Análisis de la expresión del gen At4g12640 en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana*

María Gloria Solís-Guzmán, José Fernando Alvarado Rodríguez, Ernesto Vázquez Chimalhua, Yazmín Carreón Abud, Miguel Martínez Trujillo✉

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México

Resumen

El gen At4g12640 de *Arabidopsis thaliana* codifica para una proteína de tipo Spen, de función desconocida. Las proteínas de tipo Spen, tienen al menos un dominio que permite la unión a ARN (RRM) y otro dominio que permite establecer una interacción con otras proteínas (SPOC), por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación genética. En este trabajo se generaron tres fusiones transcripcionales (uidA::GFP) abarcando 1500, 1000 y 500 pares de bases de la región reguladora 5´ del gen At4g12640, cada una de estos fragmentos fueron fusionados por separado al gen reportero GFP, usando la tecnología Gateway®. Se transformaron plantas de *A. thaliana*, obteniendo una eficiencia entre el 1 y 1.2%. En las plantas transformadas de la generación T1, se observó expresión asociada al tejido vascular, en las siguientes estructuras: raíz, hoja cotiledonar, hoja verdadera, estambres y gineceo. Los resultados sugieren que la función del gen At4g12640 podría estar asociada al tejido vascular.

Palabras clave: **gen, expresión, *Arabidopsis*.**

Abstract

The At4g12640 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a Spen type protein, of unknown function. Spen type proteins, have at least one domain that allows binding to ARN (RRM) and a SPOC domain that allows for interaction with other proteins, so that in general, these proteins are involved in gene regulation processes. In this work we generated three transcriptional fusions (uidA::GFP) covering 1500, 1000 and 500 base pairs of the 5 'regulatory region of the gene At4g12640, each of these fragments were separately fused to the GFP reporter gene, using the technology Gateway®. *A. thaliana* plants were transformed, obtaining efficiencies between 1 and 1.2%. In the T1 transformed plants was observed expression associated to the vascular tissue, in the following structures: root, leaf cotyledon, true leaf, stamens and gynoecium. The results suggest that function of the At4g12640 gene might be associated with vascular tissue.

Key words: **gene, expression, *Arabidopsis*.**

Introducción

Los promotores se definen de manera general como secuencias en el ADN que tienen la capacidad de conferir la transcripción en un sistema de prueba *in vivo* o *in vitro*. La organización de los promotores reconocidos por la ARN polimerasa II consisten de un promotor núcleo, definido como la secuencia más corta en la que la ARN polimerasa II puede iniciar la transcripción, y su funcionamiento es con una eficiencia baja. Antes del promotor núcleo, a pocas decenas de bases, se encuentran secuencias que varían de acuerdo al promotor, y a las cuales se unen proteínas activadoras para incrementar la eficiencia de transcripción (White, 2001). El núcleo del promotor es definido generalmente como la combinación mínima de secuencias de ADN (típicamente alrededor de 40 bases) que son suficientes para la iniciación precisa de la transcripción por parte de la ARN polimerasa II y los factores basales (Smale, 1997). Los elementos núcleo del promotor mejor caracterizados son el elemento o caja TATA, localizado entre 25 y 30 bases hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción, con una secuencia consenso TATAa/tAa/t y el elemento iniciador (Inr), centrado en el sitio de inicio de la transcripción que es rico en pirimidinas, aunque su secuencia precisa es variable (YYANa/tYY) (Nikolov y Burley, 1997). La caja TATA está presente en la mayoría de los promotores y puede combinarse con el elemento iniciador. En otros promotores en que no hay caja TATA el elemento iniciador generalmente está presente, aunque puede faltar. Los promotores con caja TATA presentan elementos iniciadores débiles, ya que la eliminación de la caja TATA ocasiona la pérdida de la actividad del promotor y en estos casos el elemento iniciador tiene la función de precisar el sitio correcto de inicio del transcrito (Zhu *et al.*, 1995). Otro elemento presente en el núcleo del promotor es el DPE (downstream promoter element) ó elemento que se encuentra hacia abajo del núcleo del promotor y que se ha reportado en algunos promotores de *Drosophila* y humanos, con una secuencia consenso a/gGa/tCGTG ubicada a 30 nucleótidos hacia abajo del sitio de inicio de transcripción (Burke y Kadonaga, 1997). Se ha descrito un elemento presente en la región núcleo del promotor, BRE (elemento reconocido por TFIIB), con la secuencia consenso G/C-G/C-G/A-CGCC, el cual posiblemente participa en determinar la fuerza del promotor (Lagrange *et al.*, 1998).

La proteína NP193001.2 codificada por el gen *At4g12640* pertenece a la familia Spen (Split ends) caracterizada por un dominio RRM (ARN recognition motif) N-terminal y un dominio bien conservado C-terminal SPOC (Spen paralog and ortholog C-terminal). El dominio RRM es conocido como RBD (ARN binding domain) o RNP (Ribonucleoprotein domain), consta de 90 aa y es encontrado en una variedad de proteínas hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) implicadas en el splicing alternativo y proteínas componentes snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins). En cuanto al dominio SPOC, contiene alrededor de 165 residuos de aminoácidos y está implicado en la señalización del desarrollo, facilitando la interacción proteína-proteína (Sánchez-Pulido *et al.*, 2004). Las proteínas Spen participan en diferentes procesos biológicos como la diferenciación de la célula neuronal, sobrevivencia y

✉ **Autor de correspondencia:** Dr. Miguel Martínez Trujillo, email: codigogenetico@gmail.com. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

orientación del axón (Chen y Rebay, 2000; Kuang *et al.*, 2000), regulación del ciclo celular (Lane *et al.*, 2000), represión en la identidad de la cabeza del tronco embrionario (Wiellette *et al.*, 1999), así como en la actuación en la señalización de la proteína Wingless (Wg) en los discos imaginales del ojo, alas y pieARNs de la *Drosophila melanogaster* (Lin *et al.*, 2003).

Vázquez-Chimalhua (2012) hizo un análisis bioinformático de 500 pares de bases hacia arriba del inicio de transcripción del gen At4g12640, usando la base de datos reportada en Higo *et al.* (1999). En esta región de 500 bases se encontraron diferentes secuencias consenso para elementos de unión a factores transcripcionales o de control en la expresión genética, como son GTGANTG10, un motivo encontrado en el promotor del gen g10 de polen de tabaco, así como elementos de respuesta a luz (GT1 e IBOX). Sin embargo, no se encontró una caja TATA ó un elemento iniciador en la región núcleo del promotor.

Aunque los elementos de secuencia encontrados en los promotores pueden proporcionar una idea general de cómo éstos confieren la expresión genética, es sólo en condiciones *in vivo* cuando se obtiene la información fidedigna de la expresión, por lo que en este trabajo se generaron construcciones de la región reguladora 5´ del gen At4g12640 fusionadas al gen reportero *uidA::GFP.* Con las construcciones anteriores se transformaron plantas de *A. thaliana*, en las que se analizó la expresión conferida por las regiones reguladoras 5´, en la generación T1.

Materilaes y metodos

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron en la página de IDT (Integrated DNA Technologies) http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/, además se les agregó en el extremo 5' la secuencia para corte con la enzima *Hind* III (**Tabla 1**). Cada uno de los oligonucleótidos Forward se utilizó en combinación con el oligonucleótido Reverso para obtener cada amplificación por PCR.

Extracción de ADN de A. thaliana y amplificación de las diferentes versiones del promotor del gen At4g12640

El ADN de planta se aisló usando el kit DNeasy Plant Mini (Cat. 69104, Millipore) bajo el mismo protocolo del fabricante. Este ADN se utilizó como templado para realizar PCRs con los oligonucleótidos diseñados empleando el kit para PCR de la empresa Fermentas (EP0403), utilizando la fórmula de reacción del fabricante.

Tabla1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de regiones promotoras del gen At4g12640

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Forward SpocF1500	5'-AAGCTTCAAACCTCCTCGCTTACTCTTCA-3'
Forward SpocF1000	5´-AAGCTTACCTCACAGAATTGA CAG ATCCA-3´
Forward SpocF500	5´-AAGCTTACATGACGAGCAGATCTACGGAGA-3´
Reverso SpocR2	5'-AAGCTTTCTGCATTCGTCAGATCTATCGCA-3'

La amplificación por PCR se hizo probando diferentes condiciones de amplificación, iniciando con la siguiente: un ciclo de 95 °C por 5 min, 35 ciclos con 95 °C por un min, 55 °C por un min, 68 °C de uno a dos min, un ciclo de 68 °C por 10 min, finalización manteniendo a 4 °C.

Clonación de las regiones promotoras del gen At4g12640 en el vector pCR8/GW/TOPO

Los fragmentos de ADN correspondientes al promotor del gen At4g12640 fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos mostrados en la **tabla 1**, los cuales se clonaron en el vector de entrada pCR8®/GW/TOPO®, usando la mezcla de reacción sugerida por el fabricante (Cat. K2500-20, Invitrogen). Para verificar la orientación 5'-3' de la inserción de los productos de PCR, los plásmidos construidos se mandaron secuenciar al LANGEBIO, Unidad Irapuato. Se utilizó el método de terminación de cadenas (Sanger *et al.*, 1977), usando dideoxinucleótidos fluorescentes (ABI) y un secuenciador de DNA ABI PRISMTM 374.

Manejo del ADN plasmídico y transformación de células competentes

Para la replicación y obtención de ADN de los plásmidos se utilizó la cepa DH5α de *E. coli* (Sambrook y Russel, 2001). La cepa se creció en medio LB que contiene 1% de Bacto triptona, 0.05% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio. Para medio sólido se adicionó 1.5% de agar bacteriológico. Para el aislamiento del ADN de los plásmidos bacterianos se utilizaron los métodos de Miniprep y Maxiprep (con polietilenglicol) descritos por Sambrook y Russell (2001). Las condiciones de corte con endonucleasas de restricción se hicieron siguiendo las indicaciones del fabricante (INVITROGEN). Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α con las mezclas de ligación, las cuales se dializaron previamente en membranas Millipore con un tamaño de poro de 0.025 µm y la muestra se pasó a celdas de electroporación para aplicar un choque eléctrico a 1800V en un electroporador Eppendorf 2510. Las muestras de ADN se separaron en geles de agarosa al 1%, con TAE 1X.

Recombinación dirigida en el vector destino pKGWFS7

El vector de entrada PCR8®/GW/TOPO® conteniendo cada uno de los fragmentos de ADN del promotor de At4g12640 entre los sitios *attL1* y *attL2*, se recombinó con el vector destino binario pKGWFS7, que contiene los sitios *attR1* y *attR2.* La recombinación se hizo con el Kit de Invitrogen LR clonase II enzyme Mix (Cat. 11791-020). En los plásmidos recombinantes, cada fragmento de ADN del promotor de At4g12640 quedó ubicado hacia el extremo 5' del gen reportero *uidA::GFP*.

Preparación de células competentes y transformación de Agrobacterium tumefaciens pGV2260

El procedimiento se realizó de acuerdo a Sambrook y Russel (2001). Se utilizó la cepa *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 (McBride y Summerfelt, 1990). La selección de colonias se hizo en el medio LB con carbenicilina (100 µl/ml), rifampicina (50 µl/ml), espectinomicina (100 µl/ml) y estreptomicina (300 µl/ml).

Método de transformación de Arabidopsis thaliana por el método de floral dip modificado (Martínez-Trujillo et al., 2004)

La cepa de *A. tumefaciens* pGV2260 conteniendo el vector binario con las regiones reguladoras 5´ se sembró en medio YENB con los antibióticos: rifampicina (50 µg/ml), carbenicilina (100 µg/ml), estreptomicina (300 µg/ul) y espectinomicina (100 µg/ul). La cepa se creció primero en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, al cual se adicionaron 10 ml del medio YENB con los antibióticos. Se mantuvo en agitación a 30 °C hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 medida a 600 nm. Se transfirieron 40 ml del cultivo anterior a 400 ml de medio YNEB con antibióticos y se incubó a 30 ºC con agitación, hasta que el cultivo llegó a una densidad óptica mayor a 0.6 a 600 nm. Se centrifugó la suspensión bacteriana a una velocidad de 6000 rpm por 20 minutos. La pastilla se resuspendió suavemente en 10 ml de medio de infiltración (MS 0.5X, sacarosa 5%, silwett L-77 0.05%). Con la suspensión bacteriana se hizo la aplicación a plantas de Arabidopsis con una inflorescencia de 2-10 cm, en la que la mayoría de las flores estuvieron cerradas. La aplicación se hizo con una micropipeta de 1 ml. Las plantas se colocaron en una caja oscura por 12 a 24 horas y posteriormente de pasaron a condiciones de iluminación. Se hicieron más aplicaciones de la suspensión bacteriana a los botones florales que fueron apareciendo. Se esperó a la formación de silicuas para colectar las semillas. La selección de plantas se hizo en medio MS (Murashige y Skoog, 1963), con kanamicina 65 µg/ml. Las líneas obtenidas por transformación fueron denominadas VP1500, VP1000 y VP500, de acuerdo al tamaño de la región reguladora 5' que se utilizó para generar la construcción.

Análisis histoquímico de la actividad de GUS

Las plantas transgénicas con el gen reportero *uidA* (Jefferson *et al.*, 1987) se tiñeron en 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil D-glucurónido en buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4, 0.1M, pH 7), con 2 mM de ferrocianuro de potasio y 2 mM de ferricianuro de potasio, por 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron de acuerdo a Malamy y Benfey (1997). Las raíces procesadas se cubrieron con láminas de vidrio y se sellaron con barniz de uñas comercial.

Resultados

En este trabajo se generaron tres construcciones genéticas de la región reguladora 5´ del gen At4g12640 fusionadas al gen reportero *uidA::GFP* y se transformaron plantas de *A. thaliana* para analizar la expresión conferida por estas regiones, en plantas de la generación T1.

Amplificación de la región reguladora 5´ del gen At4g12640

Se utilizaron los oligonucleótidos de la **tabla 1** para amplificar regiones de 1500, 1000 y 500 pb de la región reguladora. Cada uno de los oligonucleótidos Forward se utilizó en combinación con el oligonucleótido Reverso para obtener cada amplificación. Las amplificaciones obtenidas por PCR se presentan en la **figura 1**.

Clonación de las regiones reguladoras 5' del gen At4g12640 al vector de entrada pCR®8/GW/TOPO®

Los productos de PCR se clonaron en el vector de entrada PCR8®/GW/TOPO®, usando la mezcla de reacción sugerida por el fabricante. Para verificar los fragmentos de las regiones reguladoras clonadas, se realizó una digestión con la enzima *Hind*III. Los fragmentos de ADN liberados por el corte con *Hind*III, correspondieron a los tamaños de los fragmentos clonados (**Fig. 2**). Además, la orientación de los insertos se verificó por secuenciación.

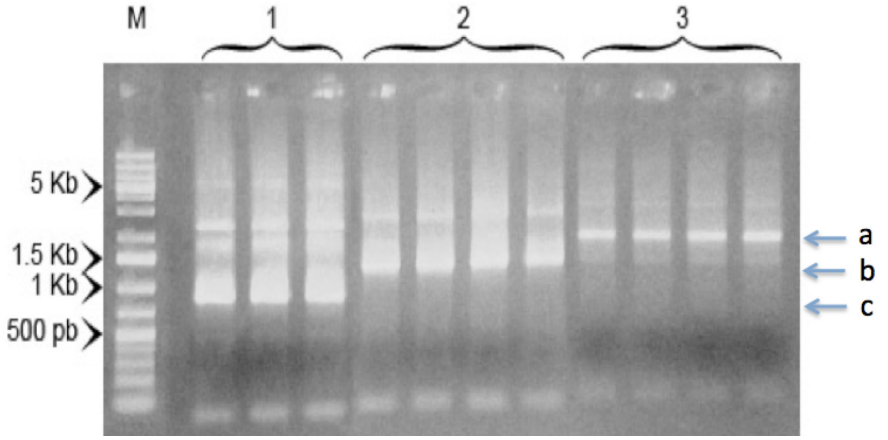

Figura 1. Amplificaciones por PCR de tres versiones del promotor de At4g12640. 1) Amplificación con SpocF500, 2) SpocF1000 y 3) SpocF1500. Las bandas de ADN señaladas como a, b ó c corresponden a la región reguladora 5' de At4g12640 con tamaños de 1500, 1000 y 500 pb, respectivamente.

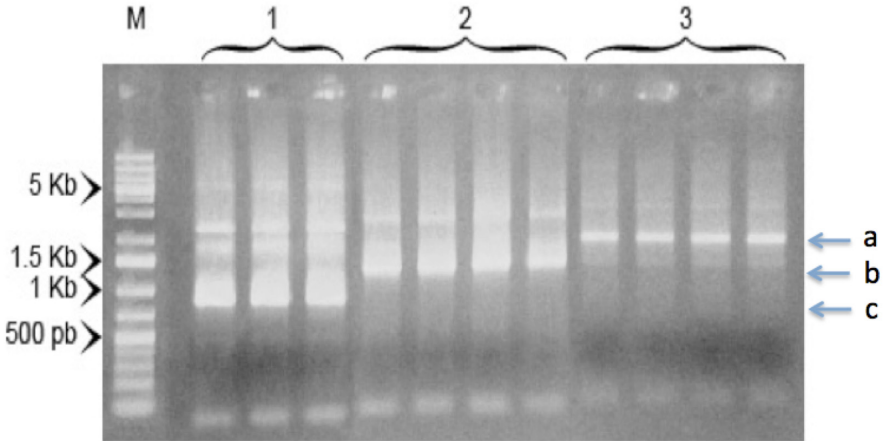

Figura 2. Versiones de ADN de la región reguladora del gen At4g12640 clonadas en el vector de entrada PCR®8/GW/TOPO®. Los carriles 1 y 3 presentan el vector unido a las versiones 1000 y 1500 respectivamente. Los carriles 2 y 4 presentan la digestión con *Hind*III del vector de entrada que libera las versiones 1000 y 1500, respectivamente.

Recombinación dirigida en el vector destino pKGWFS7

Se realizó la reacción de recombinación de cada uno de los vectores PCR®8/GW/TOPO® con las regiones reguladoras 5´ de At4g12640, con el vector de expresión pKGWFS7. Los plásmidos obtenidos de las colonias seleccionadas, fueron cortados con la enzima *Hind*III, para verificar la inserción de los fragmentos de ADN de las regiones reguladoras (**figura 3**). Los fragmentos de ADN liberados correspondieron a los tamaños esperados.

Transformación genética de A. thaliana

Los plásmidos recombinantes conteniendo las regiones reguladoras 5´ del gen At4g12640, se utilizaron para transformar *A. tumefaciens*. Posteriormente, se realizó la inoculación de plantas de *A. thaliana* Col-0 con la suspensión de *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones genéticas. Las semillas obtenidas se germinaron en medios MS con kanamicina 65 µg/ml, obteniéndose en todos los casos plantas potencialmente transformadas, con coloración verdosa y mayor crecimiento. La frecuencia de transformación obtenida fue alrededor del 1%. Las plantas seleccionadas a 65 µl/ml, fueron transferidas a un sustrato preparado con tierra y agrolita y crecidas hasta la producción de semilla. La semilla recuperada fue utilizada para ser germinada y crecida nuevamente en medio MS con kanamicina a 65 µg/ml, para obtener la generación T1. Los resultados obtenidos demuestran que en las semillas producidas ocurrió una segregación del transgén de kanamicina en una relación de 3:1 (**Figura 4**).

