CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTIPICA DE MUTANTES APC5 DE *Arabidopsis thaliana*

LINA ALEJANDRA OSORIO ACOSTA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PAMPLONA

2024

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTIPICA DE MUTANTES APC5 EN *Arabidopsis thaliana.*

LINA ALEJANDRA OSORIO ACOSTA

Trabajo de grado como requisito para optar al título de Microbióloga

Nubia Barbosa Eloy, PhD

Orientador

Ramon Ovidio García, PhD.

Co Orientador

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

PAMPLONA

2024

Nota de Aceptación

_____

_____

_____

_____

Tutor Académico

_____

Jurado

_____

Jurado

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia, por ser ese apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por inspírame a ser una mejor persona y amar lo que soy.

A mi madre le agradezco por su amor infinito, por mover cielo, mar y tierra por mí; por siempre apoyarme, orientarme en el camino. Por enseñarme el valor de ser una persona independiente y dedicada en la vida. Tu amor, diciplina me han dado la inspiración para luchar y seguir mis sueños por más locos que sean.

AGRADECIMIENTOS

Este es un día muy especial para mí, pues he terminado uno de los objetivos propuestos en mi vida, mi trabajo de grado. Este logro es el fruto de mucho trabajo, constancia, responsabilidad y dedicación. Pero no lo habría conseguido sin la ayuda de las personas que me apoyaron en este proceso.

Primeramente, quiero agradecer a mi madre, que me dio su apoyo moral y económico en esta etapa de mi vida, me apoyo en la decisión de aventurarme a realizar mi pasantía en Brasil. Gracias a su esfuerzo, dedicación y amor nunca me faltó nada. Tu amor siempre me calmo y me mantuvo firme en los momentos difíciles de mi vida, te agradezco y te amo infinitamente con todo mi ser.

A mis hermanos Andrés y David, les agradezco profundamente por los hermosos momentos compartidos, llenos de sonrisas, palabras de aliento y amor incondicional. Espero seguir siendo para ustedes un ejemplo de que, con dedicación y amor, los sueños pueden hacerse realidad. Su compañía y apoyo han sido una inspiración constante en mi camino

A Kevin Castro y su familia, mi más profundo agradecimiento por abrirme las puertas de su hogar en un momento crucial de esta etapa de mi vida. Su generosidad al brindarme cariño, y el cálido refugio de un hogar me hicieron sentir como parte de su familia. Gracias por enseñarme el valor de la paciencia, con su ejemplo la importancia de dar al prójimo de manera desinteresada. Su apoyo y compañía han dejado una huella imborrable en mi camino.

A mis amigas Yuliana, Yesika, Yenifer, Juliana, al grupo 'Familia'; a mi prima Liz, les expreso mi más sincero agradecimiento por haber formado parte de este importante proceso en mi vida. Gracias por los momentos únicos que compartimos, donde el apoyo y el cariño siempre se hicieron presentes, brindándome confort y alegría. Cada uno de ustedes, con sus ocurrencias, iluminaba mis días haciéndolos más llevaderos. De cada uno me llevo aprendizajes, habilidades y experiencias valiosas, que atesoraré siempre.

A mis docentes, les expreso mi más profundo agradecimiento por todo el conocimiento compartido, su dedicación y el valioso tiempo que me brindaron a lo largo de este camino. Gracias a su guía y compromiso, pude no solo formarme profesionalmente, sino también adquirir las competencias y valores esenciales para enfrentar los desafíos de mi carrera. Su esfuerzo y pasión por la enseñanza han dejado una huella imborrable en mi desarrollo personal y profesional, por lo cual estaré eternamente agradecida.

A mis orientadores, Ovidio García y Nubia Eloy, les expreso mi sincero agradecimiento por su comprensión, paciencia y valiosa experiencia. Su orientación fue fundamental para mejorar mi trabajo de grado. Sus consejos oportunos, fueron un pilar esencial para culminar este importante capítulo de mi vida.

