



**UNIVERSIDAD DEL MAR
CAMPUS PUERTO ESCONDIDO**

“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *CAD* DE
Agave tequilana Weber var. azul, INVOLUCRADOS EN LA
SINTESIS DE LIGNINA EN PLANTAS MUTANTES DE
Arabidopsis thaliana”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA
LORENA RODRIGUEZ LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. FULGENCIO ALATORRE COBOS

CODIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS DAVID MALDONADO BONILLA

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA 2020

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES CAD DE *Agave tequilana*
Weber var. azul, INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE LIGNINA EN PLANTAS
MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana*

Lorena Rodríguez López

Universidad del Mar campus Puerto Escondido, 2020

RESUMEN

En la actualidad la biosíntesis de lignina, el cual es un polímero que participa en la formación de la pared celular secundaria en las plantas, es bien conocida en plantas dicotiledóneas. Sin embargo, para las plantas monocotiledóneas no se han realizado grandes estudios en las rutas biosintéticas de dicho compuesto, especialmente en especies no modelo y para las cuales no existe un genoma de referencia. Previamente en el grupo del Dr. Alatorre (Maceda 2020) se realizaron estudios bioinformáticos de transcriptomas de *A. tequilana*, y se identificaron genes ortólogos involucrados en la síntesis de lignina. En este trabajo, se caracterizó funcionalmente al gen *AqCAD5* de *Agave tequilana* Weber, el cual fue seleccionado por sus perfiles de expresión en diferentes órganos de la planta. Para esto se realizaron una serie de experimentos para validar la clonación del gen *AqCAD5* y el uso posterior del gen quimérico p35S::*AqCAD5* en ensayos de complementación genética en *Arabidopsis thaliana*. p35S::*AqCAD5* fue sobreexpresado en plantas silvestres (WT), mutantes sencillas (*cad-c*, *cad-d*) y mutantes dobles (*cad-cd*) de *A. thaliana* con pérdida de función. Todas las mutantes usadas fueron reanalizadas para defectos en haces vasculares por la deficiencia de lignina usando histología. Los resultados obtenidos indican que fue posible la clonación exitosa del gen *AqCAD5* de *A. tequilana* y que su expresión ectópica conduce a defectos en el desarrollo normal de plántulas de *A. thaliana*. Ello sugiere que *AqCAD5* participa en la síntesis de lignina en *A. tequilana*.

Palabras clave: lignina, *Agave tequilana*, genes CAD, *Arabidopsis thaliana*, mutantes, *Agrobacterium tumefaciens*.

FUNCIONAL CHARACTERIZATION OF *CAD* GENES OF *Agave tequilana* Weber var. azul, INVOLVED IN THE SYNTHESIS OF LIGNIN IN MUTANTS PLANTS OF

Arabidopsis thaliana

Lorena Rodríguez López

Universidad del Mar campus Puerto Escondido, 2020

ABSTRACT

Genes involved in the biosynthesis of lignin, which is a polymer that participates in the formation of the secondary cell wall in plants, have extensively studied in dicots plants. However, genomics underlying lignin biosynthesis is little known in monocots species, especially in non-model plants. Previously, in Dr. Alatorre's group, data mining of *Agave tequilana* transcriptomes allowed to identify orthologous genes involving in lignin biosynthesis pathway. Here it is reported chimeric genes constructed for the functional characterization of *AqCAD5* gene from *A. tequilana* Weber. PCR standard and restriction enzyme pattern analysis confirmed the successful *AqCAD5* cloning. Genetic complementation assays of lignin-deficient mutants of *A. thaliana* were used to assess functional role of *AqCAD5*. Our results of ectopic expression showed that *AqCAD5* is likely a functional gene to lignin deposition in *A. tequilana*.

Key words: lignin, *Agave tequilana*, *CAD* genes, *Arabidopsis thaliana*, mutants, *Agrobacterium tumefaciens*.