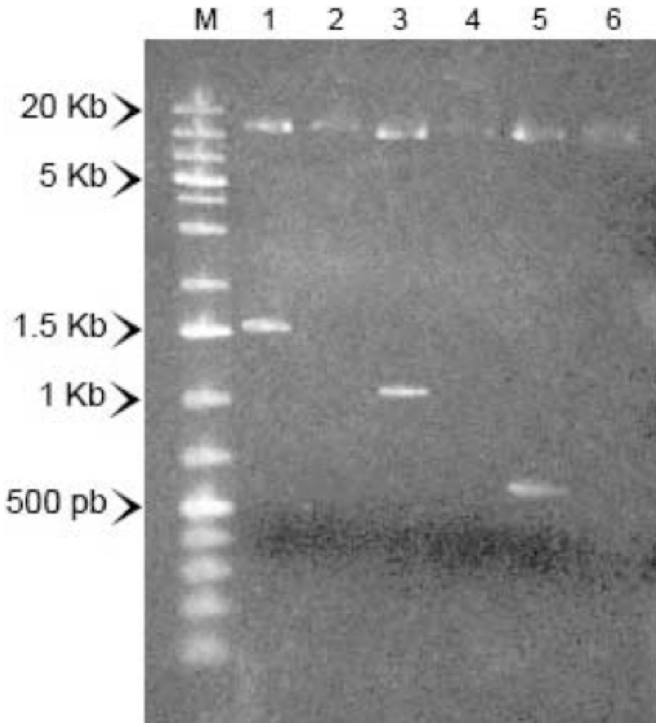

Figura 3. Versiones del promotor de At4g12640 de 1500, 1000 y 500 bp clonadas en el vector de expresión pKGWFS7. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los plásmidos sin digerir y los carriles 1, 3 y 5 presentan la digestión de los vectores con *Hind*III, que liberan fragmentos de ADN con los diferentes fragmentos del promotor.

Expresión conferida por las regiones reguladoras 5´ de At4g12640

Para detectar la expresión conferida por las regiones reguladoras 5´ del gen At4g12640, se realizaron tinciones con x-gluc de plantas de la generación T1. En todas las líneas T1 resistentes a kanamicina, se encontró expresión del gen reportero *uidA*. En las líneas VP1500, VP1000 y VP500 se encontró expresión en plantas de 10 días de edad después de la germinación, en el tejido vascular en las siguientes estructuras: hoja cotiledonar, hoja verdadera y raíz. No se apreciaron diferencias en la intensidad de la coloración entre las diferentes líneas transgénicas conteniendo los diferentes tamaños de las regiones reguladoras 5´. La **figura 5** muestra imágenes representativas de la línea transgénica VP1000. Fue común encontrar individuos con expresión en algunas zonas y en otras no en la raíz (**Figura 5**c).

La expresión en la flor se presentó en los filamentos de los estambres, en todas las líneas transformadas, pero no se encontró expresión en las anteras. En el gineceo sólo se encontró expresión en etapas del desarrollo de los estadios 12 y 13, sin embargo, ésta fue muy variable en intensidad, incluso en diferentes flores del mismo individuo. En la **figura 6** se presenta una flor con expresión en gineceo y filamentos de los estambres, en la línea transgénica VP1000.

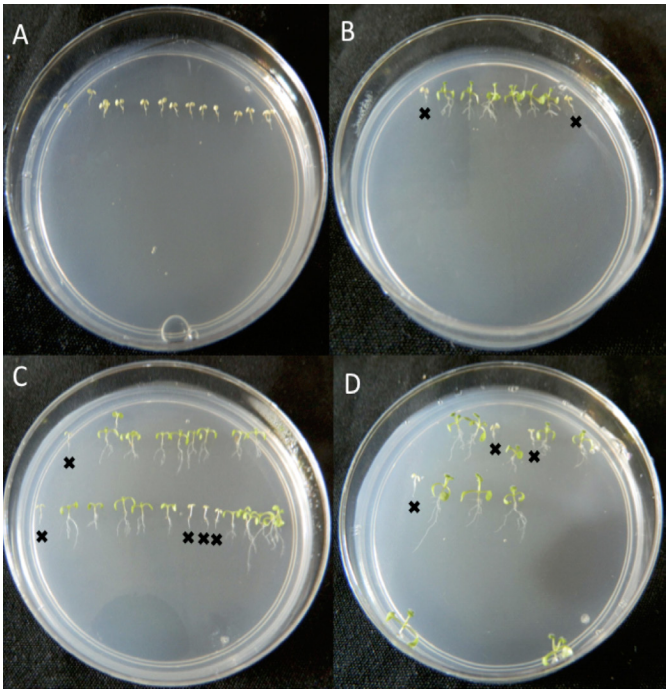

Figura 4. Plantas de la generación T1 *A. thaliana*, transformadas con A. tumefaciens conteniendo los vectores pKGWFS7 con las regiones reguladoras 5' de At4g12640. Las semillas generadas por plantas de la generación To fueron sembradas en medios MS con kanamicina 65 µg/ml. A) Plantas silvestres de *A. thaliana*. B), C) y D) Plantas representativas de la generación T1. Las plantas sensibles a kanamicina de la generación T1 se señalan con ×.

Discusión

La transformación genética de plantas es una herramienta que permite entender la función de los genes, ya sea por una sobreexpresión de éstos o bien por el análisis de la expresión conferida por la región promotora fusionada a un gen reportero.

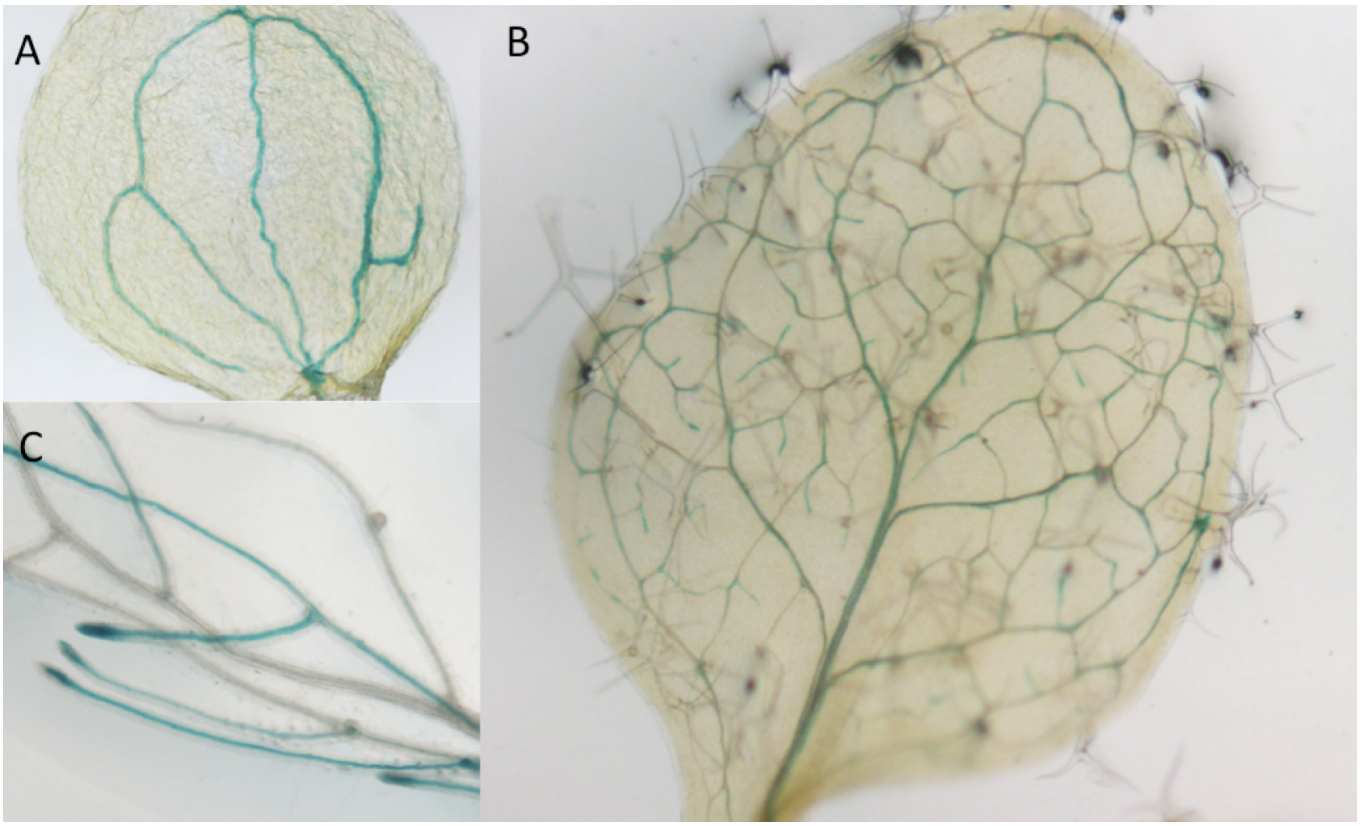

Figura 5. Expresión en raíz y hojas del gen reportero *uidA* en plantas VP1000. Las plantas de la generación T1 contienen la región reguladora 5' de 1000 bases de At4g12640 fusionada al gen reportero *uidA.* A) Expresión en hoja cotiledonar, B) Expresión en hoja verdadera, C) Expresión en raíz. Las plantas fueron teñidas con x-gluc de acuerdo a materiales y métodos.

En este trabajo fue posible generar tres construcciones genéticas de 1500, 1000 y 500 pb de la región reguladora 5´del gen At4g12640, fusionadas al gen reportero *uidA::GFP*. La transformación de *A. tumefaciens* con el vector destino estuvo entre el 1 y 1.2% para las diferentes plantas inoculadas, lo cual demuestra que el método de floral dip modificado por Martínez-Trujillo *et al.* (2004), permite obtener suficientes plantas transformadas. Con anterioridad Desfeux *et al.* (2000) demostraron que los óvulos son el blanco para la transformación con *Agrobacterium*, ya que durante el desarrollo del ovario, hay una estructura en el óvulo abierta cuando la flor se encuentra como botón. Por lo tanto, aplicar el inóculo de *Agrobacterium* a botones florales es importante para que *Agrobacterium* transfiera el transgén. En cambio, cuando la inoculación de las plantas con el inóculo bacteriano se hace sumergiendo todo el follaje en un medio de infiltración, se han reportado eficiencias de transformación menores (0.57%), posiblemente por el mayor daño ocasionado por el detergente del medio de infiltración (Clough y Bent, 1998).

En el análisis previo del promotor de este gen se encontraron elementos cis que se han asociado a la expresión en el mesófilo de la hoja, polen y endospermo de semilla (Vázquez-Chimalhua, 2012), sin embargo, en este trabajo no se ha encontrado expresión en polen ni en semilla y aunque existe expresión en la hoja, ésta se encuentra asociada al tejido vascular y no al mesófilo. Nuestros resultados demuestran que los elementos *cis* de un promotor de un gen, reportados para promotores de otros genes y otras especies vegetales, no necesariamente son funcionales.

Los elementos cis de respuesta a luz encontrados por análisis bioinformático por Vázquez-Chimalhua (2012), han sido reportados por Argüello-Astorga y Herrera-Estrella (1996, 1998) en los promotores de los genes de la subunidad pequeña de la RUBISCO, *Rbcs,* (G-Box e I-Box) y en los genes que codifican los complejos cosechadores de luz, *Lhcb,1* (GATA Box). Tanto *Rbcs* y *Lhcb1* codifican para proteínas que participan en la fotosíntesis, por lo que es lógico que su expresión sea inducida por luz, sin embargo, para el gen At4g12640, por el momento no es posible dilucidar el porqué la luz podría inducir su expresión. La expresión conferida por las regiones reguladoras 5´del gen At4g12640 será analizada posteriormente en nuestro laboratorio bajo diferentes condiciones de luz y oscuridad, para determinar si los elementos cis encontrados son funcionales.

Las regiones reguladoras 5´ de 500, 1000 y 1500 pb del gen At4g12640, confirieron expresión asociada al tejido vascular. El sistema vascular de la planta es una red de células que interconecta todos los órganos más importantes de las plantas y se compone de dos tejidos, xilema y floema, que funcionan en el transporte de agua y solutos, o azúcares, respectivamente (Turner y Sieburth, 2003), por lo que una función posible de la proteína codificada por At4g12640 estaría implicada en el transporte. Esto difiere con relación al gen del locus *OsI30787a* de *Oryza sativa* subespecie Indica, el cual codifica para una proteína Spen de 1005 aminoácidos, la cual tiene una identidad del 73% con la

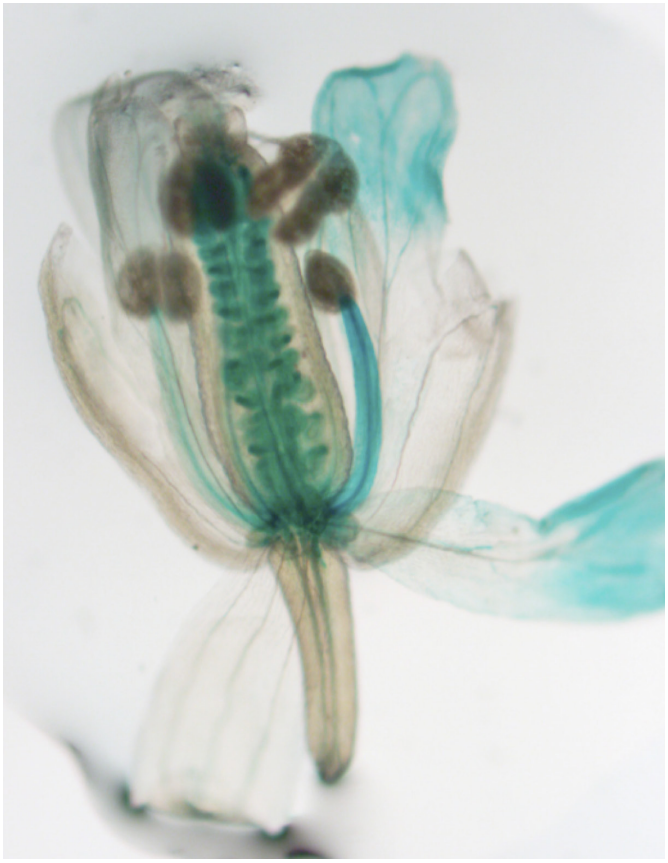

Figura 6. Expresión en flor del gen reportero *uidA* en plantas VP1000. Las plantas de la generación T1 contienen la región reguladora 5' de 1000 bases de At4g12640 fusionada al gen reportero *uidA*. Las plantas fueron teñidas con x-gluc de acuerdo a materiales y métodos.

proteína codificada por At4g12640, considerando los dominios RRM y SPOC. La región reguladora de 2000 bases del gen OsI30787 confiere expresión específica en el endospermo de la semilla, pero no se reporta expresión para tejido vascular (Chen *et al.*, 2007), por lo que lo más probable es que las funciones de las proteínas de Arabidopsis y arroz hayan divergido en el curso de la evolución.

Una proteina Spen de función conocida es FPA en *A. thaliana*, la cual presenta una identidad de 57% con la proteína codificada por At4g12640, considerando los dominios RRM y SPOC. FPA está implicada en la inducción de la floración en una ruta que es independiente del fotoperiodo (Schomburg *et al.*, 2001), pero no se reporta su expresión en tejido vascular. Por lo tanto, es poco probable que la función de la proteína codificada por At4g12640 esté relacionada con el mismo proceso fisiológico que FPA.

La expresión conferida por el promotor de At4g12640 en el gineceo, particularmente es las estructuras embrionarias, puede estar relacionada con la formación del tejido vascular, ya que se ha reportado que durante la formación del embrión en *A. thaliana*, en la etapa globular aparecen células procambiales, que darán origen posteriormente al tejido vascular durante la germinación del embrión (Turner y Sieburth 2003). Además, la expresión en la región del meristemo de las raíces, puede estar relacionada con las células que forman el protofloema y protoxilema, que posteriormente se diferencian en floema y xilema, respectivamente (Turner y Sieburth, 2003).

Considerados de manera global, los resultados obtenidos permitieron establecer que la expresión conferida por el promotor del gen At4g12640 de *A. thaliana* está ubicada en el tejido vascular y en zonas donde se forman células que posteriormente darán origen a este tejido.

Referencias

Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L. 1996. Ancestral multipartite units in light responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiology* 112:1151-1166.

Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L. 1998. Evolution of light-regulated plant promoters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 525-555.

Burke TW, Kadonaga JT. 1997. The downstream promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes and Development* 11: 3020-3031.

Chen F, Rebay I. 2000. Split ends, a new component of the Drosophila EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Current Biology* 10(2): 943-946.

Chen SY, Wang ZY, Cai XL. 2007. OsRRM, a Spen-like rice gene expressed specifically in the endosperm. *Cell Research* 17: 713-721.

Clough S, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:735-743.

Desfeux C, Clough SJ, Bent AF. 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology* 123: 895-904.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acid Research* 27: 297-300.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.

Kuang B, Wu SC, Shin Y, Luo L, Kolodziej P. 2000. Split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* 127: 1517-1529.

Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D y Ebright RH. 1998. New core promoter element in ARN polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes and Development* 12: 34-44.

Lane ME, Elend M, Heidmann D, Herr A, Marzodko S, Herzig A, Leh- ner CF. 2000. A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* 155: 233-244.

Lin HV, Doroquez DB, Cho S, Chen F, Rebay I, Cadigan KM. 2003. Splits ends is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development* 130: 3125-3135.

Malamy JE, Benfey, PN. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.

Martínez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL,

Herrera-Estrella L. 2004. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 63-70.

McBride KE, Summerfelt KR. 1990. Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 14: 269-276.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nikolov DV, Burley SK. 1997. ARN polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 15-22.

Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.*

Sánchez-Pulido L, Rojas AM, Wely KH, Martinez AC, Valencia A. 2004. SPOC: A widely distributed domain associated with cancer, apoptosis and transcription. *BMC Bioinformatics* 5: 91-99.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104–108.

Turner S, Sieburth LE. 2003. *Vascular Patterning.* The Arabidopsis Book2:e0073. doi:*10.1199/tab.0073.*

Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW, Amasino RM. 2001. FPA, a Gene Involved in Floral Induction in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. *The Plant Cell* 13: 1427–1436

Smale ST. 1997. Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochemical and Biophysical Acta* 1351: 73-88.

Vázquez Chimalhua E. 2012. *Utilización de un sistema de tres híbridos en Saccharomyces cerevisiae para el análisis de interacciones de proteínas con la región líder del ARN del gen sacarosa fosfato sintasa de arroz (sps1).* Tesis profesional de Maestría en Ciencias, Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.

White RJ. 2001. *Gene transcription.* Blackwell Science, Glasgow UK. 273 pp.

Wiellette EL, Harding KW, Mace KA, Ronshaugen MR, Wang FY, McGinnis W. 1999. Spen encodes an RNP motif protein that interacts with Hox pathways to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development* 126: 5373-5385.

Zhu Q, Dabi T, Lamb C. 1995. TATA box and Initiator functions in an accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro. *The Plant Cell* 7:1681-1689.