Finalmente, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Brasil por darme la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales en su tierra, una experiencia que no solo enriqueció mi formación, sino que también me permitió vivir momentos únicos y conocer a personas maravillosas. A todas aquellas personas que me hicieron sentir parte de su país, gracias por su calidez y generosidad. En especial, a Perla Oliveira, por su inigualable cariño y constante acompañamiento, que hicieron de esta etapa una de las más significativas de mi vida y afortunada por cada experiencia vivida en este camino

Gracias a todos por ser parte de este sueño hecho realidad. Espero seguir contando con su apoyo y amistad en el futuro. Los llevo en mi corazón.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 19
2. JUSTIFICACIÓN 22
3. OBJETIVOS 24
3.1 Objetivo general 24
3.2 Objetivos específicos 24
4. MARCO TEÓRICO 25
4.1 Marco Conceptual 25
4.1.1 Ciclo Celular 25
4.1.2 Regulación Del Ciclo Celular 27
4.1.3 APC/C 27
4.1.4 El Gen APC5 (AT1G06590) Y SALK_024997 29
4.1.5 *Arabidopsis thaliana* 30
4.1.6 Proyecto SALK T-DNA 31
4.1.8 *Agrobacterium* spp 32
4.1.9 T-DNA 33
4.1.10 *In Silico* 36
4.2 Marco Referencial 37
4.3 Marco Legal 39
5. METODOLOGÍA 40
5.1 Capítulo 1: Identificación mediante PCR gel genotipo de las plantas SALK_024997 40
5.1.1 Elección y obtención de la línea de plantas 40
5.1.2 Crecimiento de las plantas 40
5.1.2.1 Preparación de sustratos. 40
5.1.2.2 Siembra de semillas. 40

5.1.2.3 Condiciones de crecimiento. 40
5.1.3 Extracción de ADN genómico de las plantas SALK_024997 41
5.1.5 Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR) para el genotipado de las plantas. 42
5.2 Capítulo 2: Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Transcripción Inversa Cuantitativa (RT-qPCR) 45
5.2.1 Cultivo *In Vitro* 45
5.2.1.1 Esterilización de las semillas. 45
5.2.1.2 Inoculación de las semillas. 45
5.2.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Transcripción Inversa Cuantitativa (RT-qPCR) 46
5.2.2.1 Extracción de RNA. 46
5.2.2.2 Tratamiento con DNAsa. 47
5.2.2.3 Purificación de RNA total. 47
5.2.2.4 Cuantificación del RNA. 47
5.2.2.5 Síntesis de cDNA. 47
5.2.2.6 Cuantificación del cDNA. 48
5.2.2.7 Preparación de la placa para la RT-qPCR. 48
5.3 Capítulo 3: Análisis de la ubicación tisular del gen APC5 49
5.3.1 Expresión del gen APC5 en plantas con GUS 49
5.3.1.1 Siembra de las plantas GUS. 49
5.3.1.2 Protocolo GUS. 49
5.3.2 Predición In *Silico* del gen APC5 50
5.4 Capítulo 4: Efectos fenotípicos de la interrupción del gen APC5 50
5.4.1 Medición de la longitud radicular 50
5.4.2 Análisis de viabilidad embrionaria 50
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 52

7.1 Caracterización del genotipo de las plantas SALK_024997 52

7.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Transcripción Inversa Cuantitativa (RT-qPCR) 55

7.3 Análisis de la expresión tisular del gen APC5 *In Vivo*, *In Vitro* E *In Silico*, en *Arabidopsis thaliana* 57

7.4 Efectos fenotípicos de la interrupción del gen APC5 62

8. CONCLUSIONES 68

9. RECOMENDACIONES 70

10. REFERENCIAS 71

11. ANEXOS 82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Estructura teórica del APC/C* 28
Figura 2. *Representación del gen APC5 (AT1G06590) con la inserción del T-DNA*. 29
Figura 3. *Representación del plásmido Ti, con la ubicación del T-DNA* 35
Figura 4. *Representación de la amplificación del gen APC5 mediante primers específicos para el gen silvestre (WT) y la inserción de T-DNA* 43
Figura 5. *Representación teórica de los resultados de la PCR: bandas de inserción del T-DNA y banda silvestre.* 44
Figura 6. *Electroforesis del DNA y PCR GAPDH* 52
Figura 7. *Amplificaciones de las PCR para el gen WT y T-DNA de las 16 muestras* 54
Figura 8. *Expresión del gen APC5 mediante ensayo GUS en Arabidopsis thaliana* 59
Figura 9. *Expresión in silico del gen APC5 en Arabidopsis thaliana.* 60
Figura 10. *Expresión in silico del gen APC5 en Arabidopsis thaliana (Nivel máximo del 5%)*. 61
Figura 11. *Resultados de la medición longitudinal radicular.* 62
Figura 12. *Visualización de los óvulos dentro de las silicuas* 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Primers 1-2 utilizados para genotipificar y amplificar la banda WT y los primers 2-3 amplifican la banda del T-DNA de la SALK_024997.* 44

