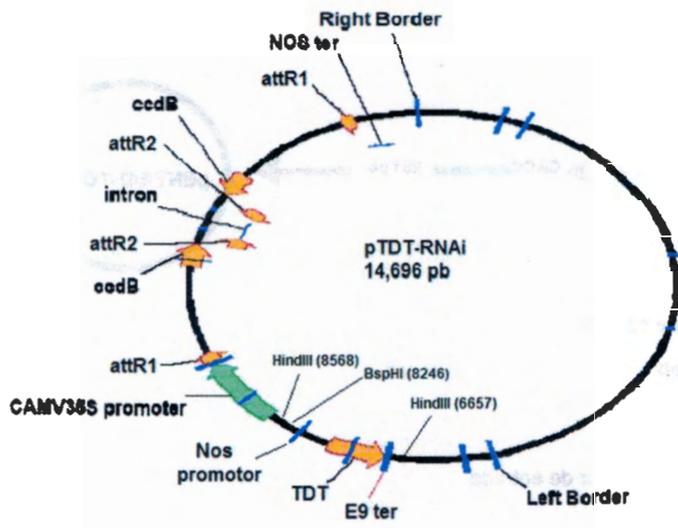


Figura 3.3. Mapa del vector destino pTDT-ARNi. BD, borde derecho; BI, borde izquierdo; attR1 y attR2, secuencias de recombinación; CAMV35S, *Cauliflower mosaic virus* promotor constitutivo; TDT, proteína roja fluorescente de tomate; NOS ter, terminador nopalina sintasa; NOS promotor, promotor nopalina sintasa; E9 ter, rbcS-E9 terminador.

3.2.4 Obtención del constructo de silenciamiento pTDT-ARNi-PLC mediante recombinación

Para obtener el constructo de ARNi de interferencia (pTDT-ARNi-PLC), se realizó la mezcla de los vectores (pENTR y pTDT-ARNi) previamente purificados. La mezcla de reacción se realizó como lo indica el manual del proveedor (pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Invitrogen). La mezcla consistió en lo siguiente: 60 ng/μL del vector de entrada (pENTR D TOPO), 176 ng/μL del vector destino (pTDT-ARNi), 3 μL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.0 mM pH 8.0) y 2 μL de la enzima LR Clonasa Mix (Invitrogen). Esta reacción fue incubada a 25°C por 1h, la reacción se finalizó agregando 1 μL de la proteinasa K (2 μg/μL) e incubando a 37°C por 10 min.



Figura 3.4. Construcción del vector pTDT-ARNi-PLC por recombinación de los vectores de entrada y destino.

3.2.5 Obtención y análisis de las clonas que contienen el fragmento de la PLC en sentido y antisentido

Se tomaron 2.5 μ L de la reacción de recombinación y se transformaron por electroporación células competentes de *E.coli* DH5 α (25 μ F, 2.4 volts: Gene Pulser system, Bio-Rad). Las células electroporadas se incubaron a 37°C por 1h en medio SOC (ver apartado 3. 2. 5). Luego se plaquearon 100 μ L de la suspensión celular en cajas petri con agar LB (ver apartado 3. 2. 5) adicionado con 100 μ g/mL de espectinomicina y se incubaron a 37°C por 24h. Se eligieron 10 colonias bacterianas y fueron sembradas en medio LB líquido adicionado con espectinomicina, cada una de estas colonias fueron analizadas como se menciona inmediatamente. Para conocer la orientación en la cual el fragmento de 281 pb de la PLC fue clonado en el vector destino, se realizó lo siguiente: la orientación sentido del fragmento se analizó mediante una PCR empleando los cebadores WRKY'5 y FPLC y la orientación en antisentido se determinó por una PCR utilizando los cebadores WRKY'3 y FPLC (cuadro 3.1 y figura 3.5). Las clonas que presentaron el tamaño del fragmento esperado y las orientaciones adecuadas se seleccionaron y una de ellas fue crecida en medio LB líquido

adicionado con el antibiótico espectinomicina y se le extrajo el ADN plasmídico con el estuche comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (Birnboim y Doly, 1979).

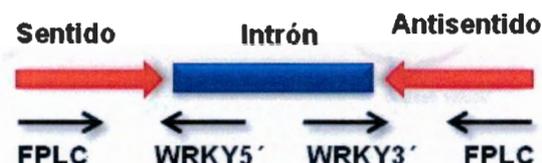


Figura 3.5. Análisis de la orientación del fragmento de la PLC en clonas de *E. coli*. Sentido, FPLC y WRKY5'; Antisentido, FPLC y WRKY3' (Ver cuadro 3.1).

3.2.6 Secuenciación del fragmento clonado

De las clonas de *E. coli* DH5 α que dieron positivo al análisis de orientación (Ver figura 3.5), una fue seleccionada y se le extrajo el ADN plasmídico (pTDT-ARNi-PLC) con el estuche comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas. Posteriormente se determinó la concentración y se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología (UNAM) en Cuernavaca Morelos en un equipo de secuenciación Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730.

3.2.7 Condiciones de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Las células en suspensión de *C. arabica* L fueron cultivadas cada 14 días en medio MS (sacarosa 30 g/L, 140 μ M cisteína HCl, 560 μ M mio-inositol, 30 μ M tiamina HCl, 13.6 μ M ácido 2,4 dicloro-fenoxiacético y 4.4 μ M de 6-bencil-aminopurina) modificado a la mitad de la fuerza iónica (Martínez-Estevéz *et al.*, 2001). Las suspensiones celulares fueron cultivadas en condiciones de oscuridad a 25 °C y una agitación de 100 rpm.

3.2.8 Obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares

Células de 16 días del ciclo de cultivo fueron separadas del medio de cultivo por filtración al vacío y lavadas 4 veces con agua estéril. Se pesó 1 g de células y se depositó en una caja petri con 10 mL de medio de aislamiento de protoplastos: 87 mM sacarosa, 10 mM NH_4NO_3 , 10 mM KCl, 625 μM KH_2PO_4 , 20 mM CaCl_2 , 400 mM sorbitol, celulicina 10 g/L, macerasa 2 g/L, driselasa 2 g/L y pectinasa 10 % (v/v).

La mezcla de suspensiones celulares y medio de aislamiento fue incubada a 28°C por 18 horas y una agitación de 30 inversiones por minuto. Esta mezcla se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL, el cual se mantuvo tapado y sin agitación por una hora con el fin de que los protoplastos sedimentaran. Después de este tiempo el sobrenadante se retiró manualmente con el uso de una pipeta. Los protoplastos obtenidos fueron resuspendidos manualmente y con mucho cuidado con un volumen de 10 mL del medio de aislamiento pero sin las enzimas hidrolíticas. Después de este procedimiento, los protoplastos se dejaron tapados a temperatura ambiente durante una hora. En este protocolo no se utilizó centrifugación debido a la fragilidad de los protoplastos, por lo que solamente se manejó la fuerza de gravedad natural, dejando sedimentar a los protoplastos. Transcurrido este tiempo (una hora) se retiró el sobrenadante (medio de aislamiento de protoplastos sin enzimas hidrolíticas) por decantación con mucho cuidado. Este proceso de lavado se repitió dos veces consecutivas. Después del último lavado, se retiró con una pipeta automática el sobrenadante. Los protoplastos fueron resuspendidos en 5 mL de medio de aislamiento sin enzimas hidrolíticas y observados al microscopio de fluorescencia (Axioplan, Zeiss) para su cuantificación utilizando una cámara de Neubauer. En este protocolo no se utilizó ninguna sustancia para purificar a los protoplastos ya que con el procedimiento consecutivo de la decantación y lavado con medio fresco, se eliminó más del 80% de la pared celular.

3.2.9 Evaluación de la concentración de polietilenglicol (PEG) sobre la viabilidad de los protoplastos

Se trataron 10×10^6 protoplastos con diferentes concentraciones de PEG (10, 15 y 20, 25 y 30%). La mezcla de reacción fue la siguiente: protoplastos 100 μL (10×10^6), 50 μL de agua bidestilada y el volumen de PEG fue ajustado hasta alcanzar las concentraciones mencionadas anteriormente. Esta mezcla fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente y la reacción fue finalizada agregando 700 μL de medio de aislamiento de protoplastos. Luego esta mezcla fue centrifugada a $70 \times g$ por 10 minutos y los protoplastos fueron observados al microscopio y cuantificados mediante una cámara Neubauer.

3.2.10 Evaluación de la viabilidad de los protoplastos

La evaluación de la viabilidad de los protoplastos se realizó por el método de Liu y colaboradores (2008) el cual consiste en mezclar 25 μL de una solución de diacetato de fluoresceína (5 mg/mL de acetona) con 2 mL de medio de aislamiento de protoplastos. Posteriormente se tomaron 250 μL de la mezcla anterior y se mezclaron nuevamente con 250 μL de una suspensión de protoplastos (10×10^6). Esta última fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad y los protoplastos viables presentaron formas circulares y de color verde al ser observados al microscopio de fluorescencia (Axioplan, Zeiss) a 490-514 nm.

3.2.11 Extracción de ARN para amplificar a la PLC y a la tubulina

Para la extracción del ARN total de protoplastos se siguió el procedimiento proporcionado por el proveedor (TRIZOL Reagent, Invitrogen). Se utilizaron 30 μL de la suspensión de protoplastos (5×10^6) y se añadió 1mL del reactivo TRIZOL. A esta mezcla se le añadieron 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos seguido de una centrifugación a 12 000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, al cual se le añadieron 500 μL de alcohol isopropílico concentrado (grado biología molecular, SIGMA) y luego se incubó a 0 °C durante 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 12 000 x g durante 15 minutos y el precipitado fue lavado con etanol-DEPC-H₂O (DEPC: dieteilpirocabonato) al 70 % y resuspendido en 20 μL de agua tratada con DEPC.

3.2.12 RT-PCR

Para la RT-PCR de la PLC y de la tubulina se utilizó el estuche comercial OneStep RT-PCR kit, QIAGEN. Para amplificar el fragmento de 281 pb de la PLC se utilizaron los cebadores FPLC y RPLC, mientras que para la tubulina se utilizaron los cebadores Ftubulina 1 y Rtubulina 1 (ver cuadro 3.1). En breve se tomaron 2 μL del ARN obtenido en la sección 3.2.12 y se mezclaron con los componentes proporcionados por el estuche comercial hasta alcanzar un volumen final de 25 μL . Esta mezcla fue sometida a transcripción reversa a 50°C por 30 minutos y un paso de 95°C por 15 minutos para inactivar a la enzima transcritasa reversa. Posteriormente se continuó con los ciclos de la PCR, 35 ciclos (95°C, 1 minuto; 60°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto) y un paso final de 72°C por 10 minutos. Es importante aclarar que las condiciones de amplificación antes mencionadas fueron las mismas para la PLC y la tubulina. Los productos de la amplificación fueron

cargados en un gel de agarosa al 1%, corridos por 35 minutos y observados en el fotodocumentador de Bio-Rad.

3.2.13 Transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG) 3,350

La transformación de los protoplastos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Yoo y colaboradores (2007) y Zhai y colaboradores (2009) con modificaciones. En breve se tomaron 100 μL de la suspensión de protoplastos (10×10^6), se centrifugaron por 5 minutos a $60 \times g$ y se resuspendieron en 100 μL de medio C100s (400 mM sorbitol, 15 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L MES, pH 5.7). A la suspensión anterior se le añadieron 50 μL de plásmido (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se agitó suavemente y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Esta cantidad de plásmido para la transformación fue seleccionada de acuerdo a lo reportado por Bart y colaboradores (2006). Después de este tiempo se le agregaron gota a gota 150 μL de una solución de polietilenglicol al 40 % (p/v) en medio C100s pH 7.0 y se incubó por 15 minutos con una agitación suave cada 5 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 700 μL de solución de aislamiento de protoplastos y fue centrifugada a $60 \times g$ por 10 minutos, para separar los protoplastos de la mezcla anterior. El sobrenadante fue removido con una pipeta automática. Los protoplastos se resuspendieron en medio de aislamiento de protoplastos sin enzimas hidrolíticas e inmediatamente incubados en oscuridad, muestreados a las 24, 48 y 72 horas después de la transformación y observados al microscopio de fluorescencia (Axioplan, Zeiss) a 554-581 nm. El porcentaje de transformación aproximada fue del 25% determinada por conteo al microscopio. Las condiciones finales para la separación de los protoplastos transformados se tomaron en base a los resultados obtenidos en donde se separaron los protoplastos tratados con PEG y que se describe en la sección de resultados (sección 3.3.7).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Amplificación del fragmento a clonar a partir del dominio catalítico de la PLC

Para la construcción del vector para silenciar a la PLC, se amplificó a partir del dominio catalítico de la PLC de 926 pb previamente clonada en el vector pCR[®]4-TOPO un fragmento de 281 pb (ver figura 3.1) utilizando los cebadores FPLC y RPLC que se muestran en el cuadro 3.1. También se realizó la validación de los cebadores antes mencionados por lo que fue necesario la aplicación de un gradiente de temperaturas (55, 60 y 65 °C). Los resultados se muestran en la figura 3.6, en esta se puede observar que el fragmento de 281 pb de la PLC puede amplificarse en cualquiera de las temperaturas seleccionadas para el gradiente. Por lo tanto se seleccionó la temperatura de 60°C para amplificar el fragmento y realizar la clonación en el vector pENTR.

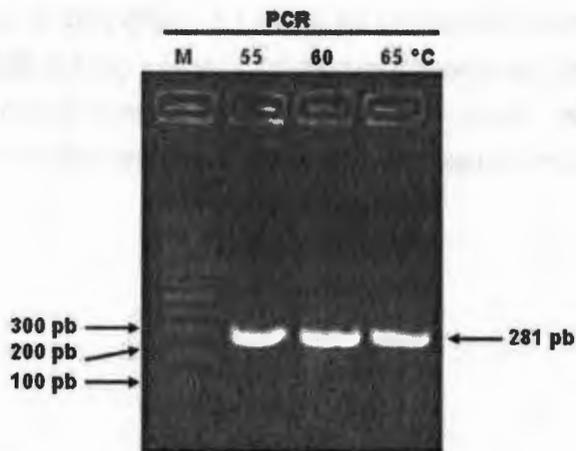


Figura 3.6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción en bromuro de etidio de los productos de PCR de gradiente para la amplificación del fragmento de 281 de la PLC. Los cebadores utilizados fueron FPLC y RPLC; el template para la amplificación fue el dominio catalítico completo de 926 pb de la PLC; la *Taq* polimerasa utilizada en la PCR fue la *pfu*; M, marcador de peso molecular Hipertadder IV (Biolabs); 50, 60 y 65°C, temperaturas del gradiente para la validación de los cebadores.

3.3.2 Construcción del vector de entrada

Después de la amplificación del fragmento de 281, este fue clonado en el vector pENTR en la región comprendida entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *NofI* y *Ascl*. Después de que las células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas por electroporación con el vector de entrada, se seleccionaron y analizaron por PCR 11 clonas y se eligió aquella que presentó el tamaño del fragmento esperado. En la figura 3.7 se puede observar el resultado obtenido durante el análisis por PCR de las clonas, es importante aclarar que se utilizaron dos pares de cebadores, el primer par M13F:M13R se ancló en el vector de entrada y por lo tanto esperaríamos obtener un fragmento de 600 pb aproximadamente y el segundo par FPLC:RPLC los cuales amplifican un tamaño de 281 pb.

Como puede verse de las 11 clonas analizadas (seis con M13F:M13R y cinco con FPLC:RPLC) solamente la clona C-1 presentó el fragmento de 600 pb. Esta clona fue crecida en medio LB líquido para la replicación del ADN plasmídico y su posterior extracción. Mientras que las clonas de la C-7 a la C-11 que dieron positivo para el fragmento de 281 pb fueron resguardadas para su posterior análisis con los cebadores M13F y M13R.

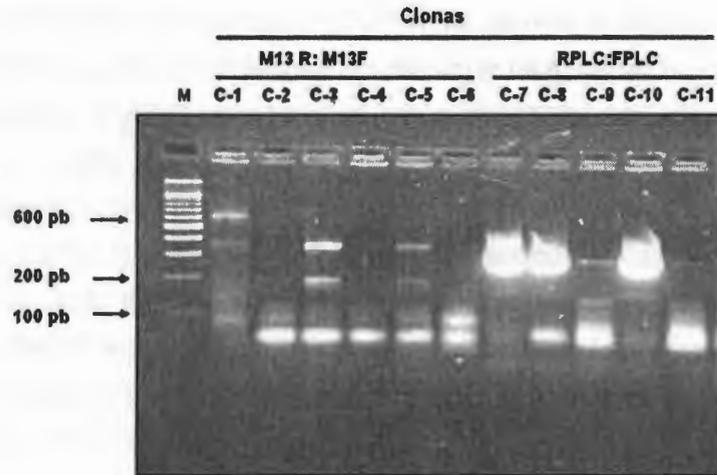


Figura 3.7. Construcción del vector de entrada. Análisis de las clonas por PCR en colonia. (M) marcador de peso molecular; (C-1 a C-6) clonas analizadas con cebadores M13R y M13F del vector pENTR/D-TOPO; (C-7 a C-11) clonas analizadas con cebadores de la PLC (FPLC y RPLC).

3.3.3 Recombinación y construcción del vector para ARNi

Para el silenciamiento de la PLC se diseñó un constructo plasmídico, el cual fue nombrado pTDT-ARNi-PLC. Este diseño fue realizado aprovechando las bondades de recombinación homóloga sitio dirigido de los vectores de entrada (ver figura 3.2) y destino (ver figura 3.3), el procedimiento de construcción se mencionó en Materiales y Métodos. Las células de *E.coli* DH5 α fueron transformadas por electroporación con la mezcla de recombinación y cultivadas en medio LB sólido. Nueve clonas fueron seleccionadas, crecidas en medio LB líquido adicionado con espectinomicina y analizadas para determinar su orientación en sentido y antisentido a través del uso de cebadores que se mencionaron el apartado 3.2.5. Los resultados se muestran en la figura 3.8, en esta se puede observar que las nueve colonias seleccionadas y evaluadas por PCR, presentaron la orientación sentido y antisentido cuando fueron analizadas

con los cebadores FPLC y WRKY (ver apartado 3.2.5). Los números 1 y 2 indican la orientación en sentido (FPLC y WRKY'5) y antisentido (FPLC y WRKY'3) del fragmento clonado de la PLC respectivamente. También se pudo detectar una variación en el tamaño del fragmento de 281 pb a 380 pb aproximadamente, esto es debido a que los cebadores WRKYs utilizados para determinar la orientación son complementarios a una región de la secuencia del intron presente en el vector destino. En base a estos resultados se decidió seleccionar una clona que dió positivo al tamaño del fragmento y a la presencia de ambas orientaciones. A esta clona se le realizó la extracción del ADN plasmídico y para confirmar que el fragmento de la PLC se clonó en la orientación correcta (ver figura 3.9) se realizó la secuenciación del mismo en las instalaciones del IBT de Cuernavaca Morelos (UNAM).

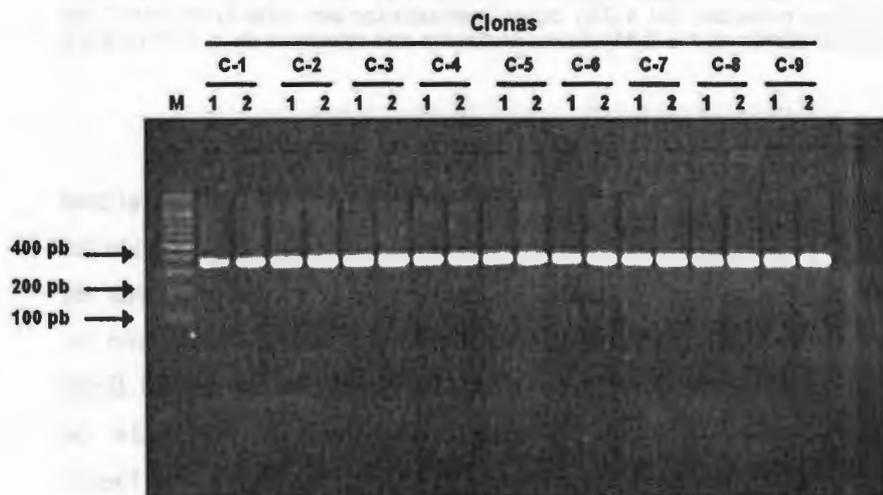


Figura 3.8. Análisis de la orientación del fragmento en las clonas obtenidas de la recombinación en gel de agarosa al 1%. (M) marcador de peso molecular; (C-1 a C-9) número de clona; (1) cebadores FPLC y WRKY 5'; (2) FPLC y WRKY3'. PCR en colonia, el fragmento esperado 380 pb aproximadamente. FPLC es cebador forward del gen de la fosfolipasa C y WRKYs son cebadores diseñados a partir del intrón del vector pTDT-ARNi.

3.3.5 Obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares

Como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, los protoplastos fueron obtenidos a partir de células en suspensión de 16 días del ciclo de cultivo de *C. arabica* (ver figura 3.10A). Este día se eligió en base a resultados anteriores de nuestro laboratorio en donde se realizó una curva de cultivo de las suspensiones celulares y se determinó que el pico de mayor actividad enzimática de la PLC está entre los días 14 y 16 del ciclo de cultivo (Dr. Manuel Martínez, comunicación personal). Así mismo Sánchez-Cach y colaboradores (2008) extrajeron el ARN de suspensiones celulares del día 16 del ciclo de cultivo para la realización de la RT-PCR en la cual se obtuvo el ADNc que codifica para la región catalítica de la PLC de *C. arabica*. Después de que las suspensiones celulares de café se incubaron en una solución con enzimas hidrolíticas de la pared celular, los protoplastos fueron separados, lavados y resuspendidos en medio de aislamiento sin enzimas hidrolíticas. Los resultados se muestran en la figura 3.10. Es importante mencionar que a partir de 10 horas de incubación con las enzimas hidrolíticas, ya se podían observar algunos protoplastos libres; sin embargo, las células se mantuvieron en presencia de las enzimas hasta por 18 horas para la liberación completa de los protoplastos. Las concentraciones de enzimas hidrolíticas y el tiempo de incubación con las mismas fueron tomados en parte a lo reportado por Ramírez-Benitez y colaboradores (2009) y por comunicación personal de los autores. Después de las 18 horas de incubación se observaron protoplastos completamente libres y redondos (ver figura 3.10B). El rendimiento en la obtención de los protoplastos fue de 2.5 a 3.8×10^8 células/mL. Al mismo tiempo se separó una cantidad de protoplastos y se mantuvieron en el medio donde fueron aislados pero sin enzimas hidrolíticas en donde se monitoreó la viabilidad y se pudo observar que permanecían viables en un 60% hasta por 20 días, al ser analizados con el reactivo FDA.

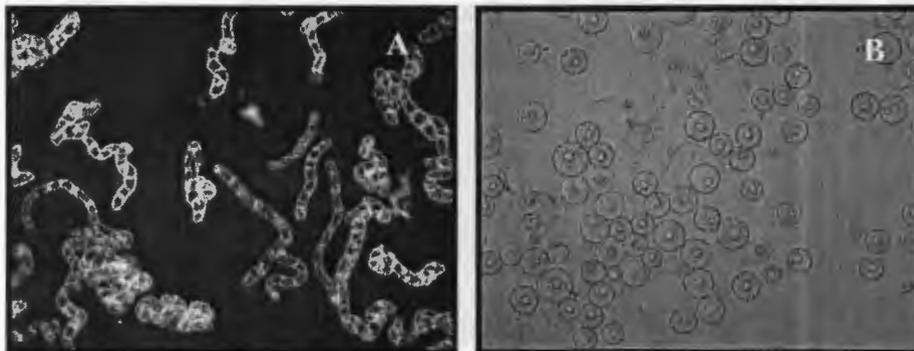


Figura 3.10. Células en suspensión de *C. arabica* y protoplastos observados al microscopio de fluorescencia. A) Células en suspensión de *C. arabica* crecidas en medio MS a la mitad de su fuerza iónica, en oscuridad y una agitación de 110 rpm durante 16 días; B) Protoplastos de *C. arabica* de 16 días del ciclo de cultivo tratadas con las enzimas celulisina 10 g/L, macerasa 2 g/L, driselasa 2 g/L y pectinasa 10 % (v/v) a 28°C en oscuridad y observadas al microscopio de campo claro.

3.3.6 Evaluación de la viabilidad de los protoplastos

Después de la liberación completa de los protoplastos, se le realizó la prueba de viabilidad utilizando el colorante diacetato de fluoresceína (5 mg / mL de acetona), este procedimiento se hizo con el objetivo de conocer como se encontraban los protoplastos después del proceso de aislamiento ya que se ha mencionado que durante el procedimiento de aislamiento las membranas sufren daños. El FDA es capaz de penetrar las membranas celulares y experimentar hidrólisis por una esterasa para producir fluoresceína en el interior de los protoplastos y proporcionar una coloración verde al ser observados en un microscopio de fluorescencia. Los resultados de la prueba de viabilidad se muestran en la figura 3.11A. La viabilidad de los protoplastos recién obtenidos fue de 90 %, a pesar de que no se realizó una curva de viabilidad de protoplastos con respecto al tiempo, después de 20 días de obtenidos se pudo observar que el 60% de los mismos fueron viables.

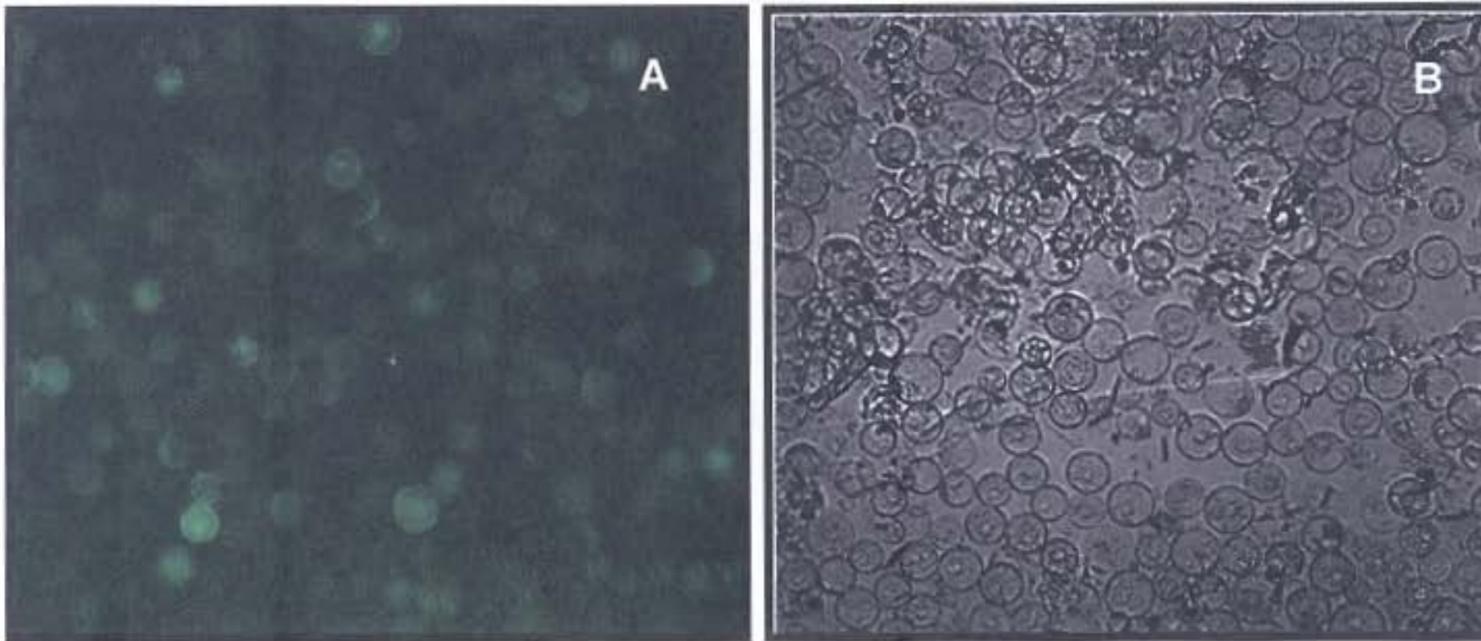
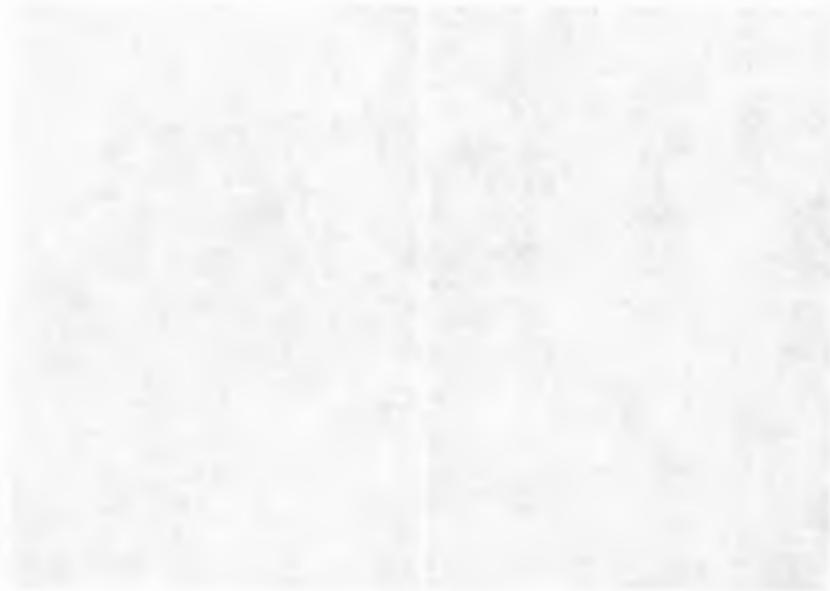


Figura 3. 11. Viabilidad de protoplastos con diacetato de fluoresceína. A) Protoplastos de *C. arabica* expuestas a FDA durante 15 minutos, concentrados por centrifugación a 70 x g durante 6 minutos a 25°C y observados en microscopio de fluorescencia; B) Protoplastos testigo sin FDA centrifugados a 70 x g durante 6 minutos a 25°C y observados al microscopio de campo claro.

3.3.7 Evaluación de la concentración de PEG sobre la viabilidad de los protoplastos

Con la finalidad de evaluar cual era la concentración más adecuada del PEG para los experimentos de transformación, se utilizaron células de 16 días del ciclo de cultivo para la obtención de protoplastos. Estos se trataron con diferentes concentraciones de PEG como se mencionó en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos de los tratamientos permitieron detectar que al aumentar la concentración de PEG el número de protoplastos se ve reducido. Se decidió trabajar con la concentración de 20 % de PEG porque proporcionó mejores resultados de transformación (figura 3.12A). Así mismo, se observó que las concentraciones más altas de PEG deshidratan con mayor rapidez que las de menor concentración en un tiempo de exposición de 15 minutos.

Durante el proceso de transformación, la ruptura de los protoplastos ocurría principalmente al detener la reacción, durante la agitación y por las altas concentraciones de PEG. Sin embargo, después del tratamiento con el polímero, los protoplastos se pudieron cultivar por dos semanas. En las figuras 3.12B, C, D y E se muestran las imágenes de los protoplastos tratados con las diferentes concentraciones de PEG. En estas se pueden observar protoplastos redondos y deshidratados pero viables. También es importante mencionar que fue posible mantener a los protoplastos por más de 20 días sin tratamiento alguno y viables pero con una reducción en su número.



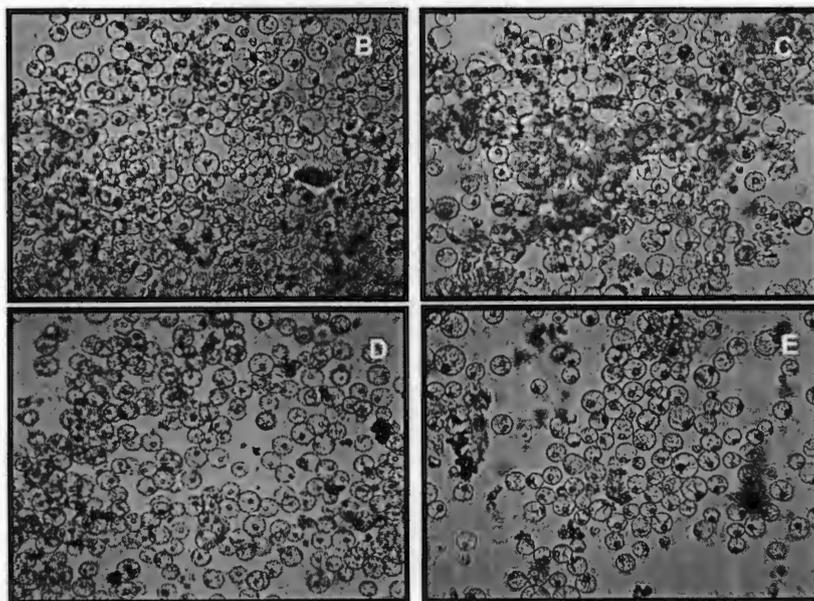
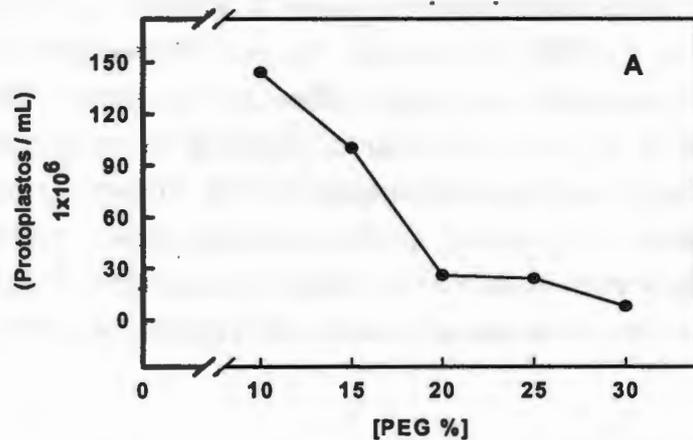


Figura 3. 12. Tratamiento de protoplastos de 16 días del ciclo de cultivo de *C. arabica* con diferentes concentraciones de PEG. A) Efecto del PEG sobre la cantidad de los protoplastos. Se trataron 200×10^6 protoplastos con 10, 15, 20 y 25% de PEG por un periodo de 15 minutos y recuperados por centrifugación a $70 \times g$ por 6 minutos. B), C), D) y E) Protoplastos tratados durante 15 minutos con 10, 15, 20 y 25 % de PEG.

Otro de los parámetros evaluados fue la velocidad de centrifugación debido a que es necesario separar los protoplastos del PEG después de la aplicación del tratamiento con este polímero. Por lo tanto se decidió utilizar las velocidades de centrifugación de 60, 70, 80, 90, 100 y 200, manteniendo el tiempo de centrifugación constante (6 minutos). Los resultados se muestran en la figura 3.13, en esta se puede observar que velocidades de 100 x g o mayores originan una reducción de aproximadamente 50% en el número de protoplastos y que a velocidades menores de 60 y 70 x g se recupera una cantidad importante de protoplastos. Por lo tanto, se decidió utilizar la velocidad menor de 70 x g en los experimentos de transformación.

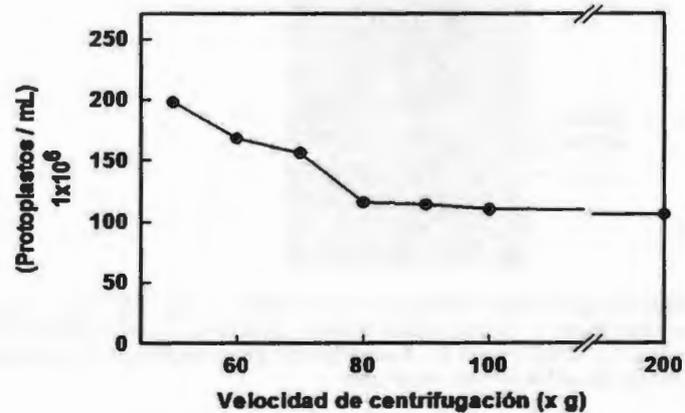


Figura 3.13. Efecto de la velocidad de centrifugación sobre el número de protoplastos de *C. arabica*. Se centrifugaron 200×10^6 protoplastos en una mezcla de reacción de 300 μ L y se centrifugaron a diferentes velocidades durante 6 minutos.

3.3.8 Extracción de ARN a partir de protoplastos

Para realizar la RT-PCR se utilizaron 5×10^6 protoplastos en un volumen final de 30 μ L. Las muestras de ARN fueron tratadas con ADNsa I y utilizadas como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los cebadores utilizados para amplificar a la PLC fueron RPLC1 y FPLC1 (cuadro 3.1) y para la tubulina fueron Ftubulina 1 y Rtubulina 1 (cuadro 3.1). Los resultados de la amplificación se muestran en la figura 3. 14. En esta se puede observar la amplificación del fragmento de 926 que pb corresponde a la PLC y el fragmento de 250 pb que corresponde a la tubulina. Con estos resultados se determinó que 5×10^6 protoplastos son suficientes para extraer ARN y amplificar a la PLC y al testigo interno de tubulina.

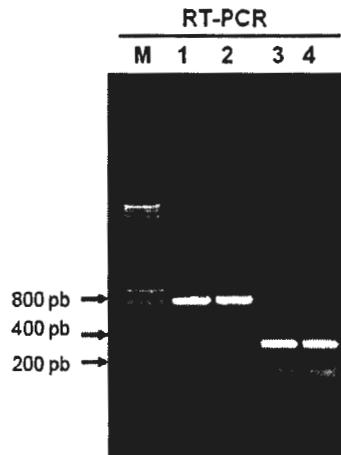


Figura 3. 14. Amplificación del dominio catalítico de la fosfolipasa C y de la tubulina a partir de ARN extraído de protoplastos de *C. arabica* recién aislados. Carril 1 y 2 amplificación de la PLC con los cebadores FPLC1 y RPLC1; carril 3 y 4 amplificación de la tubulina con los cebadores Ftubulina y Rtubulina; M, marcador de peso molecular.

3.3.9 Transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG) 3350

Después de determinar las condiciones adecuadas para realizar la transformación y de evaluar la cantidad de protoplastos necesarios para la extracción de ARN, se realizó el experimento de silenciamiento de la PLC utilizando el constructo plasmídico pTDT-ARNi-PLC. Los protoplastos fueron transformados con PEG como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la figura 3.15 en esta se puede detectar la fluorescencia emitida por la proteína roja fluorescente codificada

por el gen TDT de tomate. Así mismo esta fluorescencia fue utilizada como un indicador de la transformación y de la posible transcripción del fragmento de 281 pb clonado en el vector pTDT-ARNi. La intensidad de la fluorescencia fue evaluada a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la transformación de los protoplastos. Cabe recalcar que aunque se presenta la imagen de protoplastos individuales, también se observaron grupos de protoplastos que emitían la fluorescencia. Se debe considerar la posibilidad de que dicha fluorescencia se pudiera deber a algún compuesto que tenga fluorescencia propia como es la clorofila, sin embargo esto es poco probable debido a que las suspensiones celulares utilizadas se mantienen en la oscuridad, y hasta donde podemos entender no ha habido la generación de cromóforos y por lo tanto la posibilidad de autofluorescencia en suspensiones celulares es mínima de acuerdo a Mathur y Koncz (1995).

En esta etapa experimental se utilizaron dos tipos de testigo, el primero consistió en tratar protoplastos únicamente con PEG y el segundo en transformar protoplastos con el vector vacío. Estos testigos fueron con la intención de eliminar cualquier interferencia de absorción de luz por las proteínas y plastidios presentes en los protoplastos y facilitar la identificación de los protoplastos transformados. La intensidad emitida por los protoplastos testigo fue baja comparada con la emitida por los protoplastos transformados en todos los tiempos de monitoreo. Sin embargo, también en esta figura se puede apreciar una mayor emisión de fluorescencia a las 72 horas después de la transformación de los protoplastos.

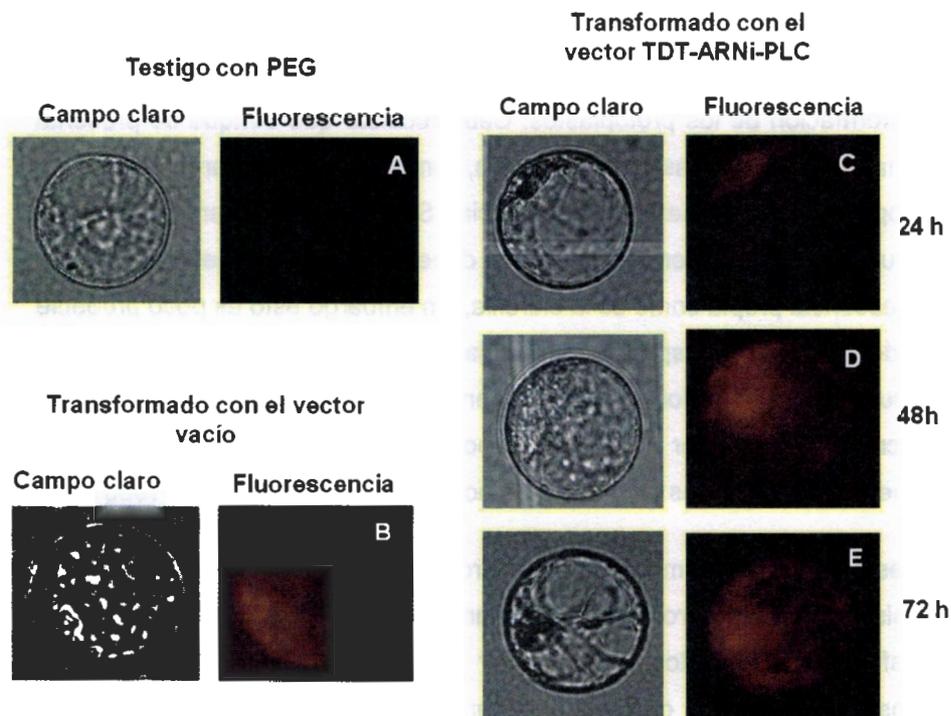


Figura 3. 15. Transformación de protoplastos con el constructo pTDT-ARNi-PLC por el método de PEG. A) Protoplastos tratados con PEG al 20% sin el vector de pTDT-ARNi-PLC y observados al microscopio de fluorescencia a las 24, 48, 72 hrs B) Protoplastos tratados con PEG y el vector vacío; C), D) y E) Protoplastos transformados con PEG al 20 % y el constructo pTDT-ARNi-PLC y monitoreados de la misma manera que los protoplastos del inciso A y B.

Por otra parte, para evaluar si el fragmento de 281 pb obtenido del dominio catalítico de la PLC fue capaz de desencadenar silenciamiento de este gen, se extrajo ARN a partir de protoplastos testigos y transformados en los tiempos de 24, 48 y 72 horas. Los resultados de la RT-PCR se muestran en la figura 3.16, en la que se puede ver el nivel del transcrito de la PLC en protoplastos testigo y el silenciamiento en protoplastos transformados. El nivel del transcrito en los protoplastos testigo no presentó cambio alguno al ser analizados en los tiempos de 24, 48 y 72 horas, mientras que en los

protoplastos transformados se presentó una reducción del nivel del transcrito de la PLC a las 48 horas. El nivel de transcrito de la PLC en protoplastos sin ninguna transformación no tuvo cambios y fue constante. Comparando la intensidad de la banda del control interno tubulina, de la figura 3.16 con la presentada en la figura 3.14 se puede ver que es menor. Esto puede deberse a varios factores como es la cantidad de templado, así como el hecho de que en la figura 3.14 los protoplastos utilizados fueron recién aislados, mientras que en los resultados presentados en la figura 3.16 los protoplastos se mantuvieron por un periodo de tiempo diferente. Sin embargo, los resultados del transcrito de tubulina si se pueden utilizar como un control interno de cargado ya que entre cada experimento no varió la intensidad de la banda de tubulina. Esto ha sido observado por otros investigadores (Karen Trujillo Villanueva y Norma Laura Rodríguez Ávila, comunicación personal).

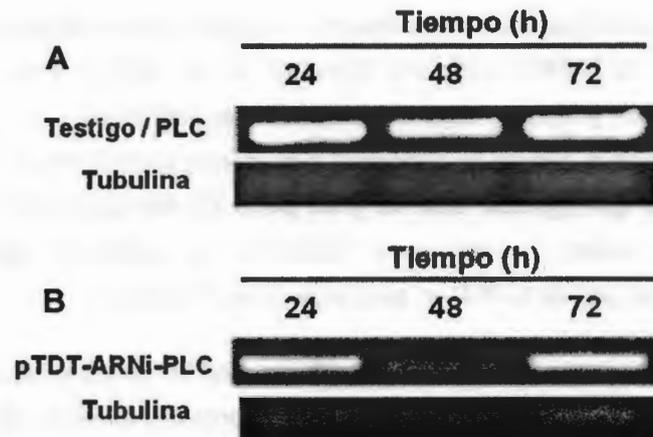


Figura 3.16. Silenciamiento de la PLC en protoplastos de *C. arabica*. A) Nivel del transcrito de la PLC en protoplastos tratados con PEG, el vector vacío y analizado después de 24, 48 y 72 horas. B) Nivel del transcrito de la PLC en protoplastos transformados con el vector pTDT-ARNi-PLC por el método de PEG y analizados como en los protoplastos testigo.

3.4 DISCUSIÓN

La obtención de protoplastos a partir de diferentes tejidos ha permitido su aplicación como una herramienta para el estudio de canales iónicos, actividad fotosintética (Sheen, 2001), cuantificación de actividades enzimáticas, del efecto de la aplicación de hormonas (Bauer *et al.*, 2002; Cho y Spalding, 1996) y en la transducción de señales (Gilroy y Jones, 1994).

La transducción de señales es un mecanismo por el cual gran parte de las señales externas son convertidos en señales internas mediante la participación de moléculas efectoras que darán lugar a la formación de segundos mensajeros. En esta transducción se ha visto que participan fosfolípidos de tipo inositol (fosfoinosítidos) que son hidrolizados por la enzimas denominadas fosfolipasas. Esta vía de señalización se ha observado que participa en la respuesta ante factores de estrés como son sequía (Lee *et al.*, 1996), salinidad (DeWald *et al.*, 2001), ataque por patógenos (Shigaki y Bhattacharyy, 2000) y osmolaridad (Pical *et al.*, 1999) entre otros. Debido a que no se conoce el mecanismo exacto por el cual la PLC en plantas es regulada ante la gran parte de los estímulos antes mencionados, nosotros pretendemos establecer un protocolo para el silenciamiento del gen de la PLC en protoplastos de *C. arabica*.

Para la obtención de los protoplastos de *C. arabica* se utilizó el protocolo recomendado por Ramírez-Benítez y colaboradores (2009) con algunas modificaciones, lo que permitió la obtención de 3.2×10^8 protoplastos/mL a partir de suspensiones celulares de 16 días del ciclo de cultivo. Sin embargo, Nyange y colaboradores (1997) reportaron un rendimiento de protoplastos de 1.15×10^6 protoplastos/mL a partir de cultivos de

suspensiones celulares de *C. arabica* de 5 días del ciclo de cultivo. La diferencia observada en los rendimientos posiblemente se deba a la ausencia de una enzima en la mezcla de digestión utilizada y a la edad de las suspensiones celulares empleadas para la obtención de los protoplastos ya que se ha mencionado que se deben tomar suspensiones celulares en etapas de crecimiento exponencial para la obtención de un buen rendimiento de protoplastos (Bhojwani y Razdan, 1996).

La PLC es una enzima que a través de los segundos mensajeros contribuye a generar una respuesta fisiológica ante señales externas. No obstante poco se sabe sobre los mecanismos exactos por el cual esta enzima es regulada ante estos. Debido a que la mayor actividad enzimática de la PLC fue detectada en el día 16 del ciclo de cultivo de *C. arabica*, se decidió realizar el silenciamiento en este tiempo (Martínez-Estevez *et al.*, 2003) en donde también se ha realizado la extracción del mensajero y detectado por RT-PCR, de hecho el fragmento obtenido que codifica para la región catalítica de la PLC fue obtenido utilizando células del día 16 del ciclo de cultivo (Sanchez-Cach *et al.*, 2008).

Se ha demostrado experimentalmente que para realizar la inducción del mecanismo de ARN de silenciamiento basta con utilizar una longitud de ARN de doble cadena tipo "harpin loop" entre 100 a 500 pb. También se ha mencionado que la longitud tiene que ver con el porcentaje de silenciamiento y la producción de siARN (Tuschl *et al.*, 1999); sin embargo, en otro reporte se indicó que la longitud del ARN de doble cadena no presentó un cambio significativo en el porcentaje de silenciamiento (Akashi *et al.*, 2001). En el presente trabajo se utilizó un fragmento de 281 pb de la región media del dominio catalítico de la PLC de *C. arabica* para clonarse en el vector pTDT-ARNi y obtener el vector final pTDT-ARNi-PLC.

La introducción de material genético es una de los pasos limitantes para la transformación y por consiguiente de la mejora de genética de algunas especies vegetales. Los métodos de transformación que más se emplean en la introducción de ADN en células de protoplastos se encuentran, la electroporación (Hidaka y Omura, 1993), el uso de *Agrobacterium* (Binns, 1991) y el PEG (Mazarei *et al.*, 2008). El método de transformación basado en PEG se ha aplicado en una gran cantidad de trabajos que involucran protoplastos de varias especies vegetales como son maíz (Maas y Werr, 1989), arroz (Chen *et al.*, 2006), *Arabidopsis thaliana* (Zhai *et al.*, 2009). Se ha sugerido que el PEG realiza su función como agente de transformación a través de la desestabilización y la producción de poros en la membrana plasmática (Díaz *et al.*, 2004).

Son varios los parámetros que determinan el éxito de la transformación con PEG en protoplastos, pero entre los más relevantes podemos mencionar, la concentración de PEG, la velocidad de centrifugación y la composición del medio de mantenimiento después de la transformación. Al respecto nosotros consideramos que los factores de mayor impacto en la transformación de *C. arabica* son el medio de cultivo, la concentración de PEG, la velocidad de centrifugación y el volumen de la mezcla de transformación. La mayoría de los reportes han utilizado concentraciones de PEG que se encuentran entre 20-25% y tiempos de incubación con este mismo de 10 a 30 minutos (Ignacimuthu *et al.*, 2000). El tamaño de la molécula de PEG es otro parámetro de consideración en la transformación, dos de los más usados son el de 4,000 (Mazarei *et al.*, 2008) y el de 3,350 (Zhai *et al.*, 2009). Sin embargo es importante señalar que en estos trabajos los protoplastos aislados fueron de tejido organizado (plántulas, hojas y raíces). Si bien es cierto que en nuestro sistema estamos hablando de protoplastos de suspensiones celulares, o sea tejido dediferenciado y por lo tanto no necesariamente se pueden comparar las condiciones de

obtención y transformación de los autores, para los fines de estudio de nuestro laboratorio, ya contamos con un sistema de obtención de protoplastos. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Vanitharani y colaboradores (2003) y Qi y colaboradores (2004) quienes utilizaron protoplastos de suspensiones celulares de tabaco para realizar experimentos de ARNi, encontraron que este sistema puede ser utilizado para el estudio de la replicación de un virus en particular. Estos autores no utilizaron PEG para la transformación, en su lugar utilizaron electroporación teniendo un buen rendimiento de la misma.

La importancia del uso de polímeros como el PEG para transformar se le atribuye a que puede originar cambios en la conformación del ADN plasmídico y en la membrana plasmática de las células. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se decidió evaluar diferentes concentraciones de PEG 3,350 y con un tiempo de incubación de 15 minutos (figura 3.12) y se determinó que la concentración de 20% fue la adecuada ya que presentó el mayor número de protoplastos transformados. Los resultados obtenidos con las condiciones establecidas fue similar a la de otros reportes en donde se han transformado protoplastos de diferentes especies (Mazarei *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2009).

Entre los medios de cultivo simples (apéndice I) empleados para el mantenimiento de los protoplastos durante y después de la transformación se encuentran el W5 y el MaMg (Yoo *et al.*, 2007). Estos medios fueron adecuados y suficientes para mantener a los protoplastos durante el tiempo que duraron los experimentos. Al aplicar estos medios a nuestros protoplastos únicamente se mantuvieron viables por 24 horas después de aislados y transformados, por lo tanto nuestros resultados difieren de los obtenidos en otros reportes. Los mejores resultados en lo que concierne al mantenimiento de los protoplastos de *C. arabica* fueron logrados con el

medio de cultivo elaborado por Ramírez-Benítez y colaboradores (2009) con algunas modificaciones, lográndose obtener una viabilidad del 90 %. Posiblemente esta viabilidad registrada se deba a las condiciones de osmolaridad de nuestro medio de cultivo que fue de aproximadamente de 600 mOsm o también a la diferencia en la composición de los fosfolípidos de las membranas plasmáticas de las especies (Staehein y Newcomb, 2000). En este mismo medio fue posible mantener viables a los protoplastos por más de 20 días sin la aplicación de tratamiento alguno. Para nuestro conocimiento es el primer reporte que menciona el mantenimiento de los protoplastos por este período de tiempo. Los protoplastos mantenidos viables en estas condiciones, permitirían realizar experimentos que demanden tiempos mayores de 10 días.

La evaluación de diferentes velocidades de centrifugación nos permitió conocer la fuerza necesaria para precipitar a los protoplastos sin reducir su número significativamente durante el procedimiento de transformación. Son variables las velocidades y tiempos de centrifugación que reportan los protocolos de transformación, los valores se encuentran entre 40-300 xg por 2-7 minutos (Chen *et al.*, 2006; Mazarei *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2009). Por lo tanto decidimos evaluar diferentes velocidades de centrifugación manteniendo constante el tiempo de centrifugación a 6 minutos (figura 3.13). A partir de este análisis se seleccionó la velocidad de 70 g por 6 minutos en todo el proceso de transformación, como puede apreciarse nuestros resultados concuerdan con los reportados por otros grupos de investigación.

Una vez que se logró el establecimiento de las condiciones de transformación por PEG y la construcción del vector pTDT-ARNi-PLC, se realizó el experimento de ARNi de la PLC. Para el cual se transformaron 10×10^6 protoplastos con 20% de PEG y se evaluó el silenciamiento en los

tiempos de 24, 48 y 72 horas posteriores a la transformación. Se ha reportado que la transformación de protoplastos con ADN plasmídicos que llevan clonados genes reporteros como la luciferasa y GUS son expresados a partir de las 20-24 horas después de la transformación (Mathur y Koncz, 1995; Bart *et al.*, 2006).

Actualmente es posible obtener protoplastos de cualquier planta y de diferentes tejidos de una especie. Entre los tejidos más utilizados se encuentran hojas, raíces, tallos y suspensiones celulares. Los mayores rendimientos de protoplastos se obtienen a partir de suspensiones celulares, lo que la hace atractivo para experimentos de transformación. Sin embargo, la fuente a emplear para el aislamiento de los protoplastos varía de acuerdo a las necesidades experimentales. Cuando se utilizan genes reporteros clonados en vectores plasmídicos como GFP o RFP en protoplastos, se debe tener en cuenta la luz emitida por las proteínas, las clorofilas y los proplastidios de los protoplastos mismos, puesto que se ha mencionado que pueden interferir con los resultados (Mathur y Koncz, 1995). Se ha demostrado que los protoplastos obtenidos a partir de suspensiones celulares emiten poca luz al ser irradiados a una longitud de onda específica. Para contrarrestar estos efectos y demostrar que los protoplastos fueron transformados empleamos dos testigos, el primero fue tratar a los protoplastos únicamente con el PEG (figura 3.15A) y el segundo transformar a los protoplastos de *C. arabica* con el vector pTDT-ARNi vacío (figura 3.15B), siendo la fluorescencia roja demasiado baja en protoplastos tratados únicamente con PEG comparado con los protoplastos transformados con el vector vacío. Mientras que los protoplastos transformados con el vector que tiene clonado el fragmento de 281 pb de la PLC (pTDT-ARNi-PLC) presentan una variación en la fluorescencia roja emitida durante el paso del tiempo de incubación, siendo mayor a las 72 horas (figura 3.15 C, D y E). Esta fluorescencia es similar a la observada en

los protoplastos transformados con el vector vacío pTDT-ARNi. Estos resultados aunque alentadores, deben de tomarse con precaución, ya que sería necesario realizar otros experimentos como es determinar el porcentaje de transformación de los protoplastos o tener imágenes de varios protoplastos en donde se vea la fluorescencia de la proteína roja fluorescente para estar completamente seguros de que hubo un silenciamiento de la PLC. Nuestros resultados sugieren la transformación de los protoplastos aislados de suspensiones celulares con el vector pTDT-ARNi-PLC, el cual es similar al empleado por Miki y Shimamoto (2004) quienes utilizan un vector derivado del pANDA para la transformación transitoria de hojas o protoplastos de arroz.

Por otra parte, al analizar el experimento de transformación transitoria para saber si la PLC fue silenciada o no se extrajo ARN de protoplastos testigos y transformados. Los resultados obtenidos al realizar RT-PCR semicuantitativo indican una reducción mayor en el nivel del transcrito de la PLC a las 48 horas (figura 3.16B) después de la transformación cuando se comparó con los protoplastos testigos (figura 3.16A). Es posible apreciar en estas figuras que existe de manera general una reducción en el transcrito de la PLC en todos los tiempos cuando se comparó con los protoplastos testigo. Los tiempos seleccionados para evaluar el silenciamiento fueron tomados del trabajo de Zhai y colaboradores (2009). A pesar que estos autores no utilizaron ADN plasmídico para producir ARN de doble cadena de tipo "harpin loop", en su lugar sintetizaron *in vitro* ARN de doble cadena, observaron un incremento en el transcrito del gen ECS1 a partir de las 72 horas y fue más notorio a las 96 horas. En el presente trabajo se observó que los protoplastos después de ser tratados con el PEG no sobrevivían por 96 horas, por lo que no se utilizó este tiempo de transformación. También es importante recalcar que el trabajo de Zhai y colaboradores (2009) fue realizado utilizando protoplastos aislados de plántulas de *Arabidopsis* que

es tejido diferenciado y por lo tanto no se puede comparar de manera contundente con lo obtenido en este trabajo en donde los protoplastos que se obtuvieron provienen de suspensiones celulares que es tejido no diferenciado.

3.5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo podemos tener las siguientes conclusiones:

- La obtención de un vector plasmídico (pTDT-ARNi-PLC) que lleva clonado un fragmento de 281 pb en sentido y antisentido de la región media del sitio catalítico de la PLC para realizar el silenciamiento del mismo.
- La selección del medio para mantener viables a los protoplastos de *C. arabica* antes y después de transformar, lográndose mantener hasta por 20 días después de su aislamiento.
- El número de protoplastos necesarios para la extracción de ARN y amplificar a la PLC y al control interno de la tubulina fue de 5×10^6 .
- De las diferentes concentraciones de PEG evaluadas, la concentración de 20% fue la que permitió observar un mayor número de protoplastos transformados en el microscopio de fluorescencia. Mientras que la velocidad de centrifugación adecuada para recuperar mayor cantidad de protoplastos fue de $70 \times g$ durante 6 minutos.

- El fragmento de 281 pb fue adecuado para inducir ARNi en protoplastos de *C. arabica* y de acuerdo a los resultados de la figura 3.16 el tiempo en donde se detecto una reducción en el transcrito de la PLC fue de 48 horas después de la transformación.

En resumen los resultados obtenidos con el vector de ARNi, permiten sugerir que el tamaño del fragmento de 281 pb fue suficiente para inducir el silenciamiento de la PLC en los protoplastos de *C. arabica*. Por lo tanto, los protoplastos de suspensiones celulares pueden utilizarse como un modelo celular en experimentos de ARNi. Si bien nuestros resultados sugieren el silenciamiento de la PLC, estos deberán de tomarse con la precaución adecuada y tomando en cuenta que al ser protoplastos de tejido no diferenciado, algunas de las preguntas de biología celular que involucran diferenciación no pueden ser contestadas con este modelo de estudio.

Con este modelo de transformación de protoplastos se podrían contestar preguntas como son:

¿Qué pasa con la actividad de otras fosfolipasas cuando se tenga el silenciamiento transitorio de la PLC?

¿Hay proteínas de la vía de transducción de señales de fosfolípidos que se regulan en respuesta al silenciamiento por ARNi de la PLC?

¿Se puede ver el efecto tóxico del aluminio en protoplastos silenciados por el ARNi?

3.6 PERSPECTIVAS

- Obtener protoplastos de tejido diferenciado (hoja, tallos o raíces) los cuales podrían ser una mejor opción para el uso del silenciamiento por ARNi.
- Realizar curvas dosis-respuesta de la concentración de plásmido a utilizar para la transformación.
- Determinar la viabilidad de los protoplastos en función del tiempo.
- Determinar la eficiencia de transformación de los protoplastos.
- Evaluar la regulación de la PLC de *C. arabica* a diferentes estímulos: salinidad, reguladores de crecimiento, metales y temperatura en protoplastos transformados.
- Conocer el comportamiento de las cinasas como la PI4K y la PI3K al silenciar a la PLC.
- Obtener la secuencia de nucleótidos completa del ADNc de la PLC.
- Evaluar el número de copias del gen o genes que codifican a la PLC.
- Realizar experimentos de cotransformación con vectores plasmídicos.
- Realizar experimentos de localización celular de diferentes proteínas involucradas en la señalización vía fosfolípidos.
- Determinar si la PLC expresada en las plantas de *C. arabica* es la misma PLC expresada y silenciada en los protoplastos.
- Estudiar la expresión de la PLC en diferentes órganos de las plantas de *C. arabica*.

3.7 REFERENCIAS

Akashi, H., Miyagishi, M., Kurata, H., Nagata, T., y Taira, K. (2001). A simple and rapid system for the quantitation of RNA interference in plant cultured cells. *Nucleic Acids Research*. 1: 235-236.

Birnboim, H. C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 1513-1523.

Binns, A. N. (1991). Transformation of wall deficient cultured tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*. 96: 498-506.

Bhojwani, S. S., y Razdan, M. K. (1996). Protoplast isolation and culture. En: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, CS (Eds.) Elsevier, Amsterdam. pp. 337-406.

Barandiaran, X., Di Pietro, A., y Martín, J. (1998). Biolistic transfer and expression of a uidA reporter gene in different tissues of *Allium sativum* L. *Plant Cell Reports*. 17: 737-741.

Bauer, E.P., Schafe, G.E., y LeDoux, J.E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*. 22: 5239-5249.

Bart, R., Chern, M., Park, C. J., Bartley, L., y Ronald, P. (2006). A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts. *Plant Methods*. 2: 13-18.

Crossway, A., Oakes, J. V., Irvine, J. M., Ward, B., Knauf, V. C., y Shewmaker, C. K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics*. 202: 179-185.

Cho, M. H. y Spalding, E. P. (1996). An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 8134-8138.

Chen, S., Tao, L., Zeng, L., Vega-Sanchez, M. E., Umemura, K., y Wang, G. L. (2006). A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology*. 7: 417-427.

Deshayes, A., Herrera-Estrella, L., y Caboche, M. (1985). Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplast by *Escherichia coli* plasmid. *European Molecular Biology Organization Journal*. 4: 2731-2737.

DeWald, D. B., Torabinejad, J., Jones, C. A., Shope, J. C., Cangelosi, A. R., Thompson, J. E., Prestwich, G. D., y Hama, H. (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 126: 759-769.

Díaz, M. L., Zappacosta, D. C., Franzone, P. M y Ríos, R.D. (2004). Transformación genética. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Ed. por Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. Buenos Aires, Argentina, INTA. p. 109-123.

Ferrer, E., Linares, C., y Gonzáles, J. M. (2000). Efficient transient expression of the β -glucuronidase reporter gene in garlic (*Allium sativum* L.). *Agronomie*. 20: 869-874.

Fromm, M. E., Taylor, L. P., y Walbot, V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*. 319: 791-793.

Gilroy, S. y Jones, R. L. (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiology*. 104: 1185-1192.

Hidaka, T., y Omura, M. (1993). Transformation of citrus protoplasts by electroportation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 62: 371-376.

Ignacimuthu, S., Arocklasamy, S., y Terada, R. (2000). Genetic transformation of rice: Current status and future prospects. *Current Science*. 79: 186-195.

Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., y Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. 327: 70-73.

Lee, Y., Choi, Y. B., Suh, S., Lee, J., Assmann, S. M., Joe, C. O., Kelleher, J. F., y Crain, R. C. (1996). Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 110: 987-996.

Liu, M., Kilaru, A., y Hasenstein, K. H. (2008). Abscisic acid response of corn (*Zea mays* L) roots and protoplast to lanthanum. *Journal of Plant Growth Regulation*. 27: 19-25.

Maas, C., y Werr, W. (1989). Mechanism and optimized conditions for PEG mediated transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Reports*. 8:148-151.

Mathur, J., y Koncz, C. (1995). PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA, in *Methods in Molecular Biology*, Martinez-Zapater, J., y Salinas, j. (Ed). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 267-275.

Martínez-Estévez, M., Muñoz-Sánchez, J., Loyola-Vargas, V., Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Reports*. 20: 469-474.

Martínez-Estévez, M., Palma, G. R. D., Muñoz-Sánchez, J. A., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V. M., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology*. 160: 1297-1303.

Mazarei, M., Al-Ahmad, H., Rudis, M. R., y Stewart, C. N. (2008). Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnology Journal*. 3: 354-359.

Miki, D., y Shimamoto, K. (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiology*. 45: 490-495.

Nyange, N. E., Williamson, B., Lyon, G. D., McNicol, R. J., y Connolly, T. (1997). Responses of cells and protoplasts of *Coffea arabica* genotypes to partially purified culture filtrates produced by *Colletotrichum kahawae*. *Plant Cell Reports*. 16: 763-769.

Pical, C., Westergren, T., Dove, S. K., Larsson, C., y Sommarin, M. (1999). Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 38232-38240.

Qi, Y., Zhong, X., Itaya, A., y Ding, B. (2004). Dissecting RNA silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing pathway at the cellular level. *Nucleic Acids Research*. 32: 1-10.

Ramírez-Benítez, J. E., Hernández-Sotomayor, S. M. T., y Muñoz-Sánchez, J. A. (2009). The location of aluminium in protoplasts and suspension cells taken from *Coffea arabica* L. with different tolerance of Al. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 103: 1491–1496.

Sánchez-Cach, L. A., Ortiz-García, M. M., Minero-García, Y., Muñoz-Sánchez, J. A., Hernández-Sotomayor, S. M. T., Suárez-Solís, V. M., y De los Santos-Briones, C. (2008). Isolation of cDNA encoding the catalytic site of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Coffea arabica* L. *Plant Signaling & Behavior*. 3: 913–916.

Sheen, J. (2001). Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*. 127: 1466-1475.

Shigaki, T., y Bhattacharyy, M. K. (2000). Decreased inositol 1,4,5-trisphosphate content in pathogen-challenged soybean cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 563–567.

Spolaore, S., Trainotti, L., y Casadoro, G. (2001). A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany*. 52: 845-850.

Staehelin, L. A. y Newcomb, E. H. (2000). Membrane structure and membranous organelles. En: B. B. Buchanan, W. Gruissem, y R. L. Jones (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. pp. 2.

Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., y Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes & Development*. 13: 3191–3197.

Vanitharani, R., Chellappan, P., y Fauquet, C. F. (2003). Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 9632-9636.

Yoo, S. D., Cho, Y. H., y Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*. 2: 1565-1572.

Zhai, Z., Sooksa-Nguan, T., y Vatamaniuk, O. K. (2009). Establishing RNAi as a reverse genetic approach for gene functional analysis in protoplasts. *Plant Physiology*. 3: 1-30.

APENDICE I

Medio W5 (5.7)

Componentes	Concentración
Glucosa	0.1% p/v
KCl	0.08% p/v
NaCl	0.09% p/v
CaCl ₂	1.84 % p/v
MES-KOH	2 mM

Medio C100s (pH 5.7)

Componentes	Concentración
Sorbitol	400 mM
CaCl ₂ . 2H ₂ O	15 g/L
MES	1 g/L

Medio MaMg (5.7)

Componentes	Concentración
Manitol	400 mM
MES	4 mM
MgCl ₂	15 mM