DEDICATORIAS

Dedico especialmente esta tesis a mis queridos y apreciados padres, porque sin su motivación, confianza, además de su apoyo moral y económico durante toda mi formación personal y académica, este trabajo no hubiera sido posible, los amo eternamente.

A mis hermanos, a quienes quiero y admiro mucho, por su ejemplo, cariño y confianza en todo momento a pesar de la distancia.

.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por nunca soltarme de su mano y por haberme permitido culminar esta maravillosa etapa de mi vida, por cuidarme a donde quiera que voy y por siempre bendecirme.

A mis queridos y apreciados padres Noé y Gloria, por brindarme su confianza, cariño y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida desde el día de mi existencia.

A mis queridos hermanos Marisol, Sandra, y Noé, por brindarme su apoyo y su amistad sincera durante toda mi vida y por motivarme siempre a seguir adelante.

A mi director de tesis, Dr. Fulgencio Alatorre Cobos, por haberme recibido en su laboratorio y darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su gran apoyo, enseñanza y paciencia durante la realización de este trabajo.

A mi codirector de tesis, Dr. Luis Maldonado Bonilla, por su gran apoyo, enseñanza y paciencia brindada durante la realización de este trabajo porque a pesar de la distancia siempre estuvo pendiente y dispuesto a apoyarme.

A mis revisores de tesis, Dr. Erick Pablo Carrillo, Dr. Juan Manuel Villa Hernández, Dr. Noé Ruiz García, por su gran apoyo y su tiempo que dedicaron para revisar mi trabajo, gracias por las críticas constructivas y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi alma Mater, la Universidad del Mar campus Puerto Escondido, por haberme formado profesionalmente y por las facilidades otorgadas durante mi formación.

A mis queridos profesores de la universidad, por sus conocimientos compartidos y por todas las enseñanzas y consejos, los cuales contribuyeron para poder llegar hasta este momento de mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados campus Campeche, por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones y por todas las facilidades otorgadas durante mi estancia en el Colegio.

A los doctores del Colegio de Postgraduados, Dr. José Luis Villalpando Aguilar, Dra. Itzel López Rosas, Dr. Jesus Arreola Enríquez, Dr. Alfredo Sánchez Villarreal, quienes colaboraron y me brindaron su apoyo para que este trabajo se pudiera realizar.

A los técnicos de los laboratorios, Dr. José Luis Villalpando Aguilar y M.C Elmi Cen Cen, por sus grandes enseñanzas y todo el apoyo brindado durante la realización de mis experimentos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento al proyecto 1049 FC2015-2 otorgado al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos y titulado "Study of molecular mechanisms underlying the biosynthesis and deposition of structural carbohydrates during the cell wall development in Agave sp. (Esta tesis fue desarrollada como parte de este proyecto).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme ingresar a sus instalaciones para realizar parte de mi trabajo.

Al Instituto de Ecología A. C (INECOL) Xalapa Ver., por abrirme sus puertas de sus instalaciones para la realización de la Microscopia electrónica en sus laboratorios.

A la estudiante de doctorado del CICY, Amaranta, por su ayuda y apoyo en el cuidado del material vegetal.

A Luis Fer, el estudiante de maestría, por su ayuda y apoyo en la proporción de datos de los genes que se trabajaron en este proyecto.

A Efra, por su apoyo en la esterilización de los materiales de laboratorio, además de ayudarme con el cuidado de mis plantas incluso cuando ya no estaba dentro de sus horas de trabajo.

A Deme, por brindarme su amistad hasta este momento y por su compañía durante la carrera y en el tiempo de la realización de la tesis. Gracias por el apoyo y por todas las aventuras compartidas que jamás olvidaré.