Tabla 2. *Cronograma de actividades realizadas durante las prácticas profesionales* 51

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. *Análisis de transcripción del gen APC5 mediante RT-qPCR* 57
Gráfico 2. *Longitud Radicular*. 63
Gráfico 3. *Viabilidad embrionaria de plantas SALK_024997 y WT*..... 66

GLOSARIO

APC/C (Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma): Ubiquitina ligasa E3 multiproteica que regula la transición de la metafase al anafase y la salida de la mitosis mediante la degradación de proteínas específicas.

APC5: Subunidad del APC/C, fundamental para la estabilidad del complejo y la coordinación de procesos del ciclo celular.

T-DNA (Transfer DNA): Segmento de ADN transferido por *Agrobacterium tumefaciens* al genoma de plantas, utilizado para la generación de mutantes mediante inserción génica.

SALK_024997: Línea mutante de *Arabidopsis thaliana* con una inserción de T-DNA en el gen APC5, generada como parte del Proyecto SALK T-DNA.

Mutante heterocigótico: Individuo con un alelo silvestre y un alelo mutante en un gen específico, lo que resulta en una función parcial del gen.

Mutante homocigótico: Individuo con ambos alelos mutantes en un gen, frecuentemente asociado con pérdida total de la función genética.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Técnica molecular que permite la amplificación específica de fragmentos de ADN para su estudio genotípico.

RT-qPCR (Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction): Técnica utilizada para cuantificar la expresión génica mediante conversión de ARN a ADN complementario y amplificación en tiempo real.

Ensayo GUS: Técnica que utiliza la enzima β-glucuronidasa para detectar actividad génica, generando tinción azul en tejidos con expresión activa.

Arabidopsis thaliana: Planta modelo en estudios genéticos y moleculares debido a su genoma pequeño, rápido ciclo de vida y recursos genéticos disponibles.

RESUMEN

La regulación del ciclo celular es esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos eucariotas. El complejo promotor del anafase/ciclosoma (APC/C) es una ubiquitina ligasa E3 clave que gobierna las transiciones del ciclo celular mediante la degradación de proteínas reguladoras. Este estudio investiga los efectos de la alteración del gen APC5, que codifica una subunidad del complejo APC/C, en *Arabidopsis thaliana*. La investigación se centró en plantas de la línea SALK_024997, caracterizadas por una inserción de T-DNA en el intrón 9 del gen APC5. El diseño experimental consistió en la caracterización genotípica de 16 plantas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar la presencia de la inserción de T-ADN, seguida de análisis fenotípicos que incluyeron la medición de la longitud de la raíz y la evaluación de la viabilidad embrionaria. Además, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) para cuantificar los niveles de expresión del gen APC5, y se emplearon ensayos histoquímicos GUS combinados con análisis *in silico* para determinar su expresión espacial. Los resultados confirmaron que 15 de las plantas eran heterocigotas para la inserción de T-ADN, una era silvestre para el gen y no se encontraron mutantes homocigotos viables, lo que subraya el papel esencial de APC5. Los análisis de expresión génica revelaron una ligera reducción en los niveles de transcripción de APC5 en plantas heterocigotas. Las evaluaciones fenotípicas no mostraron diferencias significativas en la longitud de la raíz; Sin embargo, la viabilidad embrionaria se redujo notablemente al 50 % en las plantas mutantes, en comparación con el 97 % observado en los controles de tipo silvestre. El análisis de expresión espacial demostró que APC5 está activo en raíces, hojas y tejidos reproductivos, lo que sugiere su participación en diversos procesos de desarrollo. Esta investigación destaca el papel fundamental de APC5 en *Arabidopsis thaliana*, particularmente en

el desarrollo reproductivo, y proporciona información crucial para futuros estudios sobre las funciones especializadas del complejo APC/C en plantas.

ABSTRACT

Cell cycle regulation is essential for the growth and development of eukaryotic organisms. The anaphase promoter/cyclosome complex (APC/C) is a key E3 ubiquitin ligase that governs cell cycle transitions by degrading regulatory proteins. This study investigates the effects of disruption of the APC5 gene, which encodes a subunit of the APC/C complex, in Arabidopsis thaliana. The research focused on plants of the SALK_024997 line, characterized by a T-DNA insertion in intron 9 of the APC5 gene. The experimental design consisted of genotypic characterization of 16 plants by polymerase chain reaction (PCR) to identify the presence of the T-DNA insertion, followed by phenotypic analyses including root length measurement and embryo viability assessment. In addition, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to quantify APC5 gene expression levels, and GUS histochemical assays combined with in silico analysis were used to determine its spatial expression. The results confirmed that fifteen (15) of the plants were heterozygous for the T-DNA insertion, one was wild-type for the gene and no viable homozygous mutants were found, underlining the essential role of APC5. Gene expression analyses revealed a slight reduction in APC5 transcript levels in heterozygous plants. Phenotypic evaluations showed no significant differences in root length; however, embryo viability was markedly reduced to 50 % in mutant plants, compared to 97 % observed in wild-type controls. Spatial expression analysis showed that APC5 is active in roots, leaves, and reproductive tissues, suggesting its involvement in diverse developmental processes. This research highlights the fundamental role of APC5 in Arabidopsis thaliana, particularly in reproductive development, and provides crucial information for future studies on the specialized functions of the APC/C complex in plants.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares, como las plantas, requieren procesos de regulación precisos para su desarrollo. El ciclo celular constituye un mecanismo fundamental que modula el crecimiento celular mediante etapas subsecuentes organizadas y sincronizadas, permitiendo la generación de nuevas células. Este proceso implica una serie de reacciones moleculares que aseguran la proliferación celular en diversos tejidos vegetales.

Arabidopsis thaliana emerge como una planta modelo ideal para estudios genéticos y moleculares del desarrollo vegetal, destacando por su simplicidad genética y breve ciclo de vida. La secuenciación completa de su genoma ha impulsado múltiples proyectos encaminados a desentrañar las funciones génicas, como el proyecto SALK T-DNA, el cual genera mutaciones indexadas en el genoma, facilitando la identificación de genes y sus funciones específicas. Este proyecto utiliza el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar plantas de la colección Alonso/Crosby/Ecker (SIGnAL, 2024).

La exhaustiva caracterización genómica ha facilitado estudios genéticos y moleculares precisos, permitiendo el uso de *A. thaliana* como modelo de mutantes y transgénicos. Esto ha sido crucial para investigaciones en diversas áreas como biología del desarrollo, bioquímica y agronomía. Los estudios han abarcado aspectos morfogenéticos, desarrollo de estructuras vegetales (raíces, hojas y flores), y respuestas a estímulos ambientales, contribuyendo significativamente al avance de la ciencia básica y la mejora de la producción agrícola.

El ciclo celular comprende dos etapas fundamentales: la interfase (compuesta por las fases G1, S y G2) y la fase mitótica (M), que orquestan el desarrollo de nuevas células. Cada

etapa presenta puntos de regulación críticos que condicionan la progresión al siguiente estadio, asegurando que los procesos de control se ejecuten correctamente. Este proceso se controla mediante quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y ciclinas, que forman complejos específicos en distintas fases del ciclo celular, promoviendo reacciones esenciales como la replicación del ADN y la mitosis (Qi y Zhang, 2020). Además, el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) regula la progresión del ciclo celular mediante la degradación de proteínas clave, como ciclinas y securinas, asegurando que la progresión sea unidireccional e irreversible (Eloy *et al*., 2015; Willems y Veylder, 2022). Cada etapa presenta puntos de regulación críticos que condicionan la progresión al siguiente estadio, asegurando que los procesos de control se ejecuten correctamente.

Entre los complejos reguladores del ciclo celular destaca el Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma (APC/C), una E3 ligase crucial para la progresión del ciclo celular. Este complejo promueve la transición al anafase mediante la degradación de proteínas como la securina, lo que libera la separasa y permite la segregación de cromátidas hermanas. Más allá de su función en el ciclo celular, estudios recientes han señalado el papel del APC/C en procesos como la regulación metabólica y el desarrollo de órganos (Heyman y Veylder, 2012).

En *Arabidopsis thaliana*, el APC/C está compuesto por 14 subunidades, entre las cuales APC5 actúa como un componente estructural crítico, desempeñando un papel esencial en la estabilidad y organización del complejo.

Comprender las funciones de APC5 es fundamental, ya que su interrupción podría afectar procesos biológicos clave, como la longitud radicular, la viabilidad embrionaria y la expresión espacial del complejo APC/C en tejidos específicos. Estos análisis fenotípicos no solo

contribuirán al entendimiento de los mecanismos de regulación proteolítica mediados por el APC/C, sino que también permitirán establecer vínculos entre este complejo y el desarrollo vegetal, aportando al conocimiento de procesos moleculares esenciales en eucariotas.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar funcionalmente el gen *APC5* de *Arabidopsis thaliana*. Esto incluye identificar alteraciones fenotípicas derivadas de su deleción, generadas por el Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk (SIGnAL) en el marco del proyecto SALK T-DNA. Adicionalmente, se busca explorar cómo esta regulación mediada por APC/C podría estar relacionada con procesos de desarrollo vegetal poco entendidos, abriendo nuevas perspectivas sobre la interacción entre regulación proteolítica y morfogénesis en plantas.

2. JUSTIFICACIÓN

El ciclo celular es un proceso fundamental en todos los organismos y su regulación precisa es esencial para el crecimiento y desarrollo adecuados. En las plantas, el Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma (APC/C) desempeña un papel crucial en la degradación de proteínas reguladoras a través de la ubiquitinación, controlando eventos clave del ciclo celular, como la transición de la metafase al anafase. A pesar de que estudios en *Arabidopsis* han revelado que los componentes del APC/C están conservados en plantas y organismos eucariotas, evidencias recientes sugieren que el APC/C tiene funciones adicionales exclusivas en el desarrollo vegetal, además de su papel en la regulación del ciclo celular.

La interrupción y caracterización funcional de genes es una estrategia clave para desentrañar sus roles biológicos, especialmente en organismos modelo como *A. thaliana*. En este contexto, la presente investigación se enfoca en el estudio del gen APC5, una subunidad del Complejo Promotor de la Anafase (APC/C). Este complejo es una ubiquitina ligasa E3 fundamental en organismos eucariotas, conocido por su participación en la regulación del ciclo celular mediante la proteólisis mediada por ubiquitina. Sin embargo, en plantas, el papel específico de APC5 en el desarrollo, el crecimiento y la adaptación sigue siendo desconocido debido a la ausencia de estudios publicados sobre esta subunidad en el contexto vegetal.

El análisis del mutante SALK_024997, que presenta una interrupción por inserción de T-DNA en el gen APC5, permite abordar estas lagunas de conocimiento. Este mutante forma parte de la biblioteca de líneas mutantes generadas por el Proyecto Salk T-DNA, un recurso científico diseñado para facilitar estudios de genómica funcional en *A. thaliana*. Dicho proyecto utilizó el sistema de transferencia de ADN-T mediante *Agrobacterium tumefaciens*, un vector natural para la integración estable de ADN en el genoma de plantas. Este método no solo asegura la

aleatoriedad de las inserciones, sino que también ha permitido a la comunidad científica contar con herramientas genéticas estandarizadas y ampliamente disponibles para la caracterización de genes en este modelo vegetal.

La elección de *A. thaliana* como modelo de organismo se basa en su genoma completamente secuenciado, ciclo rápido de vida y la riqueza de herramientas genéticas disponibles. Estas características hacen de esta especie una plataforma ideal para extrapolar hallazgos relevantes a otras plantas, incluidas especies de interés agrícola.

El impacto de este trabajo se extiende más allá de la caracterización básica de un gen. Al explorar funciones no descritas del complejo APC/C en plantas, esta investigación tiene el potencial de abrir nuevas líneas de estudio en áreas como la regulación del ciclo celular vegetal, la adaptación a condiciones ambientales cambiantes y el diseño de plantas con características agronómicas mejoradas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente y funcionalmente el linaje SALK_024997 de *Arabidopsis thaliana,* que presentan la inserción de T-DNA en el gen APC5, evaluando sus efectos fenotípicos en la raíz y la flor de la planta.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar el genotipo de las cepas SALK_024997 mediante PCR para determinar la presencia o ausencia de la inserción del ADN-T en las cepas mutantes.
- Cuantificar la expresión del gen APC5 en las plantas mutantes mediante RT-qPCR.
- Visualizar la ubicación de la proteína codificada por APC5 en las raíces laterales y flores de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar el efecto fenotípico de la interrupción del gen APC5 sobre la viabilidad embrionaria y el crecimiento radicular *in vitro.*

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Marco Conceptