



**Universidad del Papaloapan**

**Campus Tuxtepec**

**Licenciatura en Ingeniería en**

**Biotecnología**

**“Diseño *in silico* y construcción *in vitro* de plásmidos binarios para el análisis funcional del gen *SUB1A-1*”**

**TESIS**

**Presentada por**

**Oscar Gregorio Ramírez**

**Para obtener el título de**

**Ingeniero en Biotecnología**

**DIRECTOR DEL PROYECTO:**

**D.C. Julián Mario Peña Castro**

**Tuxtepec, Oaxaca. Noviembre de 2014**

## **Dedicatoria:**

Agradezco infinitamente a Dios por darme la oportunidad de vivir y conocer a aquellas personas extraordinarias que me han transmitidos sus conocimientos y experiencia, durante mi estancia en la Universidad del Papaloapan.

A mi familia, que siempre me apoyaron y me animaron de manera constante sin perder la esperanza de culminar una parte de mi proyecto de vida. A mis padres que me dieron la vida y experiencia, la fuerza necesaria para alcanzar mi sueño en el transcurrir de mi carrera profesional. A mis hermanos que siempre estuvieron conmigo y confiaron en mí en situaciones difíciles de mi vida.

A la Doctora Ana Karin Navarro Martínez, Jefa de Carrera de la licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, por confiar plenamente en mí al iniciar con una nueva formación profesional, por el apoyo y consejo en aquellos momentos de angustia y profunda soledad.

## Agradecimientos

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por sus enseñanzas, el apoyo incondicional y por la paciencia en aquellos momentos de angustias y desesperación.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa por apoyarme durante la realización de mi tesis y por el apoyo en situaciones de dudas ante el trabajo experimental y teórico.

A los Doctores del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan que en ocasiones me ayudaron y me animaron a seguir hacia adelante, con una sonrisa.

A la Dra. Sandra del Moral, Dr. José Abad y la Dra. Jacqueline Capataz de la Universidad del Papaloapan por compartir reactivos y equipos usados en el desarrollo de este trabajo.

Al Profesor Detlef Weigel del Instituto Max Planck (Alemania) por la donación de los plásmidos PBJ36\_AlcA y pMLBart\_AlcR.

A la Profesora Julia Bailey-Serres de la University of California at Riverside (USA) por la donación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el casete 35S:SUB1A-1-3xFLAG.

A mis amigos de laboratorio de Biotecnología Vegetal por su amistad incondicional, por su apoyo. También a mis compañeros de la carrera de Ingeniería en Alimentos, Ciencias Químicas y Empresariales por animarme a seguir siempre hacia adelante sin importar el pasado y por los momentos de desvelos juntos y por aquellos momentos agradables al lado de mis grandes amigos y compañeros.

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Julián Mario Peña Castro y con el apoyo del Programa de Mejoramiento del Profesorado a través del proyecto PROMEP 103.5/11/6720 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de Ciencia Básica 152643.**

**Fragmentos de esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos y publicaciones:**

- 1) **Oscar Gregorio-Ramírez** y Julián Mario Peña-Castro. Detección y respuesta del arroz ante la inundación y su aplicación biotecnológica. Tuxtepec, Oaxaca. 26- 27 de Mayo de 2011. **II Encuentro de Biotecnología en la Cuenca del Papaloapan: Por Un Desarrollo Sustentable.**
- 2) **Oscar Gregorio-Ramírez** y Julián Mario Peña-Castro. Diseño *in silico* y simulación de las reacciones LR Gateway de plásmidos binarios para el análisis funcional de prototipos biotecnológicos vegetales. Oaxaca de Juárez. Oax., 1 y 2 de diciembre de 2011. **13 Foro Estatal de Investigación e Innovación.**
- 3) Julián M. Peña-Castro, **Oscar Gregorio-Ramírez** y Blanca E. Barrera-Figueroa (2013) Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. **Educación química** 24(2), 237-246.

# Contenido

Contenido	6
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	11
Resumen	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1.1 Las inundaciones en México	14
1.2 La respuesta vegetal ante la inundación	16
1.3 El etileno y la inundación	16
1.4 Papel de los Factores de transcripción en respuesta al etileno (ERFs)	17
1.5 Los Factores de Transcripción y la Biotecnología	19
1.6 Casete de expresión	20
1.7 Promotores en plantas	21
1.7.1 Descripción y tipo de promotores	21
1.7.2 Promotores constitutivos	22
1.7.3 Promotores inducibles	23
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>26</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>27</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
7.1 Material vegetal	28
7.2 Extracción de ADN genómico	28
7.3 Software Vector NTI y diseño <i>in silico</i>	29
7.4 Reacción en cadena de la polimerasa	29
7.5 Electroforesis y purificación de los productos de PCR	31
7.6 Plásmidos	32
7.7 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	37

7.8 Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina _____	38
7.9 Ligación y digestión de moléculas de ADN _____	40
7.10 Secuenciación de vectores _____	42
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____</b>	<b>44</b>
8.1 Simulación <i>in silico</i> en el software Vector NTI _____	44
8.2 Extracción de ADN genómico _____	46
8.3 Diseño de oligonucleótidos _____	47
8.4 Aislamiento del gen <i>SUB1A-1</i> por PCR _____	49
8.5 Clonación directa de <i>SUB1A-1</i> en el vector PBJ36_Alca _____	51
8.6 Clonación de <i>SUB1A-1</i> en pGEM-T-Easy _____	54
8.7 Clonación direccional de <i>SUB1A-1</i> con el vector PBJ36_Alca _____	56
8.8 Integración de los casetes de expresión 35S:alcR::pAlca: <i>SUB1A-1</i> (AAR) Y 35S:alcR::pAlca: <i>SUB1A-1</i> -3xFLAG (AARF) _____	61
8.9 Verificación por secuenciación _____	66
<b>9. CONCLUSIONES _____</b>	<b>74</b>
<b>10. Perspectivas _____</b>	<b>75</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>76</b>
<b>12. ANEXO _____</b>	<b>81</b>
12.1 Secuencias de genes <i>SUB1C-1</i> y <i>SUB1C-1-3xFLAG</i> _____	81
12.2 Marcadores de peso molecular _____	82
12.3 Modo de preparación de soluciones stock _____	83

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estreses ambientales que pueden enfrentar las plantas. _____	15
<b>Figura 2.</b> Zonas más afectadas por huracanes en la República Mexicana de nivel III o superiores de los últimos 50 años. _____	15
<b>Figura 3.</b> Mecanismos moleculares y respuesta vegetal durante el estrés por inundación en el arroz ( <i>Oryza sativa</i> ). _____	19
<b>Figura 4.</b> Esquema del mecanismo de expresión y probable aplicación biotecnológica en el aumento a la tolerancia a la inundación y en el mejoramiento de la biomasa vegetal para la producción de bioetanol (acumulación de almidón) del casete propuesto en este trabajo para la expresión del gen <i>SUB1A-1</i> bajo el control del promotor inducible por etanol (pAlcA). _____	24
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la estrategia experimental para la construcción del orden correcto del casete de expresión. _____	27
<b>Figura 6.</b> Preparación de muestras de PCR a partir de una mezcla maestra central para minimizar errores de pipeteo. _____	30
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del vector comercial pGEM <sup>®</sup> -T Easy (Promega). _____	34
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del vector pBJ36_Alca. _____	35
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática del vector pMBLart_Alcr. _____	36
<b>Figura 10.</b> Tabla de cálculo implementada para calcular los componentes de reacciones de ligación en molaridades y relaciones molares determinadas _____	41
<b>Figura 11.</b> Plásmido binario con el casete de expresión pALCA:SUB1A-1-3xFLAG. _____	45
<b>Figura 12.</b> Electroforesis de ADN genómico. _____	46
<b>Figura 13.</b> Secuencia del gen <i>SUB1A-1</i> sin marca inmunogénica 3xFLAG. _____	47
<b>Figura 14.</b> Secuencia del gen <i>SUB1A-1</i> con marca inmunogénica 3xFLAG. _____	48
<b>Figura 15.</b> Programa de la PCR y electroforesis de ADN para amplificar a <i>SUB1A-1</i> y <i>SUB1C-1</i> . _____	50
<b>Figura 16.</b> Programa de la PCR y electroforesis de ADN para amplificar a <i>SUB1A-1</i> . _____	50
<b>Figura 17.</b> Electroforesis de ADN <i>SUB1C-1</i> . _____	51

<b>Figura 18.</b> Placa con medio LB-agar adicionado con ampicilina, sembrada con bacterias transformadas con el plásmido PBJ36_AlcA de dos lotes diferentes (248 y 408).	_____ 52
<b>Figura 19.</b> Plásmidos PBJ36_AlcA sometidos a digestión doble con Sall y NotI.	_____ 53
<b>Figura 20.</b> Esquema de clonación de <i>SUB1A-1</i> en el vector de almacenamiento pGEM-T-Easy.	_____ 54
<b>Figura 21.</b> Selección blanco/azul de colonias transformadas con pGEM-T-Easy ligado con el producto de PCR de <i>SUB1A-1</i> .	_____ 55
<b>Figura 22.</b> Inserción del <i>SUB1A-1-3xFLAG</i> en el vector pGEM-T Easy.	_____ 55
<b>Figura 23.</b> Actividad de ligación sobre el marcador de peso molecular.	_____ 56
<b>Figura 24.</b> Estrategia experimental para clonar direccionalmente a <i>SUB1A-1</i> en el vector PBJ36_AlcA usando los sitios de restricción insertados durante el aislamiento de <i>SUB1A-1</i> por PCR.	_____ 57
<b>Figura 25.</b> Digestiones dobles con EcoRI y HindIII de los materiales para clonar a <i>SUB1A-1</i> en PBJ36_AlcA.	_____ 59
<b>Figura 26.</b> Digestiones con NotI y doble digestión con EcoRI y HindIII de la ligación de <i>SUB1A-1</i> y PBJ36_AlcA.	_____ 60
<b>Figura 27.</b> Estrategia experimental para clonar direccionalmente a <i>SUB1A-1</i> en el vector pMLBart_AlcR usando los sitios de restricción NotI.	_____ 62
<b>Figura 28.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1%.	_____ 63
<b>Figura 29.</b> Representación del vector pMLBart_AlcR, digerido con la enzima fosfatasa alcalina.	_____ 63
<b>Figura 30.</b> Digestiones con NotI de la ligación de pAlcA: <i>SUB1A-1</i> y pMLBart_AlcR.	_____ 64
<b>Figura 31.</b> Digestiones con NotI de la ligación de pAlcA: <i>SUB1A-1-3xFLAG</i> y pMLBart_AlcR.	_____ 65
<b>Figura 32.</b> Diseño de oligonucleótidos en plásmido binario con el casete de expresión pALCA: <i>SUB1A-1-3xFLAG</i> y la secuencia del gen <i>SUB1A-1-3xFLAG</i> .	_____ 67
<b>Figura 33.</b> Representación de cromatograma.	_____ 68
<b>Figura 34.</b> Análisis de resultados de secuenciación y ensamblado de la clona AAR1.	_____ 69
<b>Figura 35.</b> Análisis de resultados de secuenciación y ensamblado de la clona AARF3.	_____ 70

**Figura 36.** Alineamiento de secuencias obtenidas de los plásmidos AAR1 y AARF3. \_\_\_\_ 73

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Descripción y características de vectores que se utilizaron en la obtención de la construcción inducible.	33
<b>Tabla 2.</b> Soluciones base para la extracción por el método alcalino de plásmidos.	38
<b>Tabla 3.</b> Soluciones de aislamiento de plásmidos.	39
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos diseñados para clonar a los genes <i>SUB1A-1</i> y <i>SUB1C-1</i> .	49
<b>Tabla 5.</b> Mediciones espectrofotométricas de los productos de PCR y el plásmido PBJ36_Alca.	53
<b>Tabla 6.</b> Mediciones espectrofotométricas de los productos de dobles digestiones (EcoRI y HindIII).	59
<b>Tabla 7.</b> Mediciones espectrofotométricas de los plásmidos AAR y AARF seleccionados.	66
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los plásmidos AAR y AARF.	68

## Resumen

La inundación es uno de los problemas más graves que enfrentan los cultivos agrícolas y silvestres en gran parte del territorio mexicano. Desde la aparición de las plantas en la tierra, éstas han desarrollado mecanismos moleculares para la defensa y la respuesta al estrés ambiental mediante la regulación de su expresión génica y el ajuste de los cambios metabólicos necesarios para la obtención de energía de las reservas de carbohidratos. En el caso del estrés por inundación, el etileno activa a los factores de transcripción llamados Ethylene Response Factors (ERFs) entre los que está el gen *SUB1A-1*, uno de los principales determinantes genéticos de la tolerancia a la inundación.

En el arroz, el gen *SUB1A-1* está bajo el control de su promotor nativo y confiere tolerancia a la inundación. Cuando se expresó de forma heteróloga a *SUB1A-1* en *Arabidopsis* bajo el control del promotor fuerte 35S, el resultado fue un fenotipo no tolerante a la inundación, probablemente por la inhibición permanente en el uso de almidón. De esta forma, surge la necesidad de expresar a *SUB1A-1* de forma inducible para poder transferir esta capacidad de tolerancia a otras especies vegetales.

En el presente trabajo se emplearon herramientas de la biología molecular, como las enzimas de restricción, la simulación *in silico*, la PCR, la electroforesis, la ligación y la transformación de bacterias para la clonación del gen *SUB1A-1* en diferentes tipos de vectores, para lograr construir un casete de expresión que permita en el futuro, transformar e inducir la expresión de *SUB1A-1* bajo el estímulo del etanol a través del sistema de expresión fúngico AlcR-pAlcA.

Para lograr lo anterior, se planteó una estrategia experimental que partió desde la extracción de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis* previamente transformadas con *SUB1A-1* pero bajo el control del promotor 35S, hasta la verificación por secuenciación del casete de expresión 35S:AlcR::pAlcA:*SUB1A-1-3xFLAG*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles, por lo tanto, deben desarrollar mecanismos para enfrentar los estreses ambientales que sufren cuando crecen en su hábitat natural (Figura 1). Adicionalmente a los retos naturales sobre su ciclo de vida, las plantas tienen que enfrentar fenómenos exacerbados por la actividad humana como el calentamiento global, que crea condiciones extremas hidrometeorológicas como son la sequía y las inundaciones (Manson y Jardel, 2009; Bailey-Serres *et al.*, 2012).

La inundación es un fenómeno natural que ha ocasionado desastres en grandes extensiones de cultivos agrícolas y silvestres en el mundo. La inundación puede provocar cambios metabólicos y estrés energético en las plantas debido a un conjunto de factores abióticos inadecuados que acompañan a este fenómeno (Fukao *et al.*, 2006; Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Durante una inundación, las plantas deben enfrentar el decremento de carbohidratos, la poca disponibilidad de oxígeno, la baja captación de energía luminosa y la síntesis de compuestos químicos que conllevan a la muerte celular del organismo (Fukao *et al.*, 2006).

En algunos casos, cuando las plantas se encuentran parcial o completamente sumergidas en el agua, se desencadenan series de reacciones moleculares que permiten un cambio en su metabolismo, que cambia de aerobio a anaerobio, para administrar las reservas de carbohidratos y así aumentar el tiempo de sobrevivencia de las plantas ante la inundación (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Peña-Castro, 2014).

Para poder comprender las alteraciones de las rutas metabólicas y de los mecanismos fisiológicos y moleculares en presencia de este fenómeno, se han realizado estudios en diferentes tipos de especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Rumex palustris* y *Oryza sativa* (Bailey-Serres y Voesenek, 2010; Mustroph *et al.*, 2010; Van Veen *et al.*, 2013). El objetivo final es obtener nuevas variedades de especies que sean más tolerantes a la inundación.

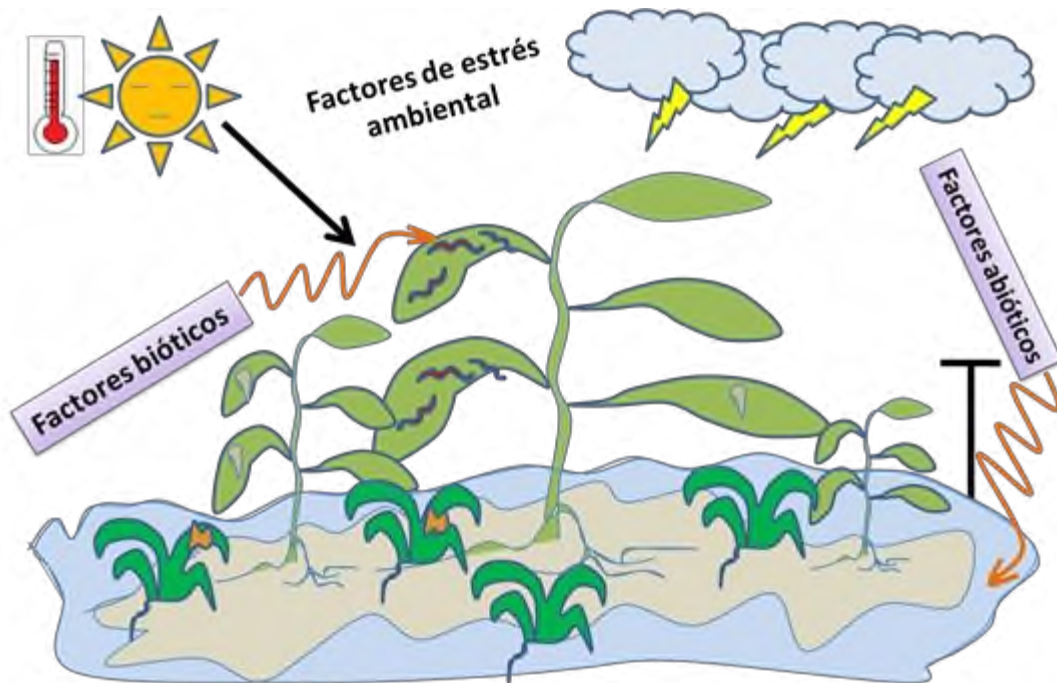
## 1.1 Las inundaciones en México

Las inundaciones en México causan daños que suman millones de dólares de pérdidas económicas debido a que la producción agrícola se ve disminuida ante este fenómeno (Manson y Jardel, 2009). Moyer y Storrs (2010) prevén que México será el segundo país con más daños potenciales por los fenómenos hidrometeorológicos por los efectos del cambio climático. Actualmente, se busca la planeación de una nueva estrategia para hacer uso de los avances científicos que permitan mejorar los cultivos agrícolas como son el arroz, maíz, soya, tabaco y caña de azúcar y alcanzar la seguridad alimentaria (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

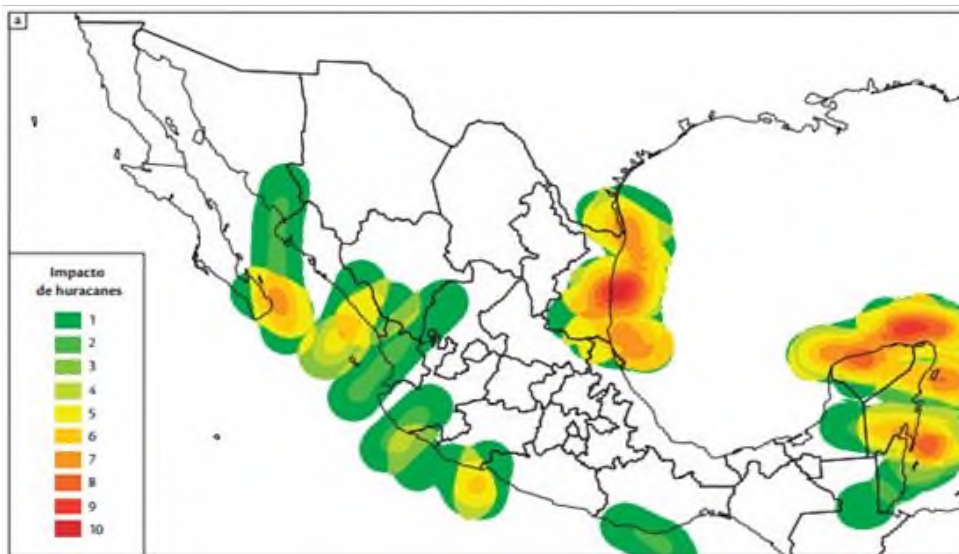
En México, los ciclones tropicales provocan daños severos en la infraestructura, pérdidas de vidas humanas, cultivos silvestres y agrícolas. En el periodo 1980-2003 se registraron 31 tormentas que provocaron daños de casi 2 400 millones de dólares. De acuerdo al estudio realizado por el Servicio Meteorológico Nacional, en el año 2005 se incrementó el número de ciclones y también fueron más intensos provocando mayores daños que los años anteriores (Manson y Jardel, 2009).

Durante el año 2009, el territorio mexicano fue notoriamente afectado. Se registraron 31 ciclones, 20 en el Pacífico y 11 en el Atlántico, 49 frentes fríos, 38 ondas tropicales y tres tormentas invernales (llamadas bajas frías). El Servicio Meteorológico Nacional registró un total de 455 tormentas intensas (con umbral superior a 70 mm de lluvia acumulada en 24 h), destacando la máxima acumulación en Guaymas, Sonora, del 3 al 4 de septiembre con 515 mm, ocasionada por el huracán "Jimena" (Hernández, 2009).

En México hay muchas regiones recurrentemente afectadas por los huracanes. En la Figura 2 se muestran en una escala de colores (rojo más intenso) las zonas donde impactaron los 29 huracanes que alcanzaron niveles 3 a 5 en la escala Saffir-Simpson registrados de 1950 a 2004 (Manson y Jardel, 2009).



**Figura 1. Estrés ambientales que pueden enfrentar las plantas.** Se pueden dividir en dos grupos: factores bióticos (bacterias, hongos, virus, nemátodos, plantas parasitarias) y factores abióticos (sequía, inundaciones, heladas, granizadas, pH de suelo) y combinaciones de todos los anteriores.



**Figura 2. Zonas más afectadas por huracanes en la República Mexicana de nivel III o superiores de los últimos 50 años.** El índice de afectación consiste en una medición multivariable de impacto del 1-10 (Manson y Jardel, 2009).

## 1.2 La respuesta vegetal ante la inundación

Debido al estrés por inundación, las plantas se ven afectadas negativamente durante su crecimiento y desarrollo, teniendo como consecuencia una baja productividad agrícola e incluso la muerte. La planta realiza alteraciones morfológicas y fisiológicas para tolerar el estrés como son la generación de aerénquimas y la elongación para escapar del estrés (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). El principal cambio bioquímico es la transición de la respiración aerobia a la anaerobia, remplazando moléculas de oxígeno por aceptores de electrones como el piruvato, el alcohol y el acetaldehído (Hinz *et al.*, 2010; Peña-Castro, 2014). Para poder comprender el estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés en las plantas se ha experimentado en plantas modelos, principalmente *Arabidopsis thaliana* y arroz (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

Las plantas responden ante la inundación alterando la expresión de factores de transcripción (FTs), que son proteínas que se unen a la secuencia del ADN en zonas llamadas regulatorias o *cis* y que generalmente se localizan en los promotores de los genes (Zhu *et al.*, 2013). Los FTs poseen la capacidad de coordinar y modular el proceso de la transcripción de ADN, induciendo o inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa (García-Morales *et al.*, 2013) y actuando como interruptores para el control de la compleja red de señalización por estrés durante la aclimatación de las plantas (Mustroph *et al.*, 2009; Lata *et al.*, 2011). Cuando el estrés se prolonga, las adecuaciones metabólicas y fisiológicas se vuelven insuficientes y la estructura celular tiende a deformarse y se provoca el mal funcionamiento de las rutas metabólicas por especies reactivas de oxígeno (Bailey-Serres y Voesenek, 2008, 2010).

## 1.3 El etileno y la inundación

El etileno es una sustancia química aislada en 1795, cuya fórmula química es  $C_2H_2$ . Su nombre antiguo “gas oléfiante” significa gas formador de aceite. Es indispensable en

las grandes industrias químicas para la síntesis o formación de nuevos compuestos (Carey, 2006). El etileno también es una hormona vegetal que se encuentra en la naturaleza en forma gaseosa y en pequeñas cantidades. Su función en las plantas es regular varios procesos fisiológicos como el crecimiento, desarrollo y maduración de los frutos (Kazuhiko *et al.*, 2005).

Una de las funciones de etileno, de suma importancia durante el estrés por inundación, es la activación y la inducción de la expresión de los factores de transcripción del grupo de los Ethylene Responsive Factor (ERFs) (Hinz *et al.*, 2010; Gibbs *et al.*, 2011). Los ERFs son proteínas de una amplia familia génica que tienen la capacidad de coordinar y regular el flujo de la información genética (Kazuhiko *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción de los ERFs durante una inundación es el siguiente. Cuando el nivel de agua sube, se acumula alrededor de la planta el etileno sintetizado constitutivamente y este induce a los ERFs que regulan el funcionamiento de las plantas cuando hay poco oxígeno en los órganos vegetales. Así, se cambia de la respiración aerobia a la fermentación anaerobia para mantener la producción de ATP y NADH con etanol como producto final (Dennis *et al.*, 2000). De esta forma, los ERFs son los transductores de la señal del etileno durante el estrés por inundación (Peña-Castro, 2014).

#### **1.4 Papel de los Factores de transcripción en respuesta al etileno (ERFs)**

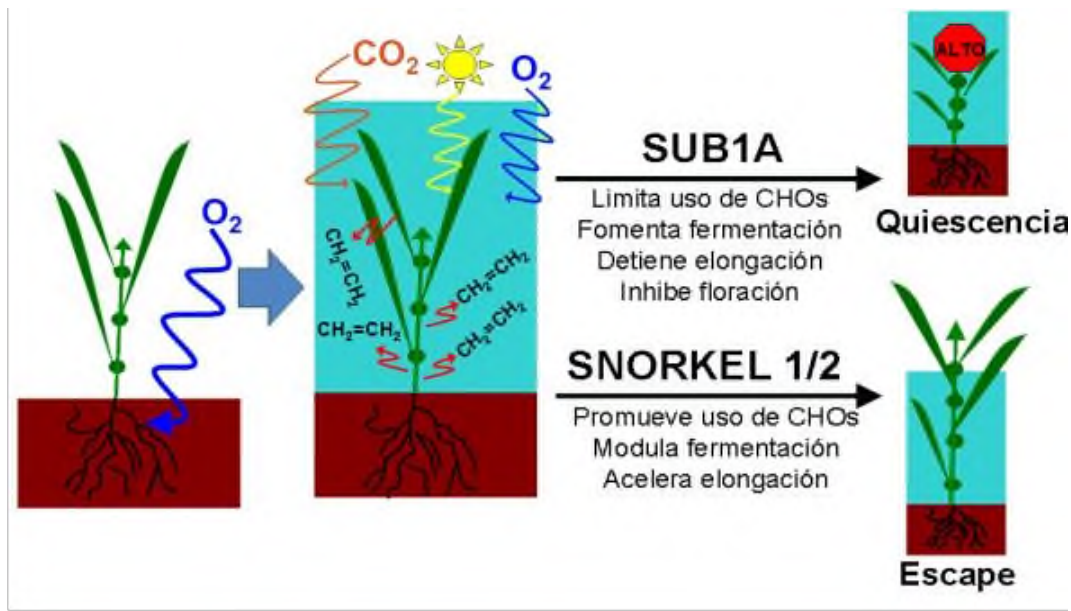
Las reservas de carbohidratos como el almidón, proporcionan azúcares simples y mantienen al organismo vegetal en desarrollo estable (Streb y Zeeman, 2012). En las plantas existen dos mecanismos a nivel molecular para el manejo y la distribución de los carbohidratos durante la inundación que son conocidos como la estrategia de escape y la de quiescencia (Figura 3).

La estrategia de escape está regulada por los ERFs *SNORKEL1* y *SNORKEL2* y se caracteriza por utilizar al máximo los carbohidratos para el aumento de biomasa y dirigir el

flujo energético hacia la elongación, permitiendo así el desarrollo de nuevas hojas con el fin de escapar de la inundación (Hattori *et al.*, 2009; Figura 3). La estrategia de escape se controla subsecuentemente por el ácido giberélico, una fitohormona promotora de crecimiento (Bailey- Serres y Voesenek, 2008 y 2010). Si la planta falla en su intento por escapar a la inundación, se consumen los carbohidratos de reserva causando la muerte.

El segundo mecanismo es la estrategia de quiescencia, descubierta en algunas variedades de arroz tolerantes donde participa el gen *SUB1A-1* (Fukao *et al.*, 2006), un ERF del grupo VII (Nakano *et al.*, 2006). En este mecanismo se detiene el crecimiento vegetal mediante la inhibición de los genes encargados de la elongación con el objetivo de ahorrar energía y tolerar la inundación completa del tejido vegetal (Fukao *et al.*, 2006; Figura 3). Cuando *SUB1A-1* está presente, se hace uso mínimo de los carbohidratos para mantener activas a las funciones esenciales y permanecer en un estado de pausa hasta que la inundación desaparezca, para entonces, poder reanudar con las funciones específicas de cada órgano vegetal (Fukao *et al.*, 2006). Durante el estrés, *SUB1A-1* reduce los ARNm asociados con la inducción de la floración e incrementa la acción de la fitohormona ácido abscísico que inhibe el crecimiento (Peña-Castro *et al.*, 2011).

Otra función de los ERFs en las plantas es ser sensores de estrés para detectar los cambios ambientales y activar sus mecanismos moleculares para la transducción de señales, el control y la regulación de la expresión de genes (Gibbs *et al.*, 2011). En *Arabidopsis thaliana* en presencia de la inundación, los ERFs funcionan como el mecanismo de percepción. En presencia de oxígeno, los ERFs son degradados por la vía de proteólisis N-terminal actuando como un sensor de homeostasis, pero cuando la planta se encuentra con niveles bajos de oxígeno (hipoxia), los ERFs se estabilizan e inician la cascada de señalización (Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011).



**Figura 3. Mecanismos moleculares y respuesta vegetal durante el estrés por inundación en el arroz (*Oryza sativa*).** Se muestran las dos opciones descubiertas al momento que son la quiescencia y el escape, controladas por los ERFs *SUB1A-1* y *SNORKEL1/2*, respectivamente (Peña-Castro, 2014).

### 1.5 Los Factores de Transcripción y la Biotecnología

Una de las herramientas moleculares más sobresalientes de la biotecnología es la ingeniería genética de plantas. Es una disciplina de las ciencias biológicas que permite diseñar y modificar el genoma de un organismo, para generar nuevos conocimientos sobre la herencia y descendencia y dotar de características más ventajosas (genotipo y fenotipo) al organismo (Taiz y Zeiger, 1998).

Actualmente existen técnicas que permiten manipular al ADN de manera eficaz y rápida. Se puede aislar el gen de interés y transferirlo entre organismos; a esto se le llama transferencia horizontal de genes (Peña-Castro *et al.*, 2013). El objetivo es obtener una planta transgénica que se creó introduciendo uno o varios genes de un ser vivo en el ADN

de otro individuo de una especie distinta. La ingeniería genética en plantas ha tenido un gran impacto en el área de investigación científica, en el mejoramiento de cultivos vegetales comerciales y en la medicina para la producción de proteínas recombinantes, vacunas y anticuerpos (Salter *et al.*, 1998).

De esta forma, al conocer la importancia de los ERFs en la respuesta a la inundación, se pueden hacer construcciones genéticas novedosas para transferir las capacidades genéticas a otras especies. Generalmente, el primer paso es probar los efectos de la transferencia en un organismo modelo como *Arabidopsis thaliana*.

*Arabidopsis thaliana* es una planta dicotiledónea que es útil como modelo de estudio en investigación de la biología vegetal y el análisis de organismos complejos (Meinke *et al.*, 1998). Sus principales ventajas son que su genoma es pequeño y su ciclo de vida es corto y que puede ser fácilmente transformada (Zhang *et al.*, 2006).

Esta planta forma parte de la familia *Brassicaceae*, con una gran distribución natural de Europa, Asia y parte de África). Existen diferentes variedades de *A. thaliana* pero las más empleadas son Columbia y Landsberg que se han usado extensamente para el análisis experimental científico (Meinke *et al.*, 1998).

## **1.6 Casete de expresión**

El casete de expresión es la unidad básica de la transferencia génica horizontal. Generalmente consiste de una construcción que contiene la región codificante de la proteína de interés flanqueada por secuencias de bloques de ADN con funciones específicas unidas unas con otras para la expresión *in vivo* o *in vitro* (González *et al.*, 2004). Las tres partes principales de un casete de expresión son el promotor (que dirige la transcripción), el gen de interés (que lleva la característica genética) y el terminador que detiene la transcripción (Karimi *et al.*, 2007). El casete génico también se conoce como secuencias móviles, porque se pueden transferir entre organismos con la ayuda de *Agrobacterium* (Recchia *et al.*, 1997).

La configuración básica del casete de expresión puede ser modificada expresando nuevas características genotípicas y fenotipos al integrarse en el sistema vivo. Se pueden colocar diversos fragmentos funcionales (promotores, genes, terminadores, marcadores) de ADN ya sea de virus, bacteria, hongos, plantas u otros organismos superiores (Peña-Castro *et al.*, 2013). Se pueden hacer compatibles con los sitios de recombinación y la activación de la expresión del promotor al gen con la capacidad de inducir e inhibir, para la transcripción de ARNm y la síntesis de nuevas proteínas recombinantes (González *et al.*, 2004).

El casete de expresión puede construirse usando las técnicas de la biología molecular y determinar el efecto de la expresión del gen. También se pueden emplear comercialmente para obtener plantas más tolerantes a las condiciones ambientales y una mayor productividad agrícola. De esto último, los primeros casos exitosos fueron los cultivos de soya resistentes a herbicidas, luego el maíz resistente a insectos lepidópteros conocido como maíz Bt, del cual se desprenden las variedades transgénicas de algodón, tomate, soya, caña y canola que son resistentes a plagas de insectos (James, 2008). Otro de los cultivos agrícolas de mayor importancia en Asia, es el arroz dorado proveniente de la variedad de arroz (*Oryza sativa*) que presenta con un alto contenido de beta-caroteno (vitamina A) y lo hace eficaz para combatir problemas nutricionales (Mayer *et al.*, 2008).

Para lograr obtener todos estos cultivos modificados, en principio se tuvo que diseñar y construir casetes de expresión con secuencias de ADN de diferentes organismos con funcionalidades deseadas que proporcionarían las características necesarias para enfrentar los factores abióticos del medio ambiente.

## **1.7 Promotores en plantas**

### **1.7.1 Descripción y tipo de promotores**

Los promotores son secuencias de ADN que funcionan como controladores, que están unidos a los genes para inducir el nivel de expresión en diferentes órganos vegetales o en diferentes etapas de su ciclo de vida. Muchas de las investigaciones realizadas han

favorecido numerosos aislamientos de promotores en diferentes organismos vegetales, bacterianos o virales (Karimi *et al.*, 2007; Radonic, 2010). Los promotores permiten seleccionar diversas características como niveles de actividad y patrones de expresión, expresión constitutiva o inducible.

### **1.7.2 Promotores constitutivos**

Los promotores constitutivos son aquellos que expresan fuertemente y de manera casi constante a los genes que preceden. Son los que mayoritariamente se han caracterizado y utilizado en la ingeniería genética. Uno de los promotores más conocidos y de expresión fuerte usado comúnmente para producir plantas transgénicas es el 35S, que proviene del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) (Benfey *et al.*, 1990; Aoyama *et al.* 1997).

El promotor 35S es responsable de la transcripción de todo el genoma de CaMV. Al usarse en la transformación de plantas, se provoca el aumento de la expresión de genes en plantas dicotiledóneas (Benfey *et al.* 1990), mientras que es menos eficaz en plantas monocotiledóneas (Mitsuhara *et al.*, 1996). Otros promotores constitutivos que se utilizan fueron aislados de *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo, el promotor NOS (nopalina sintasa), OCS (octopina sintasa) y MAS (manopina sintasa) (Kononowicz *et al.*, 1992). Para el caso de monocotiledóneas, están el promotor de la ubiquitina del maíz (Christensen *et al.*, 1996) y de la actina de arroz (McElroy *et al.*, 1990).

El promotor 35S se utilizó en estudios previos para analizar el efecto de la sobreexpresión de *SUB1A-1* en *Arabidopsis* con un casete de expresión 35S:FLAG-*SUB1A-1*, donde FLAG es un marcaje inmunogénico que se utiliza para detectar rápidamente la expresión de la proteína transgénica (Peña-Castro *et al.*, 2011). De estos estudios, se determinó que la sobreexpresión de *SUB1A-1* no transfirió la capacidad de tolerar la inundación a *Arabidopsis*, pero sí permitió la transferencia de otras características de la estrategia quiescente del arroz, como floración tardía, sensibilización al ABA, inhibición del GA y acumulación de almidón (Peña-Castro *et al.*, 2011; Núñez, 2015).

### 1.7.3 Promotores inducibles

En algunos casos, el fragmento de ADN unido a un promotor constitutivo puede afectar el crecimiento y desarrollo normal de las plantas en extremo, debido a la acción excesiva de proteínas recombinantes que se acumulan en los órganos vegetales. Como alternativas a esto se tienen los sistemas inducibles. Por tal razón, varios promotores han sido investigados para ser usadas en plantas, especialmente en sistemas modelo como *Arabidopsis* o tabaco para evitar los efectos negativos de la expresión ectópica en la viabilidad de la planta. De esta manera, hay sistemas inducibles por etanol (Caddick *et al.*, 1998), por esteroides (Aoyama *et al.* 1997), por dexametasona (Ouwkerk *et al.*, 2001) y por respuesta a distintos tipos de estrés (Hoff *et al.*, 2001).

Uno de los sistemas más empleados es el inducible por etanol. Es un sistema efectivo que proporciona una expresión inducible fina, un alto nivel de transformación de forma estable o transitoria en plantas y es potencialmente adaptable a una amplia gama de huéspedes (Roslan *et al.*, 2001; Maizel y Weigel, 2004; Dugdale *et al.*, 2013). Este sistema del hongo *Aspegillus nidulans* se ha utilizado en papa, tabaco y *Arabidopsis*, y otros cultivos agrícolas (Roslan *et al.*, 2001).

En este sistema, el promotor 35S activa de forma constitutiva al factor de transcripción AlcR, que responde químicamente a la aplicación exógena de etanol o a su producción endógena (Roslan *et al.*, 2001). En esta forma activada, se une al promotor pAlcA y promueve la síntesis de proteína recombinante del cualquier gen (Maizel y Weigel, 2004). En este trabajo, se propone utilizar este sistema con el gen *SUB1A-1*, para probar la resistencia a la inundación o el aumento de las reservas de almidón en plantas dicotiledóneas, bajo el mecanismo que se ilustra en la Figura 4.

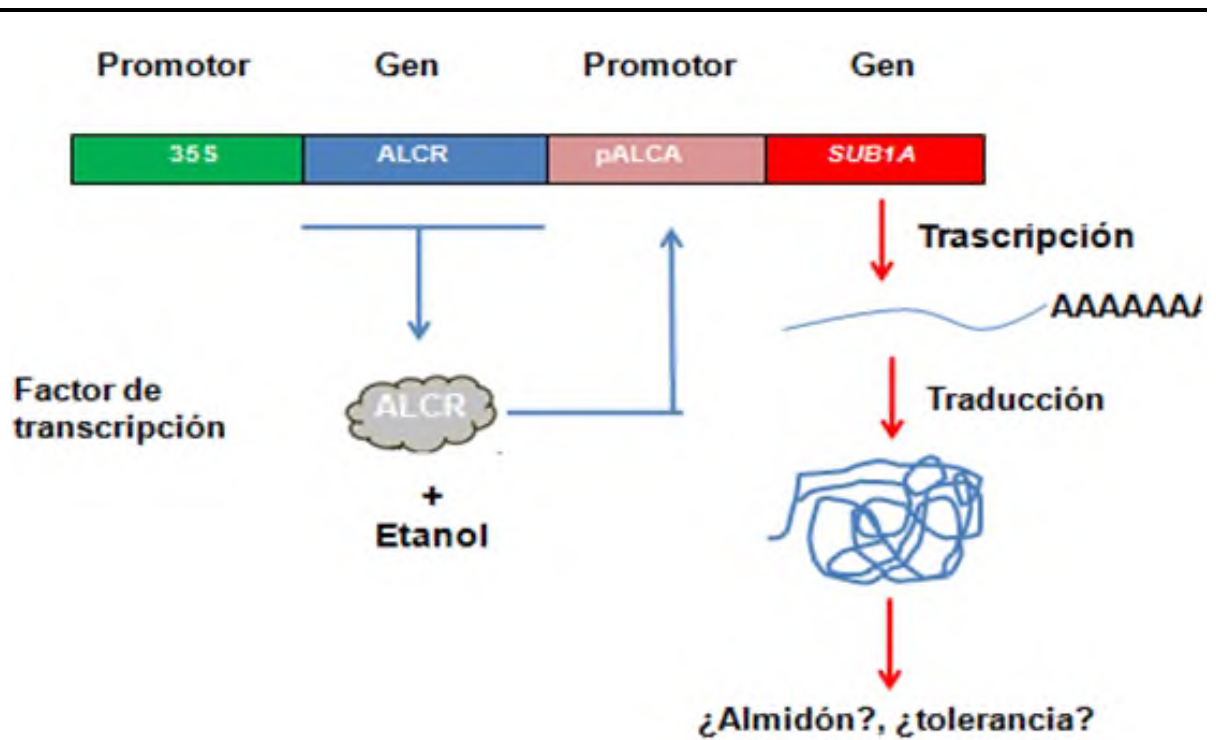


Figura 4. Esquema del mecanismo de expresión y probable aplicación biotecnológica en el aumento a la tolerancia a la inundación y en el mejoramiento del contenido de almidón en la biomasa vegetal para la producción de bioetanol (Zamora-Hernández *et al.*, 2014) del casete propuesto en este trabajo para la expresión del gen *SUB1A-1* bajo el control del promotor inducible por etanol (pAlca).

---

## 2. JUSTIFICACIÓN

La inundación es el segundo estrés que más daño causa en la agricultura en México con serias consecuencias negativas en la productividad en los cultivos. Por lo tanto, ante esta amenaza natural, se buscan desarrollos biotecnológicos para mitigar su impacto negativo y estabilizar la productividad agrícola de gran importancia económica.

El gen *SUB1A-1* pertenece a la familia de factores de transcripción llamados Factores de Respuesta al Etileno (ERFs). *SUB1A-1* controla la respuesta a la inundación en arroz y es de gran interés poder transferir esta característica genética a otras plantas. Sin embargo, al ser un gen que inhibe el consumo de carbohidratos, al expresarse constitutivamente en *Arabidopsis* provoca efectos indeseables como lento crecimiento y paradójicamente, poca tolerancia al estrés por inundación.

En este trabajo se propone una solución biotecnológica con el diseño y la construcción de un casete de expresión inducible con la capacidad de regular la expresión de *SUB1A-1* por etanol añadido o por el producido durante la respuesta a la inundación.

### **3. HIPÓTESIS**

Es posible diseñar *in silico* y construir *in vitro* un vector que permita la expresión inducible de *SUB1A-1*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Construir un vector de expresión binario que contenga al gen *SUB1A-1* (factor de transcripción ERF grupo VII) bajo control de un promotor inducible.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Diseñar *in silico* una estrategia de clonación del gen *SUB1A-1* que permita expresarlo de forma inducible.
- 2.- Aislar la secuencia completa del gen *SUB1A-1* y clonarla en un vector de almacenamiento.
- 3.- Transferir al gen *SUB1A-1* al vector PBJ36\_Alca y subclonarlo en el vector pMLBart\_AlcaR.
- 4.- Verificar por secuenciación de Sanger el orden correcto de la construcción.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

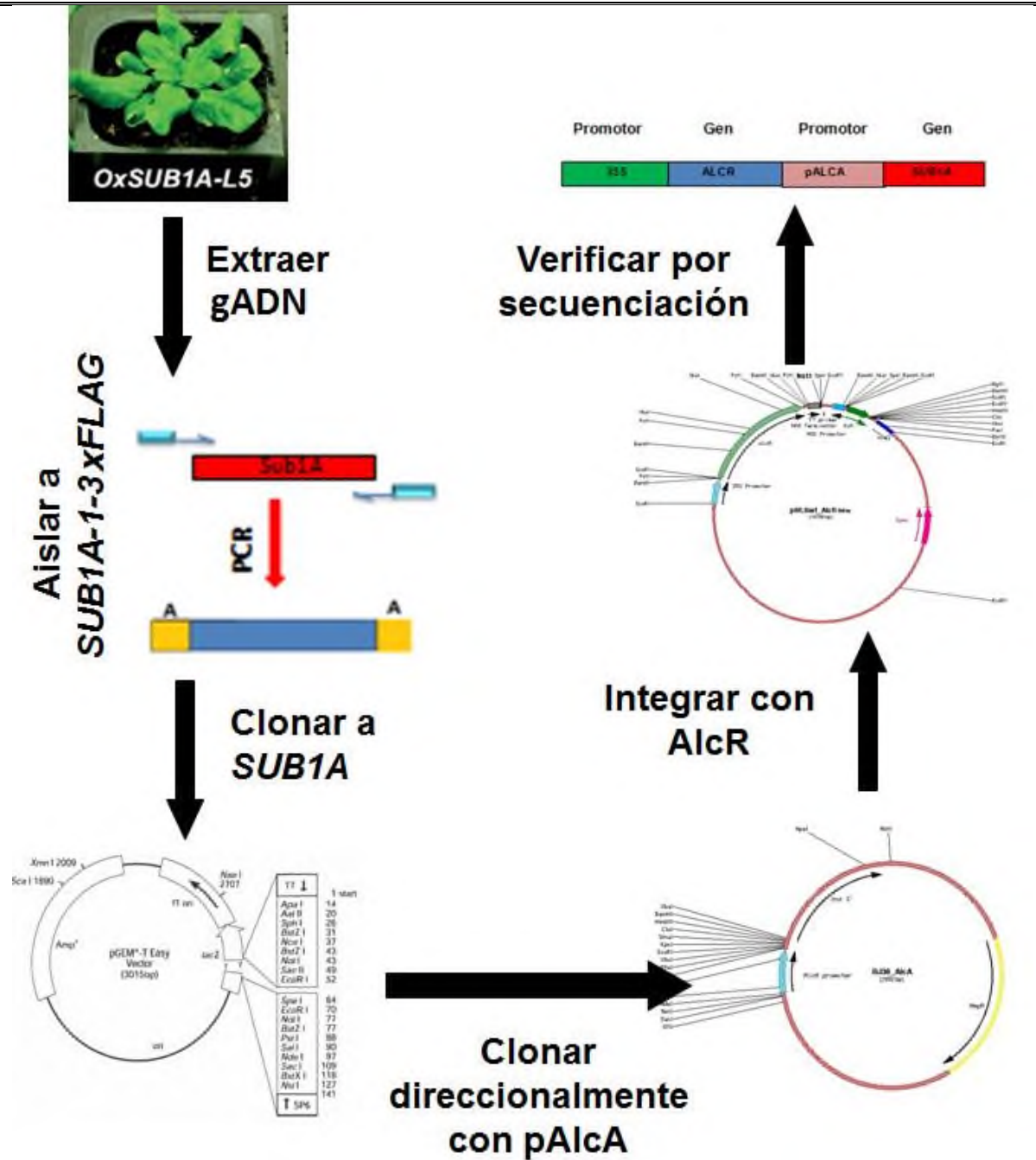


Figura 5. Representación esquemática de la estrategia experimental para la construcción del orden correcto del casete de expresión.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material vegetal

Para aislar al gen de *SUB1A-1* se utilizaron plantas de 14d de *Arabidopsis thaliana* variedad Columbia-0 (Col-0) previamente transformadas con el casete 35S:*SUB1A-1*-3xFLAG (Peña-Castro, datos no publicados). Las plantas se crecieron en una cámara de crecimiento controlado (Conviron, CMP6010) con un régimen de 16 h de luz y 8 h de oscuridad utilizando el medio MS (sales MS 0.5X, sacarosa 1%, agar 1%, pH 5.7). Las plantas se colectaron al mediodía. Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

### 7.2 Extracción de ADN genómico

Las plantas de *Arabidopsis* se trituraron en un mortero previamente congelado en nitrógeno líquido. Para evitar el descongelamiento del tejido, se vertió nitrógeno líquido sobre la muestra cuando era necesario.

El polvo obtenido del material vegetal se colectó en un microtubo de 1.5 ml y se agregaron 500 µl de buffer de extracción EB (solución de EDTA 50 mM, NaCl 500 mM y Tris 100 mM), se homogenizó en el vortex, y se incubó por 30 min a 65°C. Enseguida se añadieron 500 µl de solución cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se homogenizó en el vortex por 30 segundos. Se centrifugó 10 min a máxima velocidad (21,100 g) y se recuperó el sobrenadante en un nuevo microtubo. Se añadieron 500 µl de isopropanol (2-propanol), se agitó en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se centrifugó 15 min a máxima velocidad y se decantó el isopropanol. Se añadieron 750 µl de etanol al 70% (V/V) a la pastilla y se centrifugó a máxima velocidad durante 7 min y se decantó el etanol. La pastilla se disolvió en 20 µl de agua desionizada previamente esterilizada por autoclave, filtrada en una membrana de 0.45 µm y tratada con luz UV por

10 min a máxima potencia. Por último, el ADN genómico en solución se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Para verificar la calidad de ADN genómico se usó la electroforesis en gel de agarosa al 1% (Ver sección de electroforesis).

### **7.3 Software Vector NTI y diseño *in silico***

El Software Vector NTI 11 se descargó de la página de internet del fabricante Invitrogen en el URL <http://www.invitrogen.com>, se utilizó la versión de prueba gratuita. Las secuencias de los vectores (ver sección de vectores) se descargaron de la página de internet del laboratorio del profesor Detlef Weigel en el Instituto Max Planck en Alemania con el URL <http://weigelword.org/resources>. Las secuencias de ADN de los genes *SUB1A-1* y *SUB1C-1* se obtuvieron del reporte de Fukao *et al.* (2008).

Tanto vectores como secuencias se combinaron con las opciones "Cloning" > "Using Construct/Design". Los oligonucleótidos de asilamiento y secuenciación con la opción "Analysis" > "Primer Design" con dos vertientes, la primera para diseño con fines de PCR en "PCR Primers" con la simulación en "PCR using existing oligos" y la segunda para secuenciación en "Primers" > "Sequencing Primers".

### **7.4 Reacción en cadena de la polimerasa**

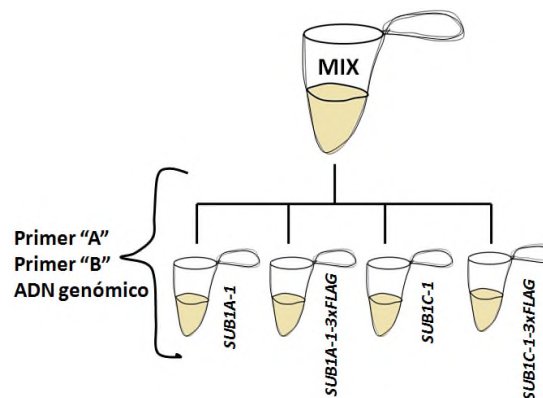
Los oligonucleótidos se sintetizaron por la compañía Integrated DNA Technologies (oligonucleótidos para PCR) y por Macrogen (oligonucleótidos de secuenciación).

La amplificación de ADN se realizó en un termociclador (Axygen, MaxyGene Gradient) para microtubos de 50 µl. La enzima utilizada fue una ADN polimerasa termoestable de *Pyrococcus* de alta fidelidad (Phusion, NEB). Una mezcla de reacción

característica consistió de agua (12.4  $\mu$ l), Buffer 5x (4.5  $\mu$ l), dNTP (0.4  $\mu$ l), primer 5' (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l), primer 3' (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l), Phusion ADN polimerasa (0.2  $\mu$ l) y gADN (1  $\mu$ l).

Para adenilar los productos producidos por Phusion se reamplificó por PCR con la enzima Dream Green Taq que ya incluye dNTPs y enzima en la mezcla de reacción (Fermentas, K10819). La mezcla de PCR se preparó en frío después de descongelar todos los componentes en hielo, homogenizarlos por inversión y centrifugarlos brevemente a 9,600 g. El agua utilizada en las reacciones fue destilada, desionizada (Barnstead, B-pure), esterilizada por autoclave (15 min a 15 psi) y tratada por 10 min con luz UV (UVP, HL-2000 HybriLinker).

Las muestras se distribuyeron en microtubos de 0.2 ml para PCR (17  $\mu$ l para cada una) y después se añadieron los oligonucleótidos y ADN genómico correspondiente para un volumen final de 20  $\mu$ l, como se muestra en la Figura 6.



**Figura 6. Preparación de muestras de PCR a partir de una mezcla maestra central para minimizar errores de pipeteo.**

---

Los oligonucleótidos utilizados para cada reacción fueron los diseñados utilizando Vector NTI (ver detalles en Resultados y Discusión) para la amplificación de los genes *SUB1A-1* (Sub1AEcoRI5', TTCGGAATTCATGTGTGGAGGAGAAGTGATC; Sub1AHindIII3',

CGTTAAGCTTTCAGGCTTCCCCTGCATATGA), *SUB1A-1-3xFLAG* (AEcoRI5';  
3xFLAGHindIII3'CGTTAAGCTTTCACCTTGTCATCGTCATCCTT) *SUB1C-1* (SubCEcoRI5'  
TTCGGAATTCATGCGCCGCCGCGTCTCCTCC; Sub1CHindIII3'  
CGTTAAGCTTTTAGCTCCAGAAGCGCATGTC), y *SUB1C-1-3xFLAG* (AEcoRI5' y FLAGHindIII3').

Las condiciones de la reacción en el termociclador se programaron de la siguiente forma: Desnaturalización inicial 98°C por 60s, 1 repetición. Ciclado por 40 veces a 98°C por 10s, 60°C por 30s, 72°C por 60s y un paso final de 72°C por 10 min. Las reacciones se resguardaron en la función de enfriamiento del termociclador hasta que se almacenaron a -20°C o se procesaron inmediatamente.

## 7.5 Electroforesis y purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 2% con el marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 a 1000 pb, Thermo, SM0248). Los fragmentos de ADN amplificados fueron desplazados mediante un campo eléctrico en una cámara electroforética con el buffer TAE al 1X. Una vez hecho el corrimiento, se sumergió en la solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 µg/ml durante 2 min y después se enjuagó en agua durante 10 min.

Al finalizar la electroforesis se visualizó la banda correspondiente del fragmento de ADN con la ayuda de un transiluminador UV y se procedió a extraer la porción de gel que contiene la banda de ADN con la ayuda de un bisturí y la pantalla de protección visual. El gel escindido se almacenó en un microtubo de 1.5 ml. Se expuso el mínimo tiempo posible el ADN a la radiación UV para evitar su degradación.

Las moléculas de interés se purificaron del gel con el kit comercial Gene Jet (Thermo, K0691). Para ello, primero se pesaron los microtubos vacíos, se les colocó el fragmento de gel y se volvieron a pesar para calcular la adición del buffer Binding en una relación 1:1 W/V. Se incubó la mezcla a 60°C hasta que el gel se disolvió por completo (se

agitó cada 3 min), se mezcló en vortex y se transfirió a la columna de extracción donde se centrifugó a 14,600 g por 1 min (condiciones de centrifugación para todo el protocolo). Posteriormente se descartó la solución, nuevamente se agregaron 100 µl de buffer Binding y se centrifugó por 1 min. Se retiró la solución y se agregaron 700 µl del Wash buffer con etanol y se descartó el centrifugado. Se centrifugó nuevamente por 1 min para eliminar por completo los residuos de etanol. Finalmente se colocó a la columna de extracción en un microtubos de 1.5 ml y se dejó abierto la tapa para que se evaporara el etanol y después se colocó 20 µl del buffer Elution, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 1 min.

El ADN se cuantificó en un microespectrofotómetro de luz UV (Nanodrop 2000, Thermo) realizando un barrido de 220 nm a 350 nm. Se registraron la concentración, la relación 260/280 (>1.8 buen indicativo de baja contaminación por proteínas) y la relación 260/230 (>1.8 buen indicativo de baja concentración de contaminantes orgánicos).

## 7.6 Plásmidos

Los amplicones obtenidos por PCR se clonaron en diferentes vectores para lograr la construcción final inducible siguiendo el diseño experimental detallado en la Figura 5. Los diferentes vectores que se utilizaron en los experimentos y sus características se presentan en la Tabla 1.

El vector pGEM-T Easy Vector está integrado por 3015 pares de bases, posee en los extremos 3' una timina libre que se unen por complementariedad con los extremos A de los productos de PCR facilitando la inserción de éstos en el vector. La presencia de timina en los extremos 3' del vector impide su recircularización, aumentando la eficiencia del proceso de ligación. Los clones positivos insertados con la secuencia de *SUB1A-1* en el sitio de clonación múltiple del vector comercial, presentarán una coloración blanca en presencia de los compuestos IPTG y X-Gal debido a que se interrumpe la región codificante de LacZ, mientras que las clonas libres

de secuencia del gen presentarán una coloración azul.

<b>Tabla 1. Descripción y características de vectores que se utilizaron en la obtención de la construcción inducible.</b>		
<b>Vector</b>	<b>Característica</b>	<b>Origen</b>
pGEM-T Easy	Vector lineal con sitio T/T, marcador AmpR para bacteria, región lacZ interrumpida (Figura 7).	Vector comercial de Promega, A3610A.
BJ36_AlcA	Promotor alcA con sitio múltiple de clonación al frente, marcador AmpR para bacteria (Figura 8).	Donado por el profesor Detlef Weigel del Max Planck Institute. <a href="http://www.weigelworld.org/">http://www.weigelworld.org/</a>
pMLBart_AlcR	Cassette de expresión flanqueado por borde izquierdo y Derecho de T-DNA con región 35S:ALCR con sitio NotI para incorporar al casete pAlcA:Gen-de-Interes. Marcador BASTA para plantas (Figura 9)	Donado por el profesor Detlef Weigel

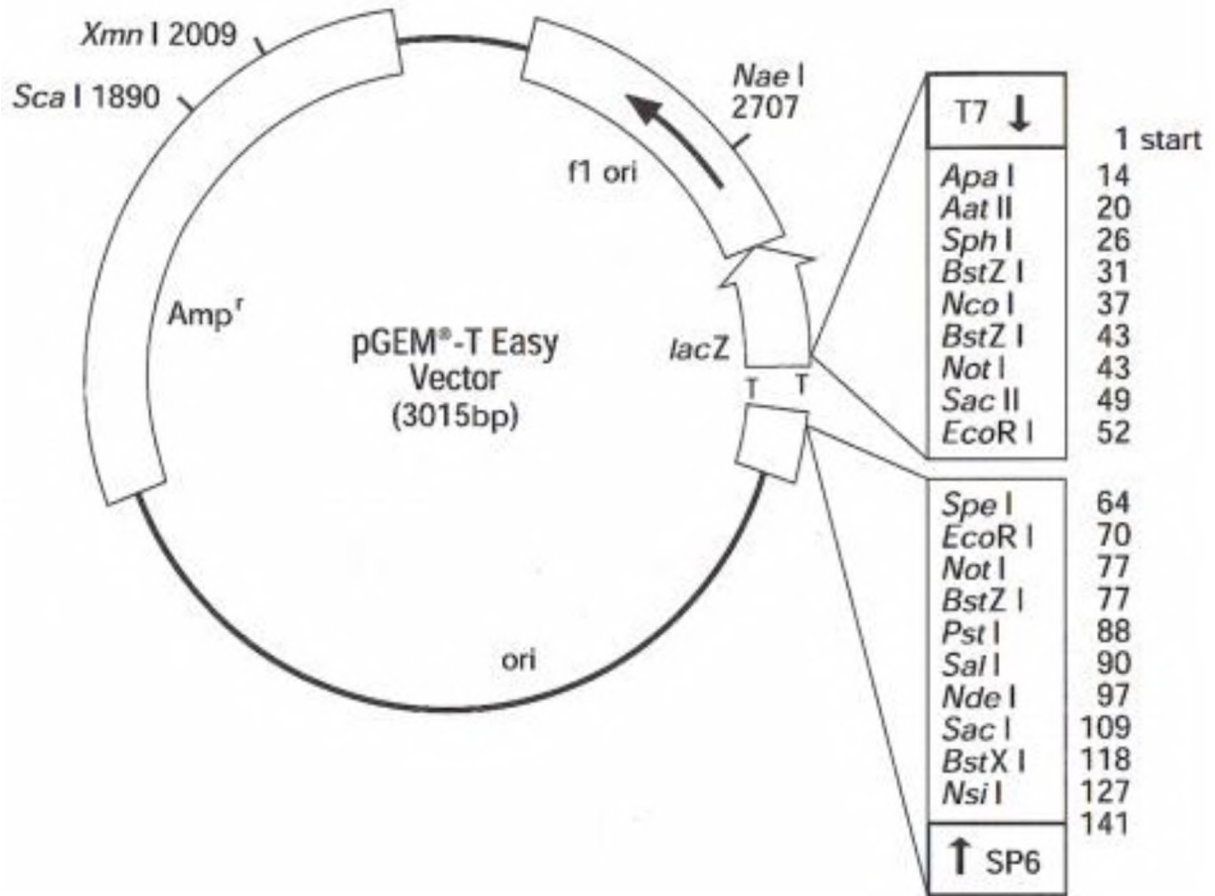


Figura 7. Representación esquemática del vector comercial pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).

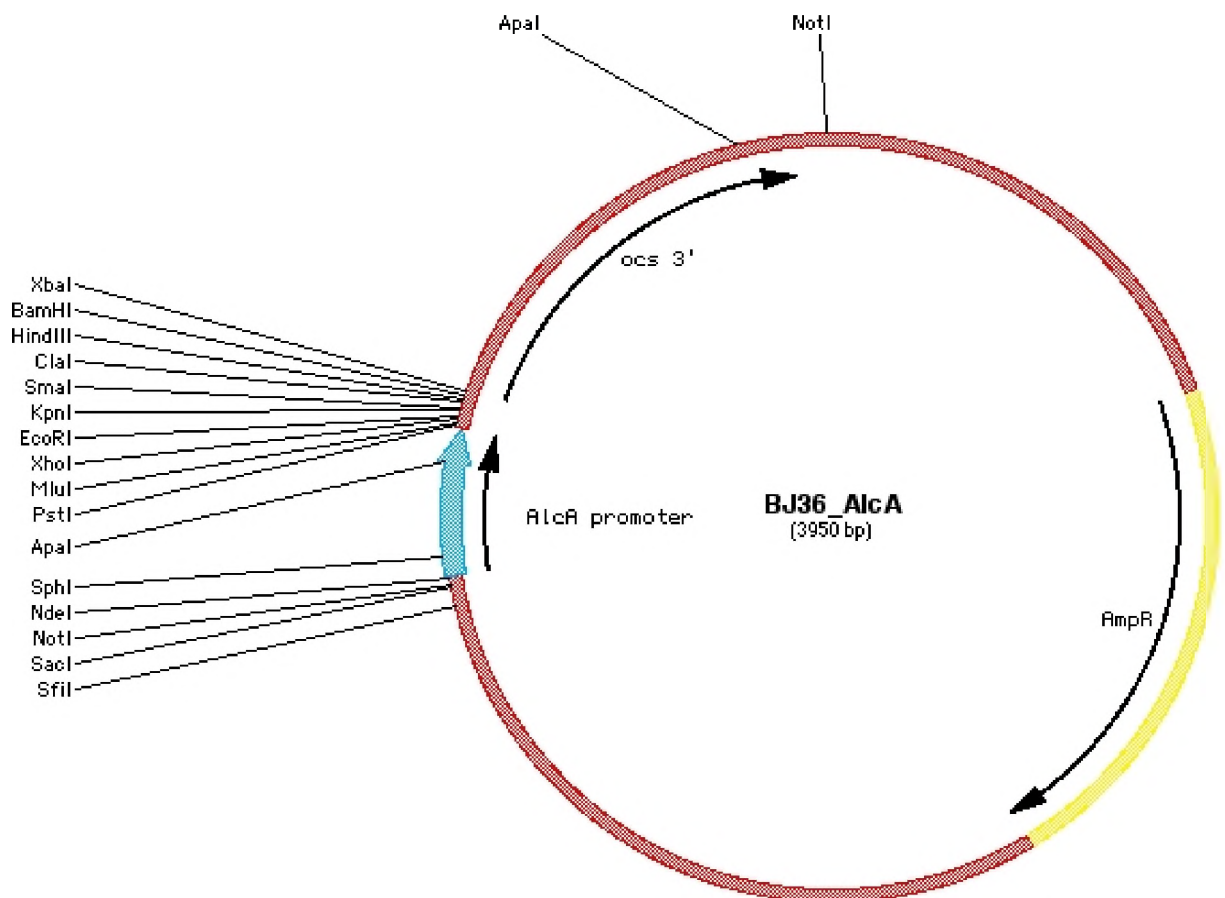


Figura 8. Representación esquemática del vector pBJ36\_AlcA.

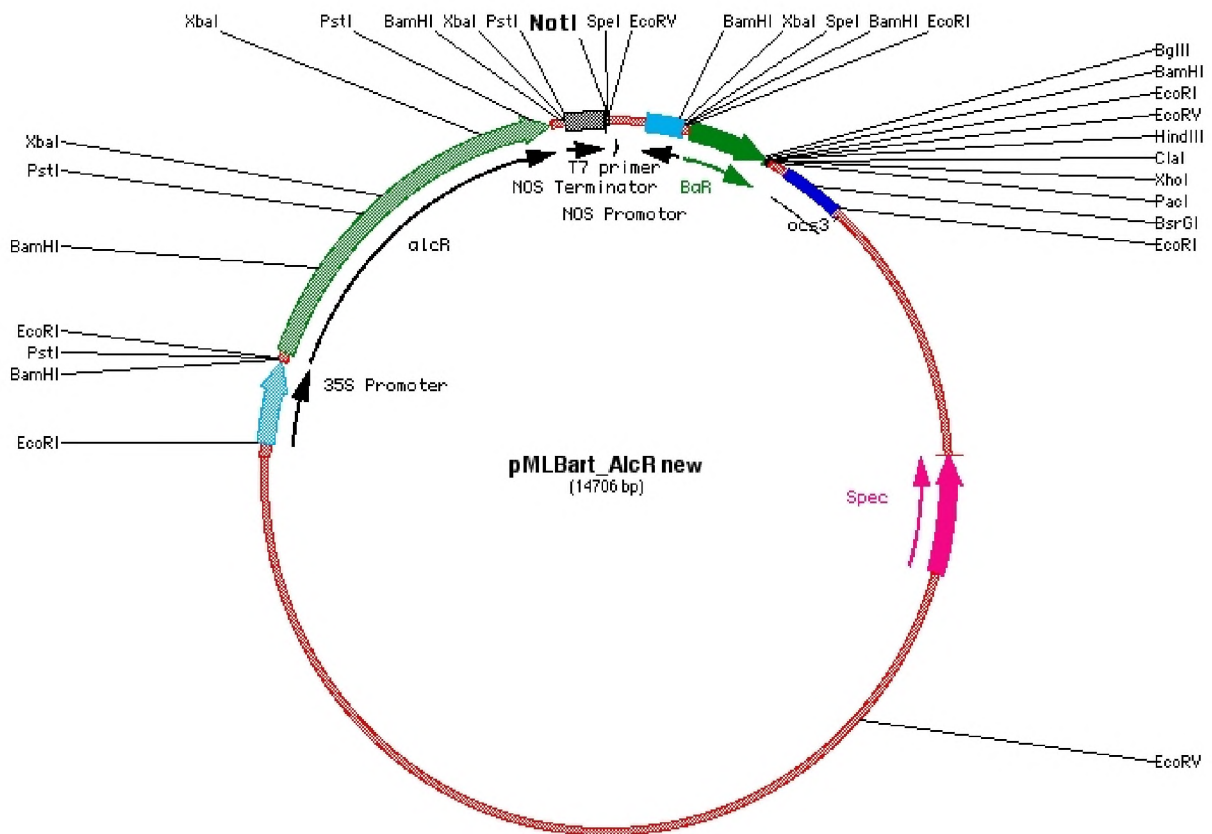


Figura 9. Representación esquemática del vector pMLBart\_AlcR.

El plásmido pBJ36\_AlcA tiene un tamaño de 3950 pb, posee la secuencia del promotor inducible por etanol AlcA y la señal de poliadenilación de la octopina sintetasa (OCS) dichas regiones a su vez son flanqueadas por secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción NotI, lo cual permite el posterior subclonado de segmento de ADN de interés en un vector binario. Además posee una región de secuencia que codifica para resistencia a ampicilina y un origen de replicación para *E. coli*.

El vector pMLBart\_AlcR está constituido por el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (35SCaMV) y el gen del factor de transcripción fúngico AlcR, con la capacidad de controlar la transcripción de ADN en la presencia de etanol. También tiene una señal de poliadenilación de la octopina sintetasa (OCS). Además confiere resistencia a espectinomicina para bacteria y BASTA (BaR) para planta. Es un sistema de expresión inducible por etanol para la producción de proteínas recombinantes en plantas.

## **7.7 Cultivo de *Escherichia coli***

La cepa bacteriana que se utilizó en este trabajo experimental fue *Escherichia coli* One Shot Top 10 químicamente competente (Invitrogen, C404003). Esta cepa tiene una alta eficiencia de transformación ( $1 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g de ADN) y es ideal para la clonación y propagación de plásmidos.

Las bacterias se crecieron en medio LB (Luria-Bertani) compuesto por triptona 10 g l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g l<sup>-1</sup>, cloruro de sodio 10 g l<sup>-1</sup>, pH de 7.5 y 15 g l<sup>-1</sup> de agar. Cuando se requirió medio líquido, se realizó el mismo procedimiento pero sin agregar agar.

La transformación de células competentes se realizó mediante choque térmico. Se mezclaron 5  $\mu$ l de ADN en el vial de 50  $\mu$ l células competentes de *E. coli*. Se realizaron las siguientes secuencias de incubación: 30 min en hielo, luego a 42°C durante 30 segundos en un termobloque y de inmediato se incubaron en hielo a 2 min. Posteriormente, se les agregaron 250  $\mu$ l de medio SOC líquido y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación de

180 rpm. Por último, se plaqueó la alícuota a una caja Petri preparada con el antibiótico correcto incorporado (antes de gelificación) de una solución concentrada 1000x y esterilizado por filtración en membrana de 0.20  $\mu\text{m}$ , para pGEM-T-Easy y BJ36\_AlcA es ampicilina ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y para pMLBart\_AlcR es espectinomicina ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Para el caso del vector pGEM-T Easy también se adicionaron los compuestos IPTG y X-GAL. Se incubó durante una noche a temperatura regulada de  $37^{\circ}\text{C}$ .

La conservación de las colonias de bacterias transformadas durante largos periodos de tiempo se llevó por congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio LB adicionado con glicerol al 50% estéril. Para la conservación de las colonias durante periodos de tiempo corto y permitir su uso inmediato a partir de colonias aisladas, se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en placas Petri con el medio sólido de LB, adicionado con antibióticos correspondientes, por periodo máximo de un mes.

## 7.8 Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

Para la extracción de ADN plasmídico las bacterias se cultivaron en medio LB que contenía el antibiótico adecuado para cada tipo de plásmido (ver sección anterior) durante  $\sim 12\text{h}$ ; posteriormente, los cultivos se centrifugaron (1 min a 9,600 g) y el paquete celular se empleó para extraer plásmidos mediante lisis alcalina (Green y Sambrook, 2012). En la Tabla 2 se detallan las soluciones utilizadas y en la Tabla 3 la preparación de los tres buffers para procesar 20 muestras.

<b>Tabla 2. Soluciones base para la extracción por el método alcalino de plásmidos.</b>			
<b>Concentración final</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Peso molecular g/mol</b>
0.5 M	EDTA pH:8.0	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	292.24
2.5 M	NaCl	NaCl	58.44
1.0 M	TRIS pH:8.0	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	121.14
5 %	SDS	$\text{C}_{12}\text{H}_5\text{NaO}_4\text{S}$	288.38

El EDTA (ácido etilendiamino tetra acético) es un agente quelante de iones metálicos como  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  y su función es inhibir la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así proteger al ADN. El cloruro de sodio aumenta el poder iónico de la solución y ocasiona la precipitación del ADN. El TRIS (trisamino metano) es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (pH 7.0 - pH 8.0). Finalmente, el SDS (soddecil sulfato de sodio) es un detergente aniónico que actúa como agente solubilizante de proteínas y de componentes de tejidos y membranas.

<b>Tabla 3. Soluciones de aislamiento de plásmidos.</b>		
<b>Buffer I</b> (Mantenerlo en frío)	<b>Buffer II</b> (Temperatura ambiente)	<b>Buffer III</b> (Mantenerlo en frío)
1935 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$	3120 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$	852 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
40 $\mu\text{l}$ de EDTA(0.5 M) pH:8.0	800 $\mu\text{l}$ de SDS	344 $\mu\text{l}$ de ácido acético glacial
25 $\mu\text{l}$ de TRIS (25mM) pH:8.0	80 $\mu\text{l}$ de NAOH	1,800 $\mu\text{l}$ de acetato de potasio

Para extraer al plásmido, las bacterias empaquetadas se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de buffer I agitando en vortex vigorosamente. Luego se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de buffer II y se mezcló por inversión. Después, se adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de buffer III, primero se mezcló por inversión y después por vortex y se incubó durante 5 min en hielo. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 16,200 g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo 24:1 (V/V), se agitó vigorosamente y después se centrifugó a 4°C durante 2 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo y se añadieron 750  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se agitó vigorosamente, se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 4°C durante 5 min, y se decantó el etanol. Se lavó la pastilla con 1ml de etanol al 70%, se agitó por vortex vigorosamente y se centrifugó durante 2 min. Se retiró el etanol y se dejó a reposar para evaporar el resto de etanol. Por último se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  con RNAsa (2  $\mu\text{l}$  de solución 10 mg/ml en

1000  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , Thermo, ENO531) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 h, se utilizó inmediatamente o se guardó a  $-20^\circ\text{C}$ .

## 7.9 Ligación y digestión de moléculas de ADN

La clonación en el vector pGEM-T-Easy se realizó en una mezcla de reacción que contenía la ligasa y el vector linearizado y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  por una noche (Buffer 2x 5  $\mu\text{l}$ , vector 1  $\mu\text{l}$ , T4 ligasa 1  $\mu\text{l}$ , inserto de PCR 3  $\mu\text{l}$ )

Para liberar al fragmento *SUB1A-1* clonado en el vector pGEM-T easy se digirió con EcoRI y HindIII simultáneamente a  $37^\circ\text{C}$  por 4 h en el buffer universal NEB (agua 11.2  $\mu\text{l}$ , Buffer Cutsmart 2.0  $\mu\text{l}$ , EcoRI 0.4  $\mu\text{l}$ , HindIII 0.4  $\mu\text{l}$  y 6 $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico). La inactivación de las enzimas fue a  $65^\circ\text{C}$  por 20 min. El vector PBJ36\_AlcA se digirió de la misma forma. Tanto el producto liberado como el vector linearizado se corrieron en una electroforesis y fueron purificados del gel como se describió anteriormente.

Con el microespectrofotómetro se cuantificó la concentración de ADN y la pureza de las muestras. Se realizaron los cálculos de molaridad del inserto *SUB1A-1*, este es uno de los pasos más importantes en la ligación porque permite calcular las cantidades necesarias de los componentes (buffer, ATP,  $\text{H}_2\text{O}$  dd, ligasa, inserto, vector), en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  y una relación de inserto:vector de 3:1.

El cálculo de la molaridad de los extremos se realizó con las instrucciones del URL <https://www.neb.com/faqs/2012/02/15/how-to-calculate-the-molarity-of-ends>. Las fórmulas fueron implementadas en una tabla de cálculo de Excel (Figura 10) donde automáticamente se realizaron los cálculos de molaridad necesarios para saber el volumen de vector e insertos a pipetear. La tabla funciona alimentando las mediciones de Nanodrop, la relación inserto:vector, los pares de bases y el volumen de reacción.

Cálculo de la molaridad de un vector y su inserto												
Tipo de molécula	Lectura de Nanodrop (ng/ul)	Conc. (ug/ul)	Pares de Bases	Conc. (nM)	ng máximos en la ligación (20-100 ng por 20 ul rx)	Volumen de reacción (10-20 ul)	Conc. (ug/ul)	nM de molécula en ligación	Proporción Inserto:Vector (ej. 3:1, poner 3)	Molaridad necesaria del inserto (nM)	Cantidad necesaria (ng)	ul de molécula en ligación
Vector	32.3	0.0323	14706	8.7381	100	10	0.01	2.85206	3	6.27687206	42.87667206	3.096
Inserto	10.8	0.0107	2100	15.87706			10					4.004
												7.1 DNA total (ul)
												1 Buffer (ul)
												1 ATP (ul)
												0.66 RAPID Ligasa (ul)
												0.24 AGUA (ul)
												10 Total (ul)

Figura 10. Tabla de cálculo implementada para calcular los componentes de reacciones de ligación en molaridades y relaciones molares determinadas.

La fórmula *a*) permitió calcular la concentración de inserto ( $Q_i$ ) para lograr la relación deseada inserto:vector a partir de mediciones espectrofotométricas.

$$a) \quad Q_i = \left( \frac{M_i}{(2)(1 \times 10^9 \text{ nm})} \right) (pB_i * 650) (V_r * 1,000 \text{ ng})$$

Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$b) \quad N_v = C_v \left( \frac{1 \mu\text{g}}{1,000 \text{ ng}} \right)$$

$N_v$  = Factor de conversión ng/ $\mu$ l a  $\mu$ g/ $\mu$ l

$$c) \quad M_v = \left( \frac{N_v}{pB_v * 650} \right) (2)(1 \times 10^9 \text{ nm})$$

$M_v$  = Determinación de molaridad de los dos extremos del vector en nM

$$d) \quad Q_v = \left( \frac{F}{V_r} \right) \left( \frac{1 \mu\text{g}}{1,000 \text{ ng}} \right)$$

$Q_v$  = Concentración en  $\mu$ g/ $\mu$ l de vector en la ligación con peso de vector ( $F$ , 20-100 ng por 20  $\mu$ l de reacción) y volumen de reacción deseados ( $V_r$ , 10-20  $\mu$ l).

e)  $Mi = (Mv)(Pi)$

$Mi$ = nM necesarios de inserto en ligación para cumplir con la proporción indicada ( $Pi$ , 2 = 1:2, 3 = 1:3).

Dónde:

$Cv$ = Lectura de Nanodrop (ng/ $\mu$ l) del vector  $Vr$ =Volumen de reacción (10-20 $\mu$ l)

$pBv$ =Pares de bases (vector)

$Pi$ = Proporción de inserto (2=1:2, 3=1:3,

$pBi$ = Pares de bases (Inserto)

etc.)

$F$ = ng máximos totales en la ligación (20-100 ng por 20  $\mu$ l de reacción)

Una vez realizados los cálculos, se llevó a cabo la ligación con la enzima ligasa (Epicentre, EP25-20818) por 1 h a temperatura ambiente y se desactivó a 70°C durante 15 min. Para transformar a las células competentes de *E. coli* se usó un máximo de 5  $\mu$ l de ligación en 50  $\mu$ l de células.

Para transferir la construcción *pAlcA:SUB1A-1* al vector *AlcR*, ambos se digirieron con la enzima *NotI* a 37°C por una hora y la inactivación de la enzima fue a 65°C por 20 min. Tanto el fragmento *pAlcA:SUB1A* como el vector *AlcR* linearizado se purificaron por extracción de gel y por precipitación con acetato de sodio 3M en una relación 10% V/V por 2 h a -20°C para después limpiarse con tres volúmenes de etanol al 70% dos veces. La ligación de ambos se realizó como ya se describió.

## 7.10 Secuenciación de vectores

Los oligonucleótidos de secuenciación se diseñaron como ya se mencionó en la sección 7.1. Los oligonucleótidos cubrieron toda la secuencia del gen *SUB1A-1* incluida la

marca 3xFLAG, a partir del vector para verificar la clonación direccional (Figura 11). La secuencia de los oligonucleótidos se detalla en la Tabla 8.

Las colonias que resultaron positivas en la transformación y en las digestiones de prueba se volvieron a crecer en 5ml de medio LB. El plásmido ahora se extrajo con el kit QIAprep (Qiagen, 27104) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos diluidos se cuantificaron en el miniespectrofotómetro Nanodrop para tener una concentración de 200 ng/ $\mu$ l.

Los plásmidos se enviaron en solución al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, CINVESTAV-Irapuato) para su secuenciación por el método de Sanger. Los resultados de la secuenciación se recibieron como archivos tipo \*.AB1 y se leyeron con el programa CHROMAS. Las secuencias se armaron seleccionando las secuencias que no estuvieran sobrelapadas y con una calidad determinada por la diferenciación entre picos.

Para verificar la fidelidad de la secuencia clonada, se realizaron análisis tipo alineamiento con el software en línea EMBOSS [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html). Para considerar exitoso el proceso de clonado, la homología debería ser de 100% con la reportada por Fukao *et al.* (2008).

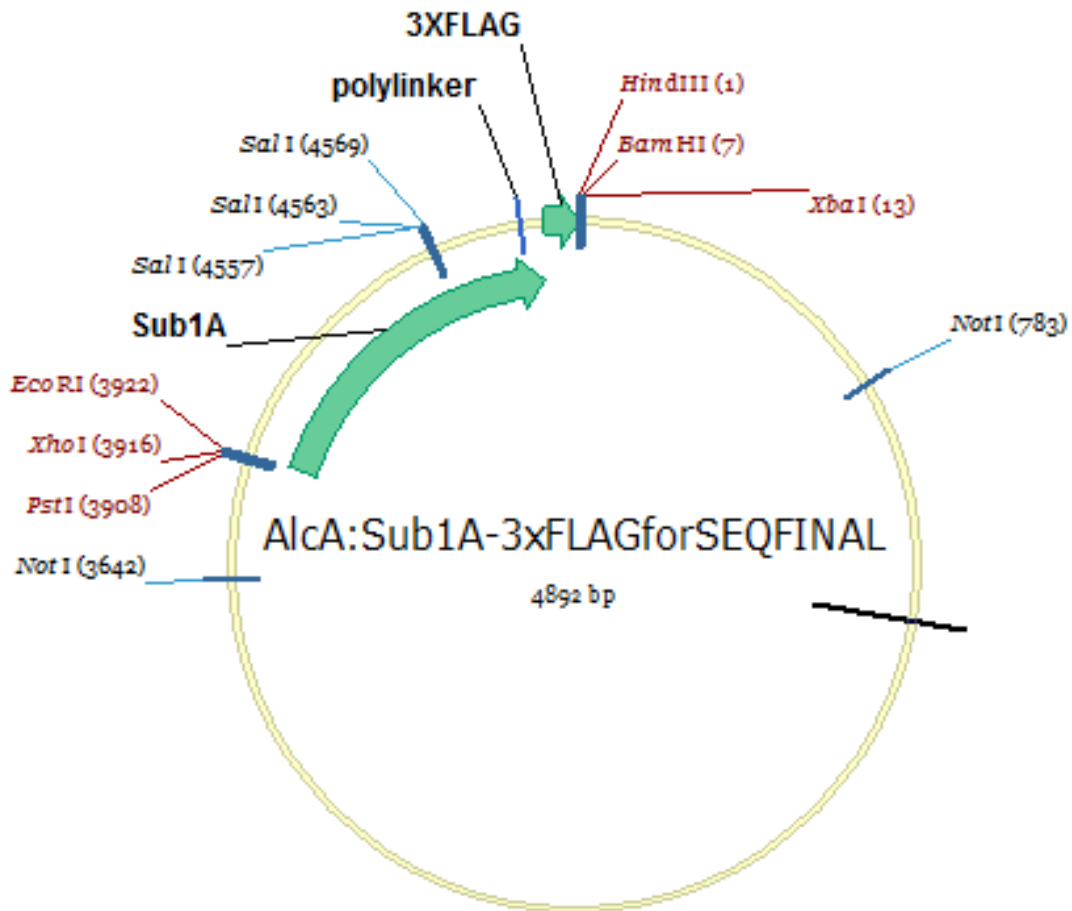
## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Simulación *in silico* en el software Vector NTI

En este trabajo de investigación se usó la simulación *in silico* para la confirmación del funcionamiento de la estrategia experimental propuesta (Figura 5) así como para la detección de posibles problemas en las reacciones de digestión, inserción direccional y reconocimiento de las secuencias por las enzimas de restricción. También fue de gran utilidad para realizar interpretaciones y simulaciones de electroforesis, diseño de oligonucleótidos para reacciones de PCR, verificación y análisis de los resultados de secuenciación del casete de expresión.

El más frecuente de los problemas durante una clonación es la detección del movimiento de marco de lectura, por lo tanto el software permite corregir la pauta de lectura en fase correcta con un diseño adecuado de oligonucleótidos y de ésta forma, se minimiza el tiempo experimental y gasto de insumos.

Así que el trabajo *in silico* permitió una guía computacional para analizar y darle seguimiento a todos los pasos del trabajo experimental en la construcción *in vitro* del plásmido binario deseado.



**Figura 11. Plásmido binario con el casete de expresión pAlcA:SUB1A-1-3xFLAG.** Resultado de la simulación realizada con el software Vector NTI (Invitrogen), donde se confirma el diseño experimental para obtener un plásmido con el orden correcto de los sitios de ligación (EcoRI en el extremo N terminal y HindIII en el C terminal), y la fase del marco de lectura del gen *SUB1A-1* con la marca inmunogénica *3xFLAG*. Se observan también los sitios NotI que servirán para la subclonación el vector pMLBart\_AlcR (Figura 9).

## 8.2 Extracción de ADN genómico

Como fuente de material genético para aislar a los genes de arroz *SUB1A-1* y *SUB1C-1*, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas previamente en la Universidad de California Riverside (Peña-Castro, datos no publicados) con un casete de expresión 35S:SUB1A-1-3xFLAG o 35S:SUB1C-1-3xFLAG clonados con la tecnología Gateway (Karimi *et al.*, 2007). Para la extracción de ADN genómico vegetal (gADN) se utilizó un método de extracción por maceración en nitrógeno líquido y limpieza por cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).

Para verificar la extracción, el material genético resolubilizado se corrió en geles de agarosa al 1%. Se pudo observar una banda esperada de alto peso molecular que indica la presencia de gADN y un barrido de bajo peso molecular indicativo de ARN degradado (Figura 12).



**Figura 12. Electroforesis de ADN genómico.** Geles de agarosa al 1%, **M:** Marcador de peso molecular; **1:** ADN genómico de plantas OxSUB1A; **2:** ADN genómico de plantas OxSUB1C.

---

De tal forma, se procedió a utilizar este gADN para verificar su capacidad de amplificación y poder realizar la extracción por PCR de los genes de interés.

### 8.3 Diseño de oligonucleótidos

Para aislar a los genes de interés, se diseñaron con Vector NTI oligonucleótidos para usarse en PCR y que amplificaran la secuencia completa desde el codón de inicio hasta el codón de paro. Se hicieron dos opciones de oligonucleótidos, una que permitiera aislar a los genes de interés sin marca inmunogénica 3xFLAG (Figura 13) y otro que si la incluyera (Figura 14).

---

#### ***SUB1A-1* (846 bp)**

**Derecho** →

**ATG**TGTGGAGGAGAAGTGATCCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCGCCGTTTCACGCCACGCCAC  
M C G G E V I P A D M P A A P F T P R H  
GGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAGAGGAGGAACAAGAAGAAGAGGAAGCGCGGC  
G D G E T W V D R K R R N K K K R K R G  
GCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCTTCCAGGAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGAC  
A D E E W E A A F Q E F M A A D D D D D  
GGCGCGGACTCGTGTAAAGTAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAGGTGAAAATGAT  
G G G L V L S S K S L V L R S P G E N D  
GCAGGCCGGGGCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCC  
A G R G A A A T M S M P L D P V T E E A  
GAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTACGAGTACCAC  
E P A V A E K P R R R R P R R S Y E Y H  
GGCATCCGGCAGCGCCGTGGGGGGCGGTGGTTCGTCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGC  
G I R Q R P W G R W S S E I R D P V K G  
GTCCGCCTCTGGCTCGGCACCTTTCGACACCCCGTTCGAAGCCGCGCTCGCCTACGACGCC  
V R L W L G T F D T A V E A A L A Y D A  
GAGGCCCGCCGCATCCACGGCTGGAAAGCCCGGACAAACTTCCCACCCGCGATCTTTCT  
E A R R I H G W K A R T N F P P A D L S  
TCGCCCGCCCGCGTTCGACGCCGCTCTGCTTCTTGCTCAACGACAACGGCCTCATCACA  
S P P P S Q P L C F L L N D N G L I T  
ATCGGAGAAGCGCCGACCGACGACGCCGCGTTCGACGTCGACGTCGACGACGAGGCGTCC  
I G E A P T D D A A S T S T S T T E A S  
GGCGACGCGCATAACAAGTGGAGTGCTGCTCGGACGACGTCGATGGACAGCCTCCTCGCC  
G D A R I Q L E C C S D D V M D S L L A  
GGCTACGACGTGGCCAGCGGCGACGACATATGGACATGGACATCTGGAGCCTCCTCCACC  
G Y D V A S G D D I W T W T S G A S S T  
TCTGTAAACCAAGAGATCAAGACCCCATCGATCCACCAAAACATATCATATGCAGGGGAA  
S V N Q E I K T P S I H Q N I S Y A G E  
**GCC****TGA**  
A

←

**Izquierdo**

**Figura 13. Secuencia del gen *SUB1A-1* sin marca inmunogénica 3xFLAG.** Las flechas indican la dirección de los oligonucleótidos y en subrayado el sitio donde se diseñaron, en verde está el codón de inicio, en rojo el de paro.

---

---

***SUB1A-3xFLAG* (966 bp)**

Derecho →

**ATG**TGTGGAGGAGAAGTGATCCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCCGTTTCACGCCACGCCAC  
M C G G E V I P A D M P A A P F T P R H  
GGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAAGAGGAGGAACAAGAAGAAGAGGAAGCGCGGC  
G D G E T W V D R K R R N K K K R K R G  
GCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCTTCCAGGAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGAC  
A D E E W E A A F Q E F M A A D D D D D  
GGCGGGCGACTCGTGTAAAGTAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAGGTGAAAATGAT  
G G G L V L S S K S L V L R S P G E N D  
GCAGGCCGGGGCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCC  
A G R G A A A T M S M P L D P V T E E A  
GAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTACGAGTACCAC  
E P A V A E K P R R R R P R R S Y E Y H  
GGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGGGCGGTGGTTCGTCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGC  
G I R Q R P W G R W S S E I R D P V K G  
GTCCGCCTCTGGCTCGGCACCTTCGACACCGCCGTCGAAGCCGCGCTCGCCTACGACGCC  
V R L W L G T F D T A V E A A L A Y D A  
GAGGCCCGCCGATCCACGGCTGAAAGCCCGGACAAACTTCCCACCCGCGATCTTTCT  
E A R R I H G W K A R T N F P P A D L S  
TCGCCGCCCGCCGCTCGCAGCCGCTCTGCTTCTTGCTCAACGACAACGGCCTCATCACA  
S P P P P S Q P L C F L L N D N G L I T  
ATCGGAGAAGCGCCGACCGACGACGCCGCTCGACGTCGACGTCGACGACGAGGCGTCC  
I G E A P T D D A A S T S T S T T E A S  
GGCGACGCGGCATACAACCTGGAGTGCTGCTCGGACGACGTGATGGACAGCCTCCTCGCC  
G D A R I Q L E C C S D D V M D S L L A  
GGCTACGACGTGGCCAGCGGCGACGACATATGGACATGGACATCTGGAGCCTCCTCCACC  
G Y D V A S G D D I W T W T S G A S S T  
TCTGTAAACCAAGAGATCAAGACCCCATCGATCCACCAAAACATATCATATGCAGGGGAA  
S V N Q E I K T P S I H Q N I S Y A G E  
GCC**AAGGGTGGGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGTGGAGGCGGTTCAGAC**  
A K G G R A D P A F L Y K V **G G G G** S D  
**TACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGAC**  
Y K D H D G D Y K D H D I D Y K D D D D  
**AAGTGA**

K -

←

Izquierdo

**Figura 14: Secuencia del gen *SUB1A-1* con marca inmunogénica 3xFLAG.** Las flechas indican la dirección de los oligonucleótidos y en subrayado el sitio donde se diseñaron, en verde está el codón de inicio, en rojo el de paro, en morado un sitio attB2 (L2xR2), en azul un puente de glicinas y en amarillo la marca 3xFLAG.

Así, el primer 5' (Sub1AEcoRI5') fue común en ambas opciones y tuvo un sitio de restricción para EcoRI en su extremo izquierdo y adicionalmente, 4 bases al azar para asegurar el anclaje de la enzima de restricción (Tabla 4). Los oligonucleótidos 3' fueron

diferentes, para clonar sin 3xFLAG se adicionó un sitio HindIII y un codón de paro inmediatamente después de la secuencia final de *SUB1A-1* (Sub1AHindIII3'), para clonar con 3xFLAG se dirigió al final de la secuencia 3xFLAG, se adicionó un sitio HindIII y un codón de paro; ambos oligonucleótidos 3' también tuvieron 4 bases aleatorias al final. El mismo procedimiento se usó para el gen *SUB1C-1*.

**Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para clonar a los genes *SUB1A-1* y *SUB1C-1*.** En subrayado está indicado el sitio de restricción insertado. En negritas está el sitio de inicio o de paro de la traducción.

Oligonucleótidos	Secuencia de 5'-3'	Sitio de restricción	Tm
Sub1AEcoRI5'	TTC <u>GGA ATT CAT</u> <b>GTG</b> TGG AGG AGA AGT GAT C	EcoRI	70.9
Sub1AHindIII3'	CGT TAA <u>GCT TTC</u> <b>AGG</b> CTT CCC CTG CAT ATG A	Hind III	63.2
3xFLAGHindIII3'	CGT TAA <u>GCT TTC</u> <b>ACT</b> TGT CAT CGT CAT CCT T	Hind III	60.3
Sub1CEcoRI5'	TTC <u>GGA ATT CAT</u> <b>GCG</b> CCG CCG CGT CTC CTC C	EcoRI	70.9
Sub1CHindIII3'	CGT TAA <u>GCT TTT</u> <b>AGC</b> TCC AGA AGC GCA TGT C	Hind III	62.5

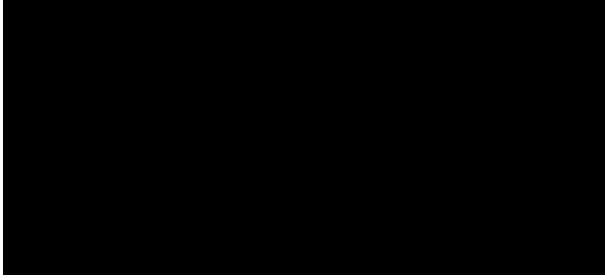
#### 8.4 Aislamiento del gen *SUB1A-1* por PCR

Para aislar a los genes *SUB1A-1*, *SUB1A-1-3xFLAG*, *SUB1C-1* y *SUB1C-1-3xFLAG* se seleccionó el método de PCR, para ello se utilizó una ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion, NEB). Para observar el fragmento de ADN se usó la electroforesis.

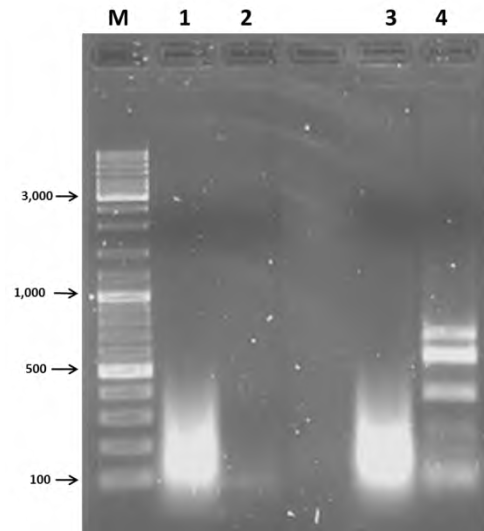
En un primer experimento, se usó la temperatura de 60°C, sin embargo, no se pudo observar amplificación o se observaron varias amplificaciones con diferentes pesos moleculares que son menores de los 800 pb esperadas (Figura 15).

De esta forma, al programa de amplificación se le disminuyó la temperatura de alineamiento a 58°C. Con este cambio se produjeron amplicones del gen *SUB1A-1* y *SUB1A-1-3XFLAG* cuyo peso molecular fue el esperado aparente de 846 y 966 pb (Figura 16). Posteriormente se realizó el corte del amplicón del gel de agarosa y se purificó para su clonación en el vector BJ36\_AlcA

A)

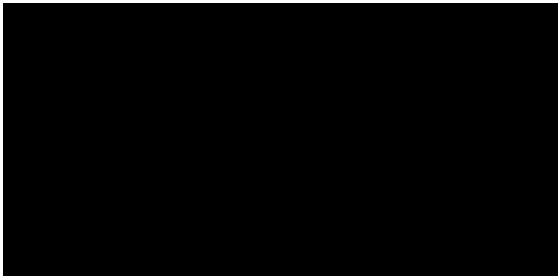


B)

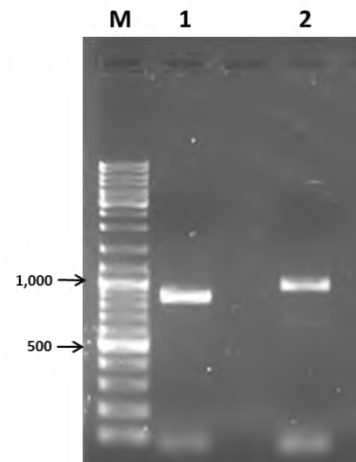


**Figura 15. Programa de la PCR y electroforesis de ADN para amplificar a *SUB1A-1* y *SUB1C-1*. A) Diagrama del programa de PCR utilizado. B) Gel de agarosa al 2%. M: Marcador de peso molecular. 1: *SUB1A-1*. 2: *SUB1A-1-3xFLAG*. 3: *SUB1C-1*. 4: *SUB1C-1-3xFLAG*.**

A)

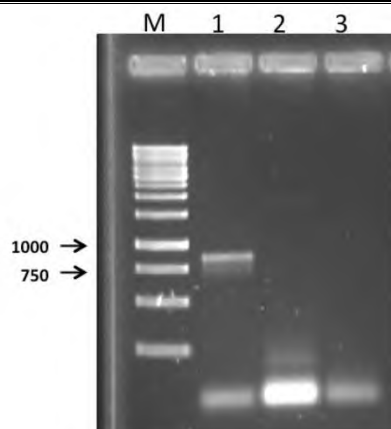


B)



**Figura 16. Programa de la PCR y electroforesis de ADN para amplificar a *SUB1A-1*. A) Diagrama del programa de PCR utilizado. B) gel de agarosa al 2%. M: Marcador de peso molecular. 1: Amplificación del *SUB1A-1*. 2: Amplificación del *SUB1A-1-3xFLAG***

Al aplicar el mismo programa de la Figura 15 con los oligonucleótidos del gen *SUB1C-1* se logró desaparecer la amplificación inespecífica, sin embargo, no se logró obtener un producto de amplificación (Figura 17). También se hizo un barrido de temperaturas (50-60°C) pero no se logró amplificación. Lo anterior pudo ser debido a que los oligonucleótidos no logran alinearse con su blanco por los sitios de restricción y las bases extras añadidas. Por lo tanto, sólo se continuó trabajando con *SUB1A-1*.



**Figura 17. Electroforesis de ADN *SUB1C-1*.** Gel de agarosa al 2%. **M:** Marcador de peso molecular. **1:** Amplificación control de *SUB1A-1*, **2:** Amplificación de *SUB1C-1*, **3:** Amplificación de *SUB1C-1-3XFLAG*.

---

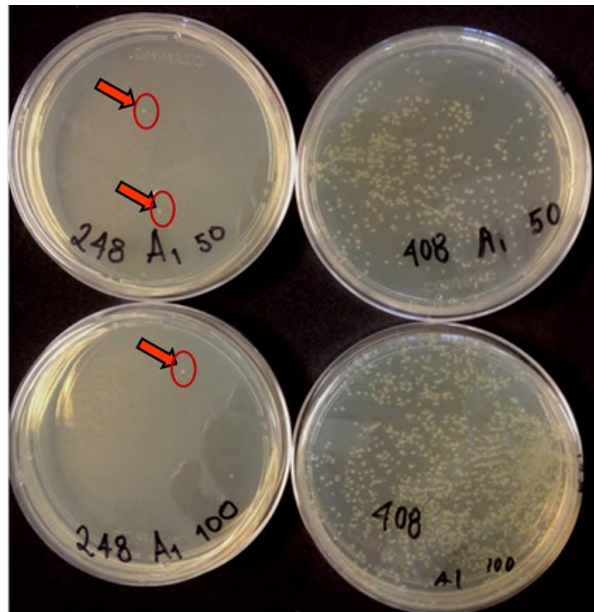
---

## 8.5 Clonación directa de *SUB1A-1* en el vector PBJ36\_Alca

Para colocar a *SUB1A-1* bajo el control del promotor pAlcA, se intentó hacer una restricción directa con EcoRI y HindIII sobre el producto de PCR, una purificación y la posterior ligación en el vector linearizado. Sin embargo, cuando se transformaron las células competentes con los productos de ligación no se obtuvieron clonas.

Por ello, se procedió a verificar la capacidad de las células competentes para integrar plásmidos del medio. Se tomaron los viales existentes y se transformaron con el plásmido original en condiciones idénticas. Se observó que efectivamente las células

competentes usadas tenían diferentes viabilidades desde su fabricación (Figura 18). Se continuó trabajando sólo con los viales que mostraron mejor efectividad.

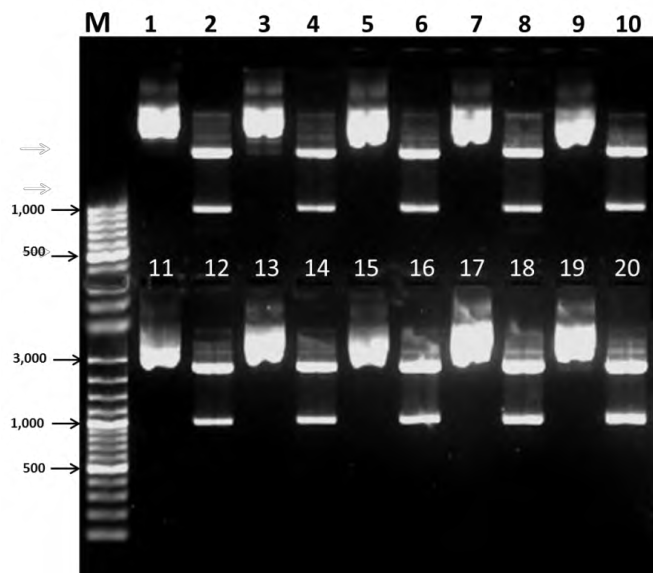


**Figura 18. Placa con medio LB-agar adicionado con ampicilina, sembrada con bacterias transformadas con el plásmido PBJ36\_Alca de dos lotes diferentes (248 y 408)**

Se realizó nuevamente la clonación de *SUB1A-1* y las reacciones de ligación se dejaron en incubación durante toda una noche a 4°C. Sin embargo, tampoco se tuvo éxito pues la digestión doble con Sall (sitio dentro de *SUB1A-1*) y NotI (dos sitios separados por 1100 pb) que debería dar dos fragmentos si estuviera clonado el gen *SUB1A-1*, solamente arrojó el fragmento esperado de 1100 pb de NotI. Esto indica que lo que se obtuvo fueron plásmidos recircularizados vacíos de *SUB1A-1* (Figura 19).

Se pensó que la purificación del producto de PCR podría ser incorrecta, sin embargo, las mediciones en el espectrofotómetro Nanodrop no apoyaban esta hipótesis (Tabla 7) ya que los productos de PCR tenían una relación 260/280 mayor a 1.8. El

problema parecía ser la concentración del producto de PCR que era menor a 10 ng/μl (Tabla 5) o que las enzimas de restricción no podían actuar sobre los fragmentos romos.



**Figura 19.** Plásmidos PBJ36\_AlcA sometidos a digestión doble con Sall y NotI. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **M:** Marcadores de peso molecular. **1, 3, 5, 7, 9:** ADN plasmídico sin digestión de la serie *SUB1A-1*. **2, 4, 6, 8, 10:** Plásmidos *SUB1A-1* sometidos a proceso enzimático con Sall y NotI. **11, 13, 15, 17, 19:** Plásmidos de la serie *SUB1A-1-3xFLAG* sin ser sometidos a la digestión enzimática. **12, 14, 16, 18, 20:** Plásmidos *SUB1A-1-3xFLAG* sometidos a proceso enzimático con Sall y NotI.

<b>Tabla 5. Mediciones espectrofotométricas de los productos de PCR y el plásmido PBJ36_AlcA.</b>						
<b>Plásmido/Inserto</b>	<b>Conc. de ácido nucleico</b>	<b>Unidad</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>PBJ36_AlcA</b>	104.7	ng/μl	2.094	1.081	1.94	2.31
<b><i>SUB1A-1</i></b>	9.3	ng/μl	0.186	0.102	1.83	0.87
<b><i>SUB1A-1-3xFLAG</i></b>	6.4	ng/μl	0.128	0.070	1.82	1.30

De tal manera, se tuvo que planear y utilizar una nueva técnica que permitiera obtener mayores concentraciones de *SUB1A-1* para su integración en el vector PBJ36\_Alca. En la estrategia se añadió un paso de clonación directa en un vector comercial tipo T/T.

### 8.6 Clonación de *SUB1A-1* en pGEM-T-Easy

Debidos a los problemas presentados durante la experimentación previa, se realizó la clonación del producto de PCR del gen *SUB1A-1* en un vector de almacenamiento comercial tipo T/T pGEM T-Easy (3015 pb) que puede ser seleccionado por color blanco (lleno) o azul (vacío) de las colonias utilizando IPTG y X-GAL. De esta forma, se esperaba que con una digestión con EcoRI se pudiera verificar la inserción del gen (Figura 20).

Con este nuevo paso se logró obtener colonias transformadas blancas (Figura 21) las cuales tuvieron un plásmido con el inserto esperado de 966 bases para el caso de *SUB1A-1-3xFLAG* (Figura 22).

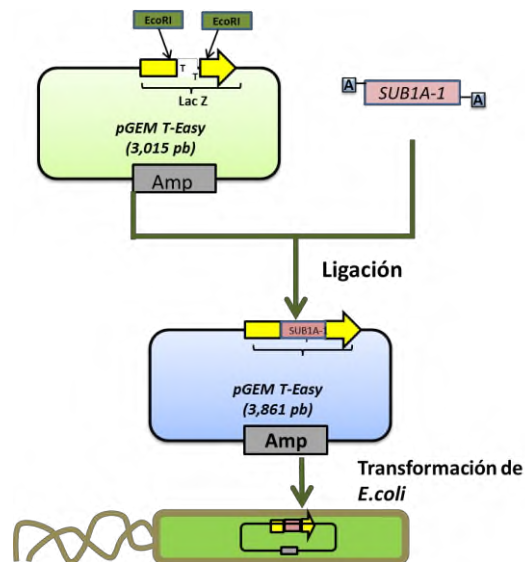
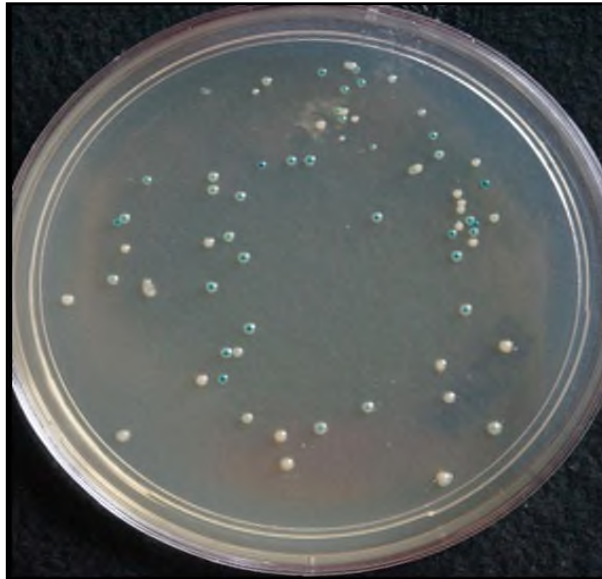
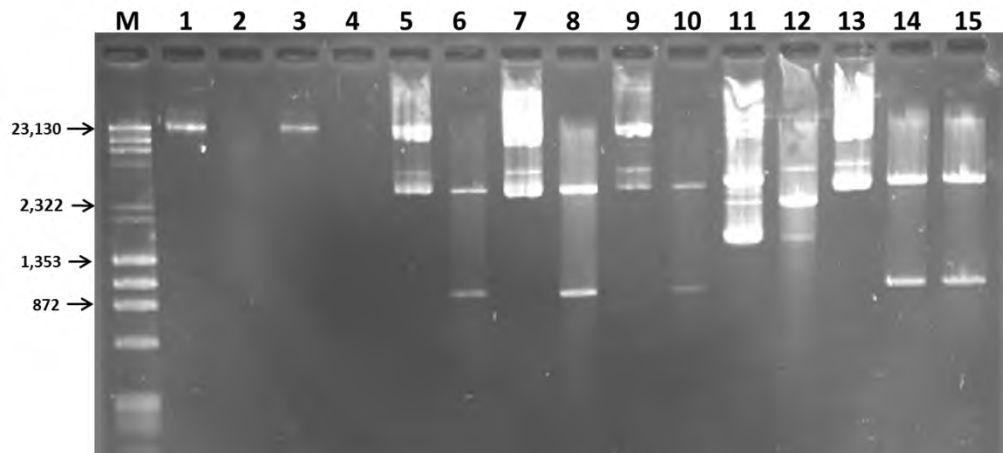


Figura 20. Esquema de clonación de *SUB1A-1* en el vector de almacenamiento pGEM-T-Easy.



**Figura 21.** Selección blanco/azul de colonias transformadas con pGEM-T-Easy ligado con el producto de PCR de *SUB1A-1*.

---



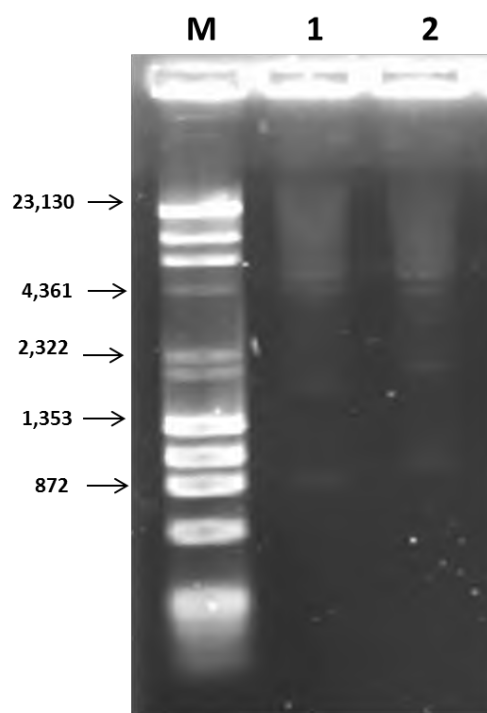
**Figura 22.** Inserción del *SUB1A-1-3xFLAG* en el vector pGEM-T Easy. Electroforesis en gel de 1%. **M:** Marcador de peso molecular. **1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13:** ADN plasmídico sin digerir. **2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 15:** ADN plasmídico digerido con la enzima EcoRI.

---

## 8.7 Clonación direccional de *SUB1A-1* con el vector PBJ36\_Alca

Como primer paso se verificó la actividad de dos enzimas ligasas disponibles utilizando como sustrato al marcador de peso molecular. Se pudo observar que ambas enzimas pudieron ligar el marcador logrando productos de alto peso molecular en comparación con el marcador sin ligasa (Fig. 23).

Con el anterior resultado, se tuvo la seguridad de contar con ligasas funcionales. De esta forma, la atención se centró en recuperar el fragmento de *SUB1A-1* clonado en pGEM-T-Easy de manera que pudiera ser clonado de forma direccional en PBJ36\_Alca. En la Figura 24 se esquematiza la estrategia experimental de esta sección.



**Figura 23. Actividad de ligación sobre el marcador de peso molecular.** Electroforesis de agarosa al 1%. **(M)** Marcador de peso molecular (3  $\mu$ l). **(1)** Ligasa T4 Rapid sobre 2  $\mu$ l de marcador en 20  $\mu$ l. **(2)** Ligasa T4 Epicentre sobre 2  $\mu$ l de marcador en 20  $\mu$ l.

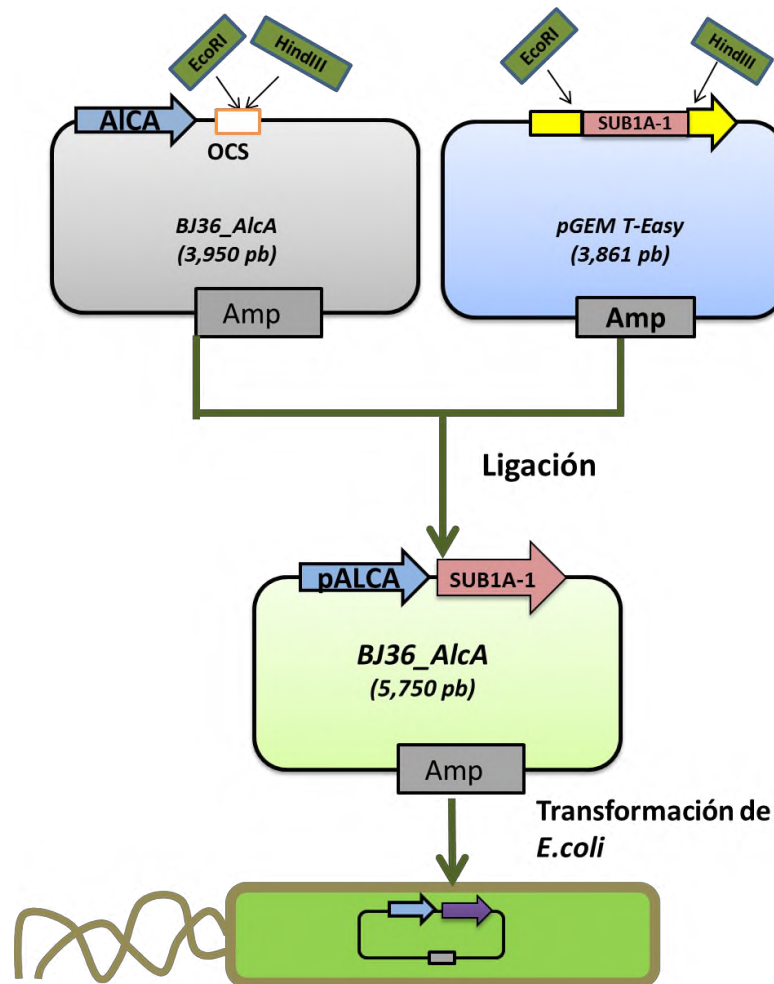


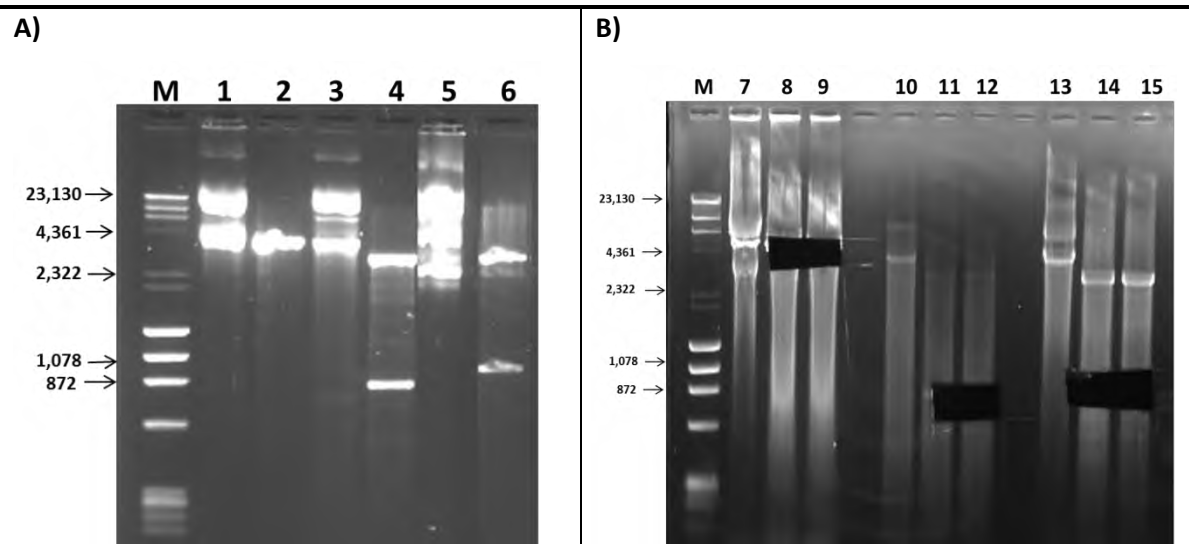
Figura 24. Estrategia experimental para clonar direccionalmente a *SUB1A-1* en el vector *BJ36\_Alca* usando los sitios de restricción insertados durante el aislamiento de *SUB1A-1* por PCR.

Los plásmidos se sometieron a una doble digestión enzimática con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. El corrimiento de estas muestras en electroforesis demostró que se liberó el fragmento esperado que correspondió al de los productos *SUB1A-1* y *SUB1A-1-3xFLAG* (Figura 25A). Los vectores pGEM-T-Easy con los productos *SUB1A-1* y *SUB1A-1-3xFLAG* fueron codificados como la serie "A" o "AF" respectivamente. Al mismo tiempo, el vector PBJ36\_AlcA fue digerido con las mismas enzimas (Figura 25A). Los fragmentos de interés fueron recuperados por corte en gel (Figura 25B)

Gracias a que estos genes estaban ahora clonados en vectores, se pudo separar mayores cantidades de inserto por medio de corte de gel y su purificación fue mejor al realizarse en columnas de extracción (Tabla 6).

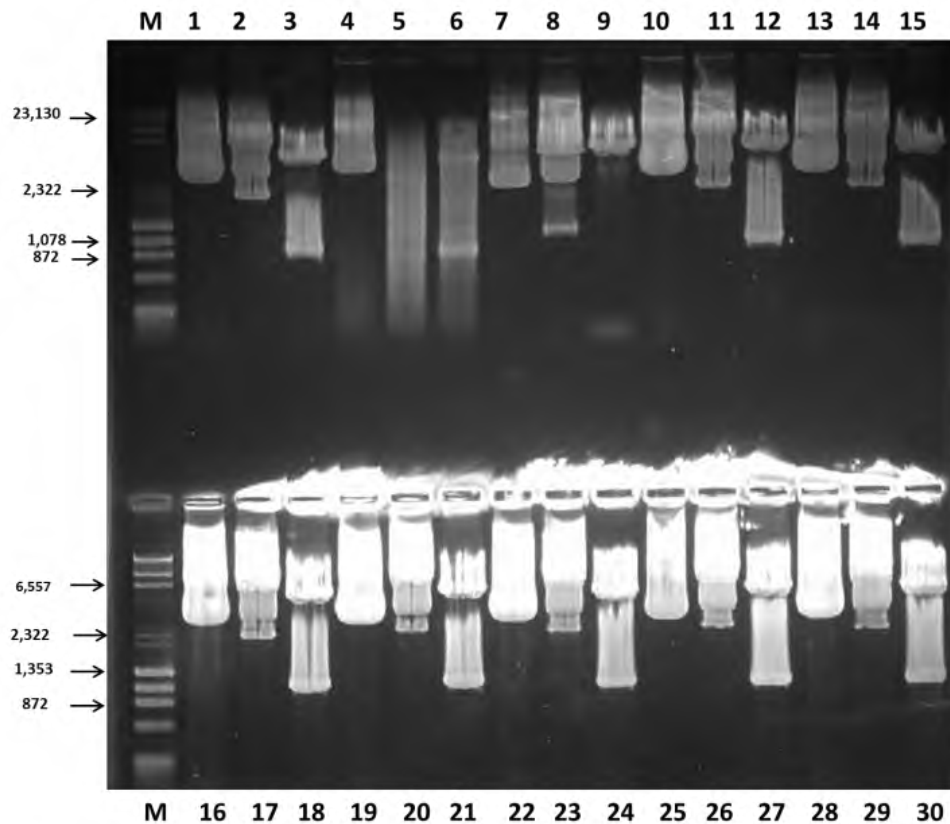
Una vez obtenidos el vector e inserto doblemente digeridos y purificados, se llevó a cabo la ligación en una relación molar estándar para extremos cohesivos inserto:vector 2:1 y se transformó *E. coli*. Los plásmidos aislados se digirieron con NotI y doble restricción EcoRI y HindIII por separado (Figura 26). Los plásmidos resultantes de esta ligación donde existiera el casete pAlcA:*SUB1A-1* se nombraron como la serie "AA" y aquellos pAlcA:*SUB1A-1-3xFLAG* como "AAF". Se seleccionaron aquellos plásmidos que mostraran un vector linearizado con NotI y un inserto que correspondiera con el tamaño de *SUB1A-1* (Figura 25A), para la serie "AA" se seleccionó a AA4 (Figura 26, carriles 10, 11 y 12) y para la serie "AAF" se seleccionó AAF1 (Figura 26, carriles 16, 17 y 18). Aquellos que mostraran patrones irregulares fueron descartados, por ejemplo, en el carril 5 de la Figura 26 se muestra un concatámero y en el carril 9 un vector vacío.

El siguiente paso fue transferir la construcción pAlcA:*SUB1A-1* (AA) o pAlcA:*SUB1A-1-3xFLAG* (AAF) al vector pMLBart\_AlcR.



**Figura 25. Digestiones dobles con EcoRI y HindIII de los materiales para clonar a *SUB1A-1* en PBJ36\_Alca.** Electroforesis de gel de agarosa al 1%. A) Visualización de tamaño correcto del vector PBJ36\_Alca linearizado y vectores seleccionados de la serie A y AF. **1, 3 y 5:** Plásmidos sin digerir Alca, A y AF. **2,4 y 6:** ADN plasmídico de Alca (3950 pb), A (846 pb) y AF (966 pb) sometidos con doble digestión enzimática (EcoRI y HindIII). B) Gel preparativo para remover vector y los insertos. **7, 10 y 13:** Plásmidos sin digerir Alca, A y AF. **8, 9, 11, 12, 14 y15:** Plásmidos sometidos con doble digestión enzimática (EcoRI y HindIII) Alca (8, 9), A (11, 12) y AF (14, 15).

Tabla 6. Mediciones espectrofotométricas de los productos de dobles digestiones (EcoRI y HindIII).						
Plásmido/Inserto	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
pAlca	185.1	ng/μg	3.703	1.953	1.90	0.84
<i>SUB1A-1</i>	4.4	ng/μg	0.088	0.040	2.21	0.11
<i>SUB1A-1-3xFLAG</i>	19.2	ng/μg	0.383	0.186	2.06	0.18



**Figura 26. Digestiones con NotI y doble digestión con EcoRI y HindIII de la ligación de *SUB1A-1* y PBJ36\_AlcA.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **M:** Marcadores de peso molecular. **1, 4, 7, 10, 13:** Plásmidos de la serie AA sin digerir. **2, 5, 8, 11, 14:** Plásmidos AA digeridos con NotI. **3,6, 9, 12, 15:** Plásmidos AA digeridos con EcoRI y HindIII. **16, 19, 22, 25, 28:** Plásmidos AAF sin digerir. **17, 20, 23, 26, 29:** Plásmidos AAF digeridos con NotI. **18, 21, 24, 27, 30:** Plásmidos de la serie AAF digeridos con EcoRI y HindIII.

## **8.8 Integración de los casetes de expresión 35S:alcR::pAlcA:SUB1A-1 (AAR) Y 35S:alcR::pAlcA:SUB1A-1-3xFLAG (AARF)**

Se procedió a la última transferencia del material genético de interés al vector pMLBart\_AlcR que posee al factor de transcripción alcR bajo el control del promotor fuerte 35S. Los plásmidos seleccionados de las series AA y AAF se usaron para obtener la construcción del casete de ADN final. En la Figura 27 se esquematiza la estrategia experimental de esta sección.

Se realizaron varios intentos de ligación directa pero todos fallaron a pesar de que se observó la linearización del plásmido pMLBart\_AlcR y la liberación de los insertos de los plásmidos AA y AAF (Figura 28A). Los plásmidos que se recuperaban eran sólo recircularizados pues al ser digeridos con NotI, no arrojaban ningún inserto (Figura 28B). Para corregir esto, se incluyó un paso de purificación del vector por medio de precipitación con acetato de sodio ya que el vector pMLBart\_AlcR mide 14,706 pb, lo que está fuera del rango de purificación de las columnas comerciales. Sin embargo, esto no fue suficiente y se continuó obteniendo plásmidos recircularizados.

En este punto, se decidió utilizar a la enzima fosfatasa alcalina de camarón para desfosforilar al vector posterior a su digestión con NotI y evitar su autoligación que provoca la recircularización (Figura 29). Los vectores productos de esta transformación se llamaron "AAR" para la quimera completa sin marca 3xFLAG y "AARF" con marca. Con la adición de este procedimiento, aunque la mayoría de los plásmidos seguían recircularizados, ya se pudo obtener clones con insertos en un 14% (5/34) para la serie AAR (Figura 30) y de un 33% (8/24) para la serie AARF (Figura 31).

Una vez concluida la construcción de casete de expresión, se procedieron a seleccionar los plásmidos de la serie "AAR" (1 y 13, Figura 30) y para la serie "AARF" (3 y 22, Figura 31) y se procedió a verificar el orden de las bases nitrogenadas. Las colonias transformadas con los casetes de expresión 35S:alcR::pAlcA:SUB1A-1 y

35S:alcR::pAlcA:SUB1A-1-3xFLAG, se purificaron ya no por el método de lisis alcalina sino por un kit comercial de columnas (QIAPrep, Qiagen).

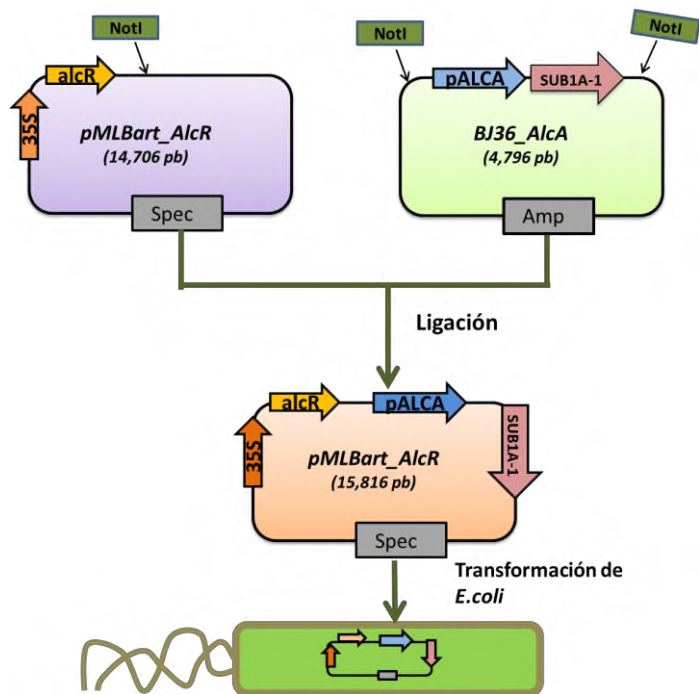
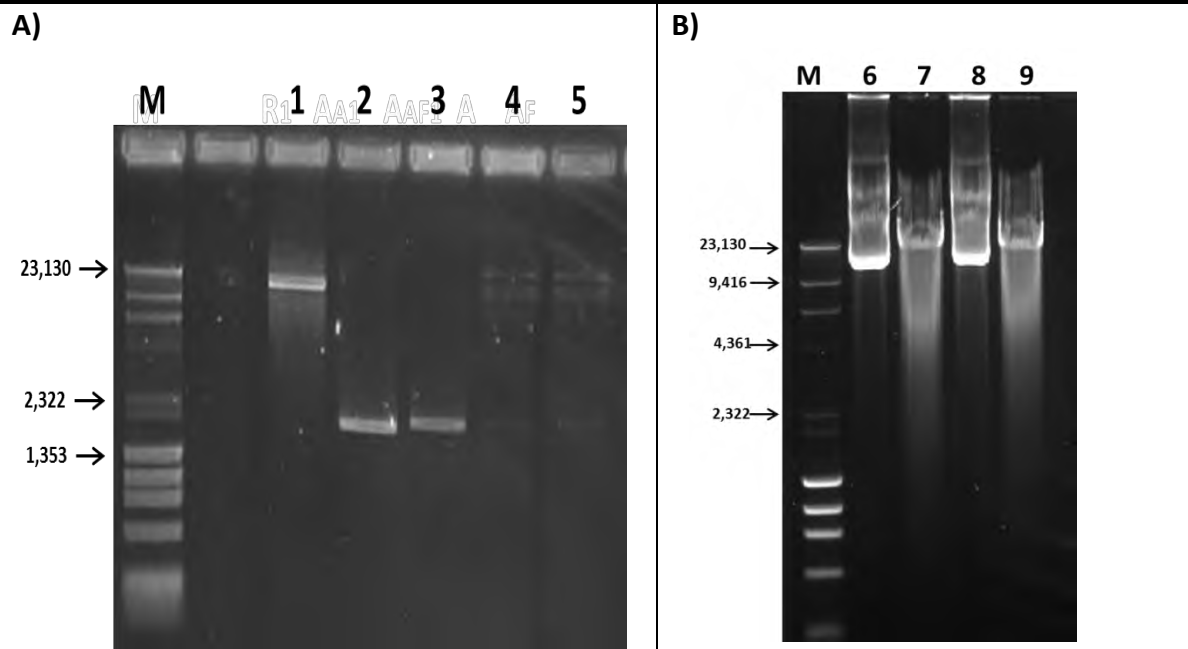
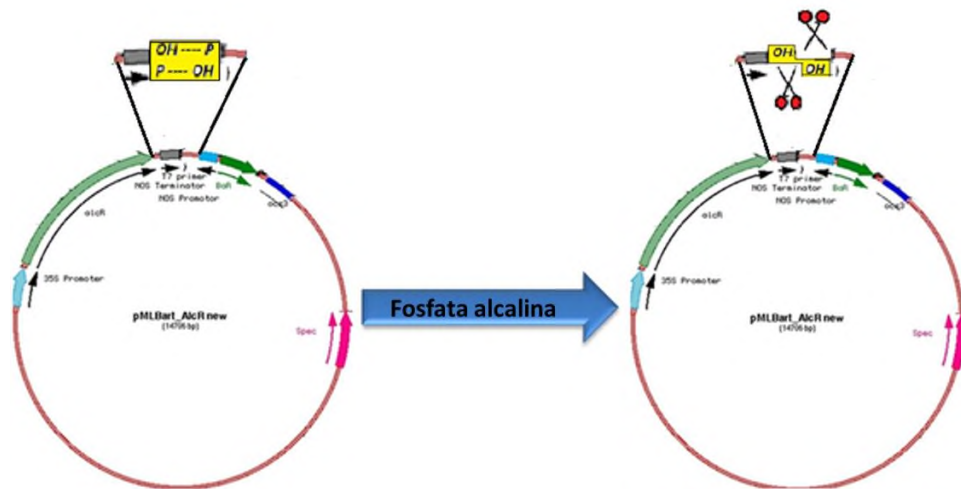


Figura 27. Estrategia experimental para clonar direccionalmente a *SUB1A-1* en el vector *pMLBart\_AlcR* usando los sitios de restricción *NotI*.

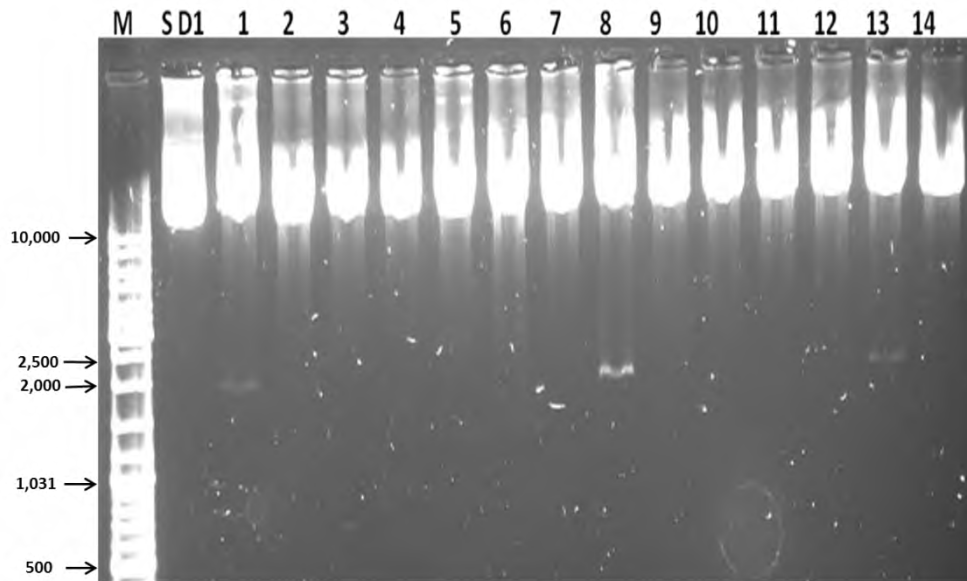


**Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M:** Marcador de peso molecular. **A):** Verificación del vector e insertos. **1, 2 y 3:** Plásmidos AlcR, AA y AAF linearizados con NotI. **4:** Ligación del AlcR+pAlcA-SUB1A-1. **5:** Ligación de AlcR+pAlcA-SUB1A-1-3xFLAG. **B)** Verificación de las colonias candidatas a la transformación. **6 y 8:** Plásmido AlcR+*SUB1A-1-3xFLAG* sin digerir. **7 y 9:** Plásmido AlcR+*SUB1A-1-3xFLAG* digerido con NotI.

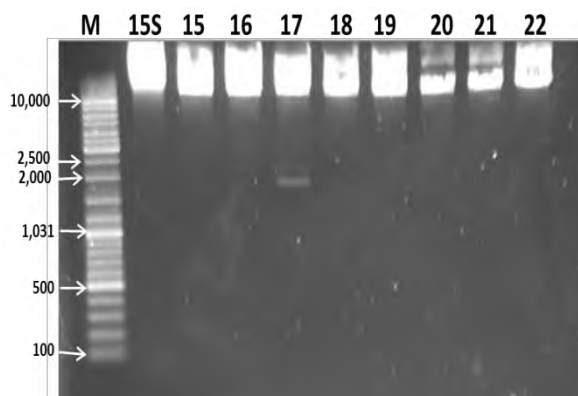


**Figura 29. Representación del vector pMLBart\_AlcR, digerido con la enzima fosfatasa alcalina.**

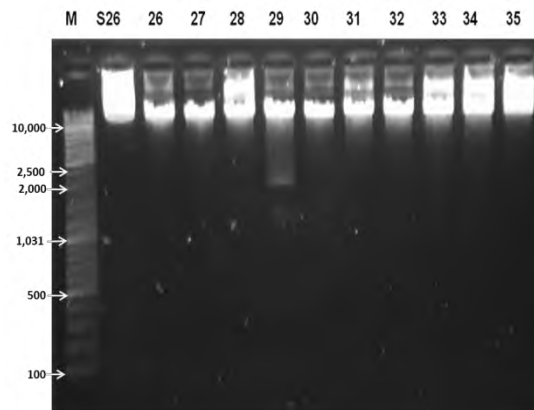
A)



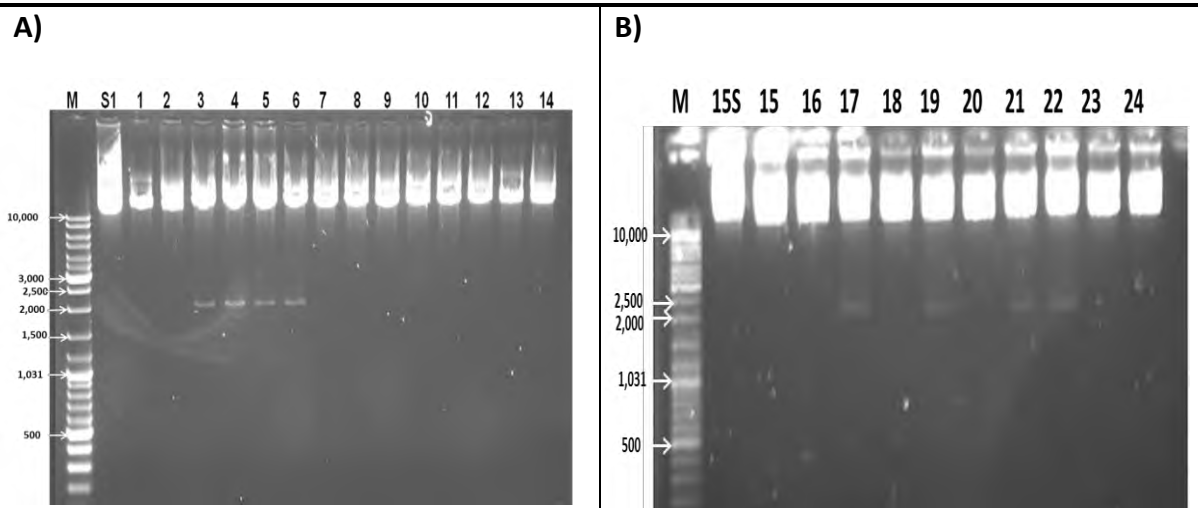
B)



C)



**Figura 30. Digestiones con NotI de la ligación de pAlcA:SUB1A-1 y pMLBart\_AlcR.** Electroforesis en geles de agarosa al 1%. **M:** Marcadores de peso molecular. **A), B) y C); SD1, 15S y S26:** Plásmidos de la serie AAR sin digerir. **A), B)y C); 1-14, 15-22 y 26-35:** Plásmidos de la serie AAR digeridos con NotI



**Figura 31. Digestiones con NotI de la ligación de pAlcA:SUB1A-1-3xFLAG y pMBLart\_AlcR.** Electroforesis en geles de agarosa al 1%. **M:** Marcadores de peso molecular. **A) y B); S1, 15S:** Plásmidos de la serie AARF sin digerir. **A) y B); 1-14 y 15-24:** Plásmidos de la serie AARF digeridos con NotI.

## 8.9 Verificación por secuenciación

Los plásmidos transformados fueron extraídos y purificados con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep, dando como resultado plásmidos de buena calidad para la secuenciación. Posteriormente se procedió a cuantificar las muestras de ADN a través del Nanodrop, para verificar la integridad y la concentración de las muestras a partir de la absorbancia de 260/280 y 260/230. Los resultados muestran una concentración adecuada de ácido nucleico y la buena calidad de los plásmidos (Tabla 7).

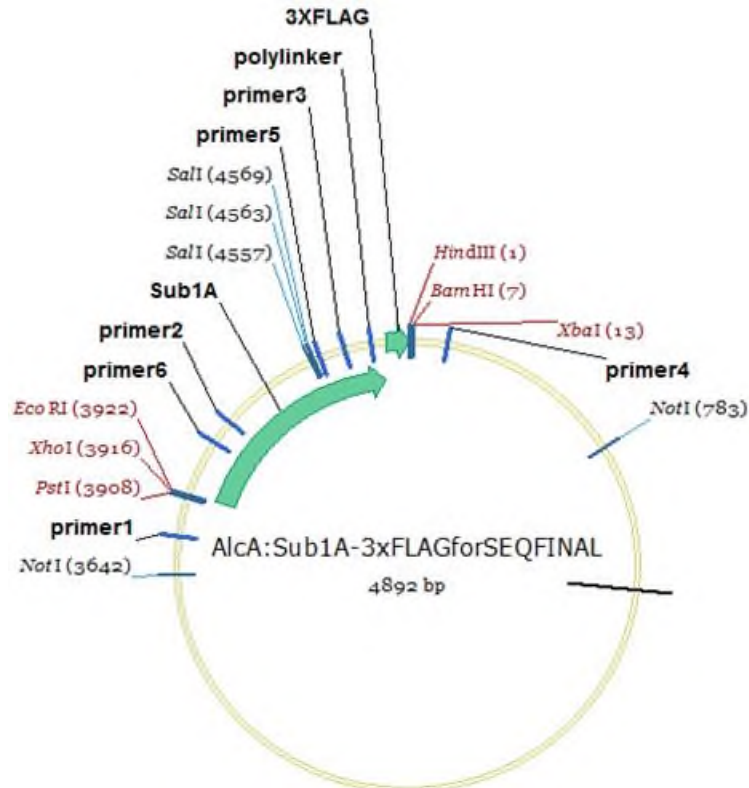
Plásmidos	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
<b>AARF22</b>	422.5	ng/μl	8.450	4.490	1.88	2.22
<b>AARF3</b>	594.2	ng/μl	11.884	6.384	1.86	2.17
<b>AAR1</b>	549.8	ng/μl	10.995	5.895	1.87	2.19
<b>AAR13</b>	461.5	ng/μl	9.230	4.928	1.87	2.21

Los oligonucleótidos para secuenciación se diseñaron con el software Vector NTI (Invitrogen), En la Figura 32 se esquematiza la estrategia experimental del diseño para abarcar toda la secuencia del gen *SUB1A-1* y la marca *3XFLAG* (Figura 32). Como resultado final del diseño, se tuvieron los oligonucleótidos 1, 2 y 3 de 5' a 3' y los oligonucleótidos 4, 5 y 6 de la secuencia 3' a 5' del vector (Tabla 8).

Los cromatogramas de secuenciación se analizaron con el programa Chromas, utilizando como apoyo el programa de Vector NTI Advance 10 para identificar y ensamblar las partes de las moléculas *SUB1A-1* y *SUB1A-1-3xFLAG*. Sólo se utilizaron secuencias con un control de calidad como el que se describe en la Figura 33. La cobertura de la secuenciación permitió verificar que los genes de interés estuvieron entre secuencias de vector esperadas y de forma direccional al frente del promotor pAlcA (Figura 34 y 35). De este análisis se concluyó que efectivamente, los amplicones clonados y transferidos hasta el vector de expresión se encuentran completos y conservan un 100% de identidad con las

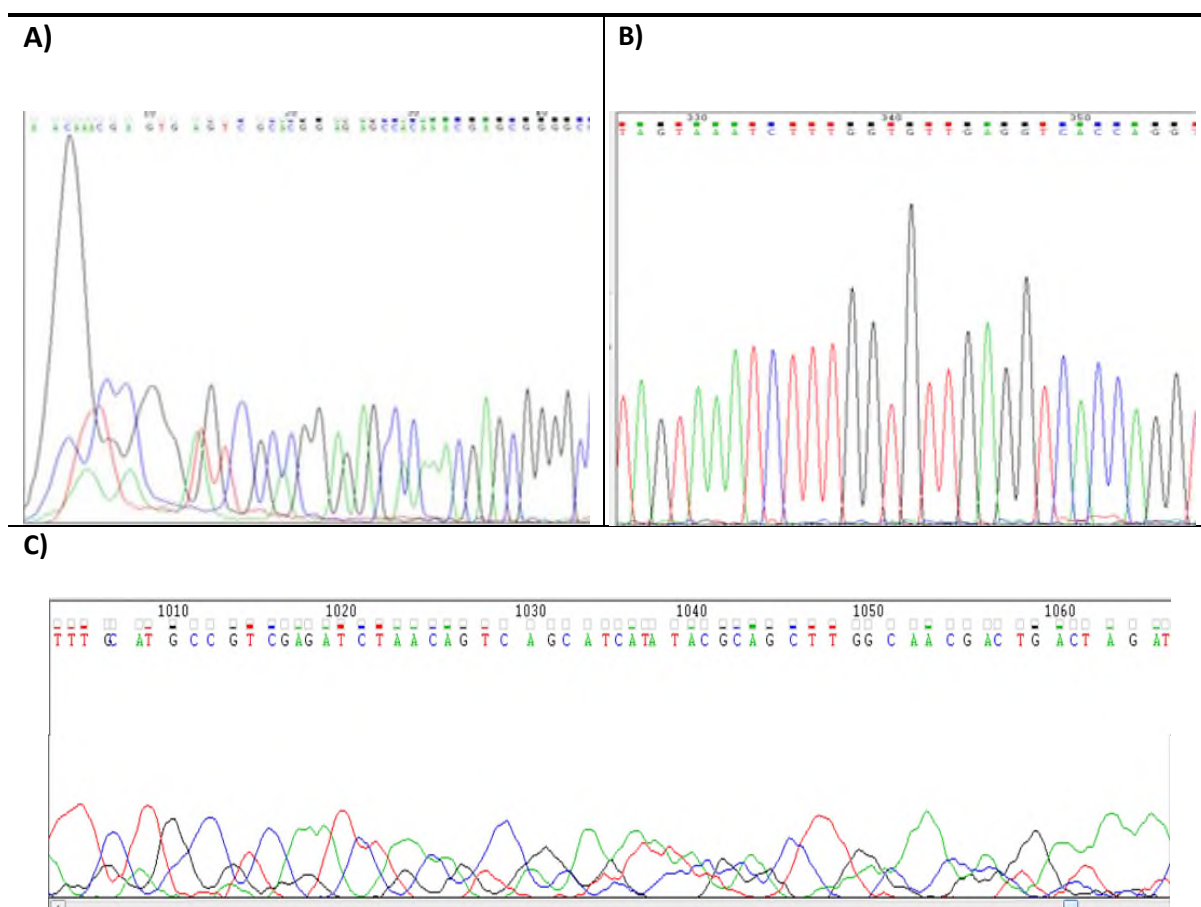
secuencias nominales de *SUB1A-1* reportadas por Fukao *et al.* (2008) tanto para la versión con 3xFLAG como sin esta marca (Figura 36).

Finalmente, la secuenciación permitió confirmar que se clonó una versión correcta de estos genes en el vector de expresión y que los casetes 35S:alcR::pAlcA:*SUB1A-1* y 35S:alcR::pAlcA:*SUB1A-1-3xFLAG* se ensamblaron exitosamente.



**Figura 32.** Diseño de oligonucleótidos en plásmido binario con el casete de expresión pAlcA:*SUB1A-1-3xFLAG* y la secuencia del gen *SUB1A-1-3xFLAG*. Simulación *in silico* realizada para preparar el diseño de oligonucleótidos para la secuenciación de los plásmidos AAR 1 y 13 y AARF 3 y 22.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los plásmidos AAR y AARF	
5'-3' Derecho	5'-3' Izquierdo
1.- PALCseqF1 GCA GAG ACG GAG CAC TTT CT	4.- PALCseqR4 TTA GAA TGA ACC GAA ACC GG
2.- SUB1AseqF2 GTG ACC GAG GAG GCC GAG CC	5.- SUB1AseqR6 CCT CAA CAC CAA AGA TTT ACT ACT T
3.- SUB1AseqF3 TGG ACA TGG ACA TCT GGA GC	



**Figura 33. Representación de cromatograma. A)** La reacción comienza en forma normal pero existe un solapamiento de picos de ADN a partir de una determinada región. **B)** el cromatograma presenta picos bien definidos. **C)** La secuencia pierde bruscamente la señal y se superpone.

cgcacggagagccacaaacgagcggggccccgtacgtgctctcctaccccaggatcgcatccccgcatagctgaacatctatataactgcag  
 acgctctcgaggaattcATGTGTGGAGGAGAAGTGATCCCCGCCGACATGCCGGCGGCGCCGTTACGCCACGC  
 CACGGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAGAGGAGGAACAAGAAGAAGAGGAAGCGCGGCCGGA  
 CGAAGAATGGGAGGCCGCCTTCCAGGAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGACGGCGGCGGACTCGTG  
 TTAAGTAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTACCAGGTGAAAATGATGCAGGCCGGGGCGCCGCCACCAT  
 GTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCCGAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCG  
 GCCGAGGCGGAGCTACGAGTACCACGGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGGGCGGTGGTCTCGGAGATCCG  
 CGACCCCGTCAAGGGCGTCCGCCTCTGGCTCGGCACCTTCGACACCGCCGTGAAGCCGCGCTCGCCTACG  
 ACGCCGAGGCCCGCCGCATCCACGGCTGAAAAGCCCGACAACTTCCCACCCGCCGATCTTTCTCGCCG  
 CCGCCCGCTCGCAGCCGCTCTGCTTCTGCTCAACGACAACGGCCTCATACAATCGGAGAAGCGCCGAC  
 CGACGACGCCGCTCGACGTCGACGTCGACGACGGAGGCGTCCGGCGACGCGGCATACAACCTGGAGTGC  
 TGCTCGGACGACGTGATGGACAGCCTCCTCGCCGGCTACGACGTGGCCAGCGGCGACGACATATGGACAT  
 GGACATCTGGAGCCTCCTCCACCTCTGTTAACCAAGAGATCAAGACCCCATCGATCCACAAAACATATCAT  
ATGCAGGGGAAGCCTGA*aagcttggatcctctagagtctgcttaatgagatatgcgagacgcctatgatcgcatgatattgct*  
*tcaattctgttgcacgttgtaaaaaactgagcatgtgtagctcagatccttaccggttccggtcattctaataatatacacc*  
*gttactatcgtatTTTTATGAATAATTTCTCCGTTCAATTTACTGATTGTACCCTACTTATATGTACAATATAAAATGAAAACAATA*  
*TTGTGCTGAATAGTTTATAGCGACATCTATGATAGAGCGCCACAATAACAACAATTGCGTTTTATTATAACAATCAATTTAAAA*  
*AAGCGGCAGAACCGGTCAAACCTAAAGACTGATTACATAAATCTATTCAAATTTCAAAAGTGCCCCAGGGGCTAGTATCTACGACA*  
*CACCGAGCGGCGAATAAACGCTCACTGAAGGGAACCTCCGTTCCCGCCGGCGCATGGGTGAGATTCCTGAAGTTGAGTATT*  
*GGCGTCCGCTCTACGAAAGTTACGGGCACCATCAACCCGGTCCAGCACGGCGCGGTAACCGACTGCTGCCCGAGAATTATG*  
*CAGCATTTTTGGTGTATGTGGGCCCCAAA*

**Figura 34. Análisis de resultados de secuenciación y ensamblado de la clona AAR1.** En letra mayúscula normal se encuentra la secuencia usando el oligonucleótido PALCSeqF1 en cursiva la obtenida con el oligonucleótido SUB1AseqF3. En subrayado la secuencia superpuesta de ambos oligos. En minúsculas la secuencia 5' y 3' de vector.

aacatgaggtctgtcgcaaggagagccacaaacgagcggggccccgtacgtgctctcctaccccaggatcgcatccccgcatagctgaacat  
 ctatataactgcagacgcgtctcgaggaattcATGTGTGGAGGAGAAGTGATCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCCCGT  
 TCACGCCACGCCACGGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAGAGGAGGAACAAGAAGAAGAGGAAG  
 CGCGGCCGCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCTTCCAGGAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGACGGC  
 GGCGGACTCGTGTTAAGTAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAGGTGAAAATGATGCAGGCCGGGGCG  
 CCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCCGAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCC  
 TCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTACGAGTACCACGGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGGGCGGTGGTC  
 GTCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGCGTCCGCCTCTGGCTCGGCACCTTCGACACCGCCGTCGAAGCCG  
 CGCTCGCTACGACGCCGAGGCCCGCCGCATCCACGGCTGGAAAGCCCGGACAAACTTCCCACCCGCCGAT  
 CTTTCTTCGCCGCCGCCGCGCTCGCAGCCGCTCTGCTTCTTGCTCAACGACAACGGCCTCATACAATCGGA  
 GAAGCGCCGACCGACGACGCCGCGTGCAGCTGCAGCTGCAGGAGGCGTCCGGCGACGCGCGCATA  
 CAACTGGAGTGCTGCTCGGACGACGTGATGGACAGCCTCTCGCCGGTACGACGTGCCAGCGGGCAGC  
 ACATATGGACATGGACATCTGGAGCCTCTCCACCTCTGTTAACCAAGAGATCAAGACCCCATCGATCCACC  
AAAACATATCATATGCAGGGGAAGCCAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTGTACAAAGTGGGTGG  
AGGCGTTTACACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATG  
*ACAAGTGAaagcttgatcctctagagtcctgctttaatgagatgagcagcgcctatgatcgatgatatttgcttcaattctgtt*  
*tgacggttgtaaaaaacctgagcatgtgtagctcagatcctaccgcggttcggttcattctaataatatacaccggttactatcgta*  
*ttttatgaataatatttccggttcaatttactgattgtaccctactactatgtacaatataaaatgaaaacaatatattgtgctgaat*  
*aggtttatagcgacatctatgatagagcgccacaataacaacaattgcgttttattattacaatccaatttaaaaaagcggcaga*  
*accggtcaaacctaaaagactgattacataaatcttattcaaatcaaaagtgcccccaggggtagtatctacgacacaccgagcggc*  
*gaactaataacgctcactgaaggggaactccggttccccggcgcgcatgggtgagattccttgaagttgagattggcgtccgctct*  
*accgaaagttacgggcaccattcaaccgggtccagcacggcgccgggtaaccgacttgctccccgagaattatgcagcattttttg*  
*gtgatgtggcccaaatgaagtgagggtcaaaccttgacagtgacgacaaatcggtggcggtccagggcgaattttgcgacaac*  
*atgtcgaggctcagcaggaccggcatgcaagctagcttactagtgatattctatagtgacctaactctgcccgcactagtgatatcc*  
*cgcgccatggcggggagcatgagcgtgcccattcgccctatagtgagtcgtattacaatcactggcgtcgtttacaacgtctgact*  
*gggaaaccctggcgttaccacttatcgctgcagccattccccttcgccagctggcgtatagcgaagccgcaccgaatcgcttcc*  
*acagtgcgcacctgatggcatggattgaacgtatgatctgaactttatgagggcttagacactactgcttcggaacacat*

**Figura 35. Análisis de resultados de secuenciación y ensamblado de la clona AARF3.** En letra mayúscula normal se encuentra la secuencia usando el oligonucleótido PALCSeqF1, en cursiva la obtenida con el oligonucleótido SUB1AseqF3. En subrayado la secuencia superpuesta de ambos oligos. En minúsculas la secuencia 5' y 3' de vector.

A)

```
#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: SUB1A1-secuenciado
# 2: SUB1A1
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 846
# Identity: 846/846 (100.0%)
# Similarity: 846/846 (100.0%)
# Gaps: 0/846 (0.0%)
# Score: 4230.0
#
#
#=====
```

```
SUB1A1-secuen 1 ATGTGTGGAGGAGAAGTGATCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCGCCGTTTAC 50
      |||
SUB1A1-origin 1 ATGTGTGGAGGAGAAGTGATCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCGCCGTTTAC 50

SUB1A1-secuen 51 GCCACGCCACGGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAGAGGAGGAACA 100
      |||
SUB1A1-origin 51 GCCACGCCACGGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAGAGGAGGAACA 100

SUB1A1-secuen 101 AGAAGAAGAGGAAGCGCGGCCGCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCCTTCCAG 150
      |||
SUB1A1-origin 101 AGAAGAAGAGGAAGCGCGGCCGCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCCTTCCAG 150

SUB1A1-secuen 151 GAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGACGGCGGGCGGACTCGTGTTAAG 200
      |||
SUB1A1-origin 151 GAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGACGGCGGGCGGACTCGTGTTAAG 200

SUB1A1-secuen 201 TAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAGGTGAAAATGATGCAGGCCGGG 250
      |||
SUB1A1-origin 201 TAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAGGTGAAAATGATGCAGGCCGGG 250

SUB1A1-secuen 251 GCGCCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCC 300
      |||
SUB1A1-origin 251 GCGCCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCC 300

SUB1A1-secuen 301 GAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTA 350
      |||
SUB1A1-origin 301 GAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTA 350

SUB1A1-secuen 351 CGAGTACCACGGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGGGCGGTGGTCTCGGAGA 400
      |||
SUB1A1-origin 351 CGAGTACCACGGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGGGCGGTGGTCTCGGAGA 400

SUB1A1-secuen 401 TCCGCGACCCCGTCAAGGGCGTCCGCCTCTGGCTCGGCACCTTCGACACC 450
      |||
SUB1A1-origin 401 TCCGCGACCCCGTCAAGGGCGTCCGCCTCTGGCTCGGCACCTTCGACACC 450

SUB1A1-secuen 451 GCCGTCTGAAGCCGCGCTCGCCTACGACGCCGAGGCCCGCCGCATCCACGG 500
      |||
SUB1A1-origin 451 GCCGTCTGAAGCCGCGCTCGCCTACGACGCCGAGGCCCGCCGCATCCACGG 500

SUB1A1-secuen 501 CTGGAAGCCCGGACAAACTTCCCACCCGCCGATCTTTCTTCGCCGCCGC 550
      |||
SUB1A1-origin 501 CTGGAAGCCCGGACAAACTTCCCACCCGCCGATCTTTCTTCGCCGCCGC 550

SUB1A1-secuen 551 CGCCGTCGACGCCGCTCTGCTTCTTGCTCAACGACAACGGCCTCATCACA 600
      |||
SUB1A1-origin 551 CGCCGTCGACGCCGCTCTGCTTCTTGCTCAACGACAACGGCCTCATCACA 600

SUB1A1-secuen 601 ATCGGAGAAGCGCCGACCGACGACGCCGCGTTCGACGTCGACGTCGACGAC 650
      |||
SUB1A1-origin 601 ATCGGAGAAGCGCCGACCGACGACGCCGCGTTCGACGTCGACGTCGACGAC 650
```

```

SUB1A1-secuen 651 GGAGGCGTCCGGCGACGCGCGCATACAACCTGGAGTGCTGCTCGGACGACG 700
      |||
SUB1A1-origin 651 GGAGGCGTCCGGCGACGCGCGCATACAACCTGGAGTGCTGCTCGGACGACG 700

SUB1A1-secuen 701 TGATGGACAGCCTCCTCGCCGGCTACGACGTGGCCAGCGGGCGACGACATA 750
      |||
SUB1A1-origin 701 TGATGGACAGCCTCCTCGCCGGCTACGACGTGGCCAGCGGGCGACGACATA 750

SUB1A1-secuen 751 TGGACATGGACATCTGGAGCCTCCTCCACCTCTGTTAACCAAGAGATCAA 800
      |||
SUB1A1-origin 751 TGGACATGGACATCTGGAGCCTCCTCCACCTCTGTTAACCAAGAGATCAA 800

SUB1A1-secuen 801 GACCCCATCGATCCACCAAACATATCATATGCAGGGGAAGCCTGA 846
      |||
SUB1A1-origin 801 GACCCCATCGATCCACCAAACATATCATATGCAGGGGAAGCCTGA 846

```

```

#-----
#-----

```

**B)**

```

#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: SUB1A1-3xFLAG-secuenciado
# 2: SUB1A1-3xFLAG-original
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 966
# Identity: 966/966 (100.0%)
# Similarity: 966/966 (100.0%)
# Gaps: 0/966 ( 0.0%)
# Score: 4830.0
#
#
#=====

```

```

SUB1A1-3xFLAG 1 ATGTGTGGAGGAGAAGTGATCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCGCCGTTTCCAC 50
      |||
SUB1A1-3xFLAG 1 atgtgtggaggagaagtgatccccgccgacatgccggcgggcgccgttcac 50

SUB1A1-3xFLAG 51 GCCACGCCACGGCGACGGCGAGACATGGGTTGACAGAAAGAGGAGGAACA 100
      |||
SUB1A1-3xFLAG 51 gccacgccacggcgacggcgagacatgggttgacagaaagaggaggaaca 100

SUB1A1-3xFLAG 101 AGAAGAAGAGGAAGCGCGGCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCCTTCCAG 150
      |||
SUB1A1-3xFLAG 101 agaagaagaggaagcggcgccgacgaagaatgggaggccgcctccag 150

SUB1A1-3xFLAG 151 GAGTTCATGGCTGCTGACGACGACGACGACGCGGGCGGACTCGTGTTAAG 200
      |||
SUB1A1-3xFLAG 151 gagtcatggctgctgacgacgacgacgacgacggcgggcgactcgtgttaag 200

SUB1A1-3xFLAG 201 TAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAGGTGAAAATGATGCAGGCCGGG 250
      |||
SUB1A1-3xFLAG 201 tagtaaatctttggtgtgagggtcaccaggtgaaaatgatgcaggccggg 250

SUB1A1-3xFLAG 251 GCGCCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCC 300
      |||
SUB1A1-3xFLAG 251 gcgccgccgccaccatgtccatgccgctggaccccgtagccgaggaggcc 300

SUB1A1-3xFLAG 301 GAGCCGGCGGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTA 350
      |||
SUB1A1-3xFLAG 301 gagccggcggtggctgagaagcctcgccggcgccggccgaggcgagcta 350

```



## 9. CONCLUSIONES

El uso de la técnica de la PCR para la amplificación de los genes *SUB1A-1* y *SUB1C-1* fue útil para obtener buenos resultados de replicación *in vitro* de las secuencias de ADN. Acorde con lo anterior, se logró amplificar al gen *SUB1A-1* con su respectivo *3xFLAG*. Sin embargo la amplificación de la secuencia del *SUB1C-1* y *SUB1C-1-3xFLAG* no tuvo éxito, por lo que se concluye que se necesita un mejor diseño de oligonucleótidos para poder clonarla. Se propone que incluya nuevas combinaciones de enzimas de restricción y mayor longitud interna de alineamiento.

Debido a que se utilizaron polimerasas y enzimas de alta fidelidad para someter a las muestras a las reacciones de restricción enzimática, se logró llevar a cabo sin errores de orden, la construcción del casete de expresión para *SUB1A-1* originalmente planteado en la estrategia experimental.

Se observó que para lograr una ligación de extremos cohesivos y romos es crucial contar con mediaciones espectrofotométricas de pureza  $260/230 \geq 1.8$  y proporciones cuantificadas de 2:1 inserto:vector para cohesivos y de 3:1 para romos. También se observó lo indispensable que es el tratamiento con la fosfatasa alcalina de camarón para evitar la recircularización del vector receptor cuando hay cortes romos. Estos cuidados y tratamientos, permitieron obtener la construcción del casete de expresión en el orden correcto de las unidades génicas.

Finalmente, se tiene la seguridad de que la construcción del casete de expresión es la adecuada a nivel de secuencia, con las unidades génicas pAlcA (promotor) y *SUB1A-1* (gen de interés) nativo o con marca inmunológica (*3xFLAG*) en el orden definido y asociadas con *35S:alcR*. La construcción de estas quimeras de ADN están disponibles y preparadas para ser usadas en la transformación genética de cualquier planta dicotiledónea, y así, tener nuevas características genotípicas durante el estrés por inundación.

## 10. Perspectivas

La creación de un sistema inducible para el gen *SUB1A-1* con y sin marca inmunogénica permitirá estudiar en la planta *Arabidopsis thaliana* y otras dicotiledóneas la posibilidad de transferir la capacidad de orquestar la respuesta a la inundación caracterizada en arroz y de ésta forma, tener cultivos agrícolas productivos aún en presencia de un evento de inundación.

Este casete permitirá también poder podrá escalar la aplicación en plantas dicotiledóneas de importancia agrícola para obtener cultivos modificados genéticamente que sean más resistentes a la inundación o que posean otras características fenotípicas conferidas por *SUB1A-1* como es la acumulación de almidón.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aoyama T, Chua NH (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal* 11:605-612
2. Bailey-Serres J and Voesenek LACJ (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review in Plant Biology* 59:313-339.
3. Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E (2012) Waterproofing Crops: Effective Flooding Survival Strategies. *Plant Physiology* 160:1698-1709.
4. Bailey-Serres J, Voesenek LACJ (2010) Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current Opinion in Plant biology* 13:1–6.
5. Benfey PN, Chua NH (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966.
6. Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, Krause KP, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schuch W, Sonnewald U, Tomsett B (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology* 16: 177-180.
7. Carey FA, Química orgánica. University of Virginia. Sexta edición Mc Graw Hill, pág 194.
8. Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5: 213-218.
9. Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany* 51:89–97.
10. Dugdale B, Mortimer CL, Kato M, James TA, Harding RM, Dale JL (2013) In plant activation: an inducible, hyperexpression platform for recombinant protein production in plants. *The Plant Cell* 25:2429–2443.
11. Fukao T, Bailey-Serres J (2008) Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLR1L1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Sciences of the USA* 105:16814–16819.
12. Fukao T., T. Harris and J. Bailey-Serres (2008) Evolutionary analysis of the Sub1 gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice. *Annals of Botany* 103:143-150.

13. Fukao T, Kenong X, Pamela CR, Bailey-Serres J (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell* 18:2021–2034.
14. García-Morales S, Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI, Herrera-Cabrera EB (2013) Transcription factors involved in molecular responses of plants to osmotic stress. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36:105-115.
15. Gibbs DJ, Lee SC, Isa Nurulhikma Md, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, Holdsworth MJ (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479:415–418.
16. Green MR, Sambrook J (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. González GR, Mella SM, Zemelman RZ, Bello HT, Domínguez MY (2004) Integrins and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials. *Revista Médica Chile* 132: 619-626.
18. Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H, Ashikariet M (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460:1026-1030.
19. Hernández H (2009) *Reseña de la temporada de ciclones tropicales*. Servicio Meteorológico Nacional. pp 6
20. Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES (2010) *Arabidopsis* RAP2.2: An ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiology*. 153:757–772.
21. Hoff T, Schnorr KM, Mundy J (2001) A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 45: 41–49.
22. James C, (2011) Global status of commercialized Biotech/GM crops. International service for the acquisition of Agri-Biotech applications. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/>
23. Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P (2007) Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology* 145:1183-1191.
24. Kazuhiko Y, Kigawa T, Inoue M, Yamasaki T, Yabuki T, Aok M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K and Yokoyama S (2005) Solution structure of the major DNA-binding domain of *Arabidopsis thaliana* ethylene-insensitive3-like3. *Journal of Molecular Biology* 348:253–264.

25. Kononowicz H, Wang EY, Habeck LL, Gelvin SB (1992) Subdomains of the octopine synthase upstream activating element direct cell-specific expression in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* 4:17-27.
26. Lata C and Prasad M (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 62:4731–4748.
27. Licausi F, Kosmacz M, Weits DA, Giuntoli B, Giorgi FM, Voesenek LACJ, Perata P, van Dongen JT (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479:419-422.
28. Taiz Lincoln, Zeiger Eduardo (1998) *Plant Physiology*. Second edition.
29. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock (2001) *Biología de los microorganismos*. 11 edición, Pearson Education. pp 1011.
30. Maizel A, Weigel D (2004) Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 38:164-171.
31. Manson RH, Jardel Peláez EJ (2009) Perturbaciones y desastres naturales: impactos sobre las ecorregiones, la biodiversidad y el bienestar socioeconómico. En *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 131-184.
32. Mayer JE, Pfeiffer WH, Beyer P (2008) Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology* 11:166-170.
33. McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* 2:163-171.
34. Meinke DW, Cherry MJ, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282:662-682.
35. Mitsuhashi I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiology* 37:49-59.
36. Moyer M, Storrs C (2010) How much is left?. A graphical accounting of the limits to what one planet can provide. *Scientific American* 303:74-81.
37. Mustroph A, Zanetti ME, Jang Charles JH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J (2009) Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:18843-18848.

38. Nakano T, Suzuki K, Fujimura T and Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140:411-432.
39. Núñez López L (2015) Análisis del potencial de sacarificación de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan al gen *SUB1A-1*. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan. En revisión.
40. Ouwerkerk PBF, de Kam RJ, Hoge JHC, Meiger AH (2001) Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta* 213:370-378.
41. Peña-Castro JM (2014) Respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: lecciones aprendidas del gen *SUB1A*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 4:325–337.
42. Peña-Castro JM, Gregorio-Ramírez O, Barrera-Figueroa BE (2013) Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química* 24: 237-246.
43. Peña-Castro JM, Van Zanten M, Lee SC, Patel MR, Fukao T, Voesenek LACJ, Bailey-Serres J (2011) Expression of rice *SUB1A* and *SUB1C* transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence-tolerance mechanism. *The Plant Journal* 67:434-446.
44. Radonic LM (2010) Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. pp 100.
45. Recchia GD, Hall RM (1997) Origins of mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology* 5:389-394.
46. Roslan HA, Salter MG, Wood CD, White Michael RH, Croft KP, Robson F, Coupland G, Doonan J, Laufs P, Tomsett AB, Caddick MX (2001) Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 28:225-235.
47. Salter MG, Paine JA, Riddell IJ, Greenland AJ, Caddick MX, Tomsett B (1998) Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(1), 127-132.
48. Streb S, Zeeman SC, (2012) Starch metabolism in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 10: e0160.
49. Van-Veen H, Mustroph A, Barding GA, Vergeer-van-Eijk M, Welschen-Evertman RAM, Pedersen O, Visser EJW, Larive CK, Pierik R, Bailey-Serres J, Voesenek LACJ, Sasidharan R (2013) Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *The Plant Cell* 25:4691-4707.
50. Zamora-Hernández T, Prado-Fuentes A, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE, Peña-Castro JM (2014) Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de

bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química* 24:237-246.

51. Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 1:641-646.
52. Zhu D, Wu Z, Cao G, Li J, Wei J, Tsuge T, Gu H, Aoyama T, Qu LJ (2013) TRANSLUCENT GREEN, an ERF family transcription factor, controls water balance in *Arabidopsis* by activating the expression of aquaporin genes. *Molecular Plant* 7:601-615.

## 12. ANEXO

### 12.1 Secuencias de genes *SUB1C-1* y *SUB1C-1-3xFLAG*

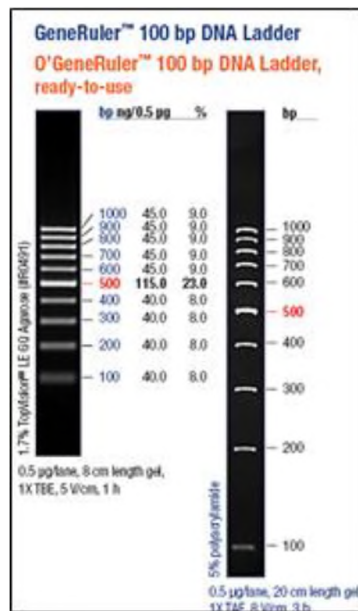
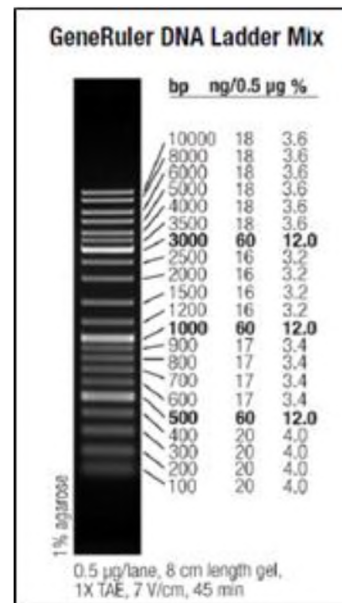
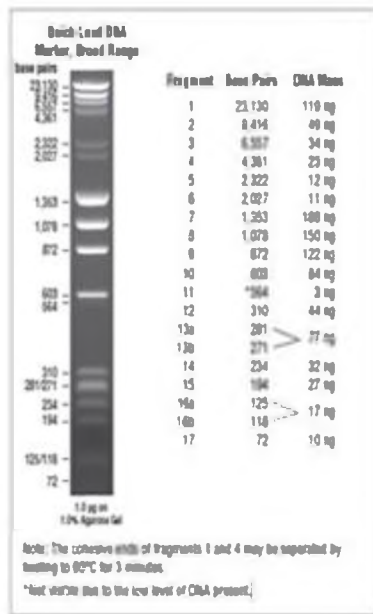
Sub1C-1

```
ATGCGCCGCCGCGTCTCCTCCTCCCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCGTCGCCGGCGAGGCATCACAAAGGCGC
GGCGCAGCAGGAGGAAGCTCGTCGCCGACGAGGACTGGGAGGCCGCCTTCCGCGAGTTCCTCTCCCGCGA
CGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGGGCACCACGTCGTTGTTGCGCCGCTGATCCGTAGTAGTAAC
AAGTGCGTCCACGGCCACGAGGTGGTGGCGTCGACGGTCCGGCGGTGGCGCAAGCGGGCGGACGACGACGAG
CCGACGACGACGACGGCGAGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGAGGGAGAGGGCGGAGCTACCCGTACCGCGGCAT
CCGGCAGCGGCCGTTGGGGGAGGTGGGCGTCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGCATCCGCGTCTGGCTC
GGCACCTTCGACACCGCCGAGGGCGCCGCGCGCGCCTACGACGACGAGGTTTCGCCGCATCTACGGCGGCA
ACGCCAAGACCAACTTCCCCCATCGCCGCCGCCGCCGGAGCAGCCAGCGGCCCCGGTAGCGGGCGGAGAG
GAGCCCCCTCGACGACGACGACGACGACGACGCCGTCCGGCGGAGGACTCCGGCGACTCGCGCATACTCATCGAG
TGCTGCTCCGACGACCTGATGGACAGCCTCCTCGCCGCCTTCGACATGACCACCGGGCGACATGCGCTTCT
GGAGCTAA
```

Sub1C-3xFLAG

```
ATGCGCCGCCGCGTCTCCTCCTCCCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCGTCGCCGGCGAGGCATCACAAAGGCGC
GGCGCAGCAGGAGGAAGCTCGTCGCCGACGAGGACTGGGAGGCCGCCTTCCGCGAGTTCCTCTCCCGCGA
CGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGGGCACCACGTCGTTGTTGCGCCGCTGATCCGTAGTAGTAAC
AAGTGCGTCCACGGCCACGAGGTGGTGGCGTCGACGGTCCGGCGGTGGCGCAAGCGGGCGGACGACGACGAG
CCGACGACGACGACGGCGAGCGGGCGGGCGGGCGGGAGGGAGAGGGCGGAGCTACCCGTACCGCGGCAT
CCGGCAGCGGCCGTTGGGGGAGGTGGGCGTCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGCATCCGCGTCTGGCTC
GGCACCTTCGACACCGCCGAGGGCGCCGCGCGCGCCTACGACGACGAGGTTTCGCCGCATCTACGGCGGCA
ACGCCAAGACCAACTTCCCCCATCGCCGCCGCCGCCGGAGCAGCCAGCGGCCCCGGTAGCGGGCGGAGAG
GAGCCCCCTCGACGACGACGACGACGACGACGCCGTCCGGCGGAGGACTCCGGCGACTCGCGCATACTCATCGAG
TGCTGCTCCGACGACCTGATGGACAGCCTCCTCGCCGCCTTCGACATGACCACCGGGCGACATGCGCTTCT
GGAGCAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGTGGAGGCGGTTTCAGACTACAAAGA
CCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTGA
```

## 12.2 Marcadores de peso molecular



## 12.3 Modo de preparación de soluciones stock

**Tampón TAE (50X).** Se añadieron 242g de Tris Base a 57.1 ml de ácido acético y 100 ml de EDTA 0.5M hasta un volumen de 1 litro. El volumen final de la mezcla se ajustó a pH 8.0. A partir de la solución concentración se utilizó para diluirlo a 1X.

**Gel de agarosa.** Se preparó diferente tipo de porcentaje de agarosa que fueron de 0.8, 1.0, 1.5 y 2.0% (p/v) en tampón 1X, según el requerimiento. La mezcla se fundió en el microondas, hasta su completa disolución.

### Antibióticos

Los antibióticos fueron preparados de acuerdo a la secuencia de genes que expresa resistencia en el vector indicado y así poder seleccionar las clonas correctamente.

Estos antibióticos se prepararon a partir de una solución concentrada en agua bidestilada y posteriormente se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , para obtener concentraciones finales (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) que fueron utilizadas para el crecimiento de bacterias *E. coli*. Para ampicilina se preparó una solución concentrada a 100 mg/ml en agua bidestilada (pGEM-T Easy y pBJ36\_Alca) y para espectinomicina se preparó a 50 mg/ml en agua bidestilada (pMLBart\_AlcaR).



## UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 4 de Diciembre del 2014 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Diseño *in silico* y construcción *in vitro* de plásmidos binarios para el análisis funcional del gen *SUBLA-1*** presentado por el alumno Oscar Gregorio Ramírez, con número de matrícula **09090006**, aspirante al grado de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron **QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**

Tuxtepec, Oax., a 5 de Diciembre del 2014.

#### ATENTAMENTE LA COMISIÓN REVISORA.

Autor de Tesis

Presidente

Dr. Julián Macío Peña Castro  
Profesor-Investigador

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa  
Profesor-Investigador

Secretario

Vocal

  
Dr. Edgar García López  
Profesor-Investigador  
Dra. Ariana Ariene Iniesta Heredia  
Profesor-Investigador