A mis compañeros de generación, por todo lo compartido durante los cinco años de universidad, pero muy especialmente gracias a Cris, Esdras, Eli, Carito, Yesi, Flavio, Migue, Isma, Eze, por su apreciada y valiosa amistad, además de su apoyo brindado durante la carrera y más allá. A todos siempre los recuerdo con cariño =)

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional del Colegio de Postgraduados, por su compañerismo y apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por formar parte de esta bonita experiencia.

A los y las estudiantes hospedados en el COLPOS campus Campeche, por brindarme su compañía, por ser compartidos y hacer que mi estancia en el colegio fuera divertida y amena.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Pared celular: Componentes y estructura	4
2.2 Lignina, un componente característico de la pared secundaria: características y funciones biológicas	5
2.3 Biosíntesis de lignina	7
2.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> : descripción taxonómica y morfología.....	10
2.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo en la biología molecular	12
2.6 Genes <i>CAD</i> : función y fenotipo de las mutantes <i>cad</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y otras plantas no modelo	13
2.7 Diversidad e importancia económica y cultural de los agaves	15
2.8 <i>Agave tequilana</i> Weber Azul	16
2.9 Los genes <i>CAD</i> <i>Agave tequilana</i>	18
2.10 Clonación génica como un primer paso en los ensayos de complementación funcional: Clonación mediante Tecnología GATEWAY™	20
2.11 Promotores como elementos regulatorios en construcciones genéticas....	22
2.12 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
2.13 Agentes de selección de plantas transformadas genéticamente	25
2.13.1 Bialafos	25
2.13.2 Glufosinato de Amonio	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos Específicos	28
V. HIPÓTESIS	28

5.1 Hipótesis general	28
VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA	29
6.1 Material genético.....	29
6.2 Esterilización de semillas	29
6.3 Germinación de semillas	29
6.4 Preparación de macetas para el crecimiento en suelo de plantas	32
6.5 Transferencia de plantas a suelo	33
6.6 Revisión de las construcciones genéticas que albergaron al gen <i>AqCAD5</i> . 33	
6.6.1 Diseño de oligonucleótidos para ensayos de PCR estándar.....	34
6.6.2 Verificación de la reacción BP (pDONR-<i>AqCAD5</i>) mediante PCR... 34	34
6.6.3 Verificación de la reacción BP (pDONR-<i>AqCAD5</i>) mediante análisis de patrón de restricción	35
6.6.4 Verificación de la reacción LR (LR-<i>AqCAD5</i>) mediante PCR.....	36
6.7 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción p35S:: <i>AqCAD5</i>	37
6.7.1 Verificación de colonias positivas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para p35S::<i>AqCAD5</i>.....	38
6.8 Electroforesis de los productos de PCR estándar y digestiones enzimáticas	39
6.9 Transformación de plantas por el método de Floral Dip.....	40
6.10 Colecta de semillas y selección de plantas transformantes T1	41
6.11 Proceso de histología de tallos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
6.12 Detección histoquímica de lignina	43
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
7.1 Verificación de la clonación del gen <i>AqCAD5</i> mediante PCR.....	45

7.1.1 Análisis del vector pDONR-<i>AqCAD5</i> por ensayos de PCR y patrón de restricción	45
7.2 Verificación de la clonación del gen <i>AqCAD5</i> en el vector de expresión pB7WG2.0	49
7.3 Verificación de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el cDNA del gen <i>AqCAD5</i>	51
7.3.1 Selección de colonias positivas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el cDNA del gen <i>AqCAD5</i>	52
7.4 Evaluación fenotípica de las mutantes <i>cad-c</i> , <i>cad-d</i> y <i>cad-cd</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
7.4.1 Análisis morfológico de las células del tejido vascular	54
7.4.2 Análisis de la acumulación de lignina en el tejido vascular	57
7.5 Transformación genética de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante la técnica de Floral Dip	58
7.6 Caracterización fenotípica de plántulas T1 potencialmente transformadas con p35S:: <i>AqCAD5</i>	60
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. PERSPECTIVAS	65
X. LITERATURA CONSULTADA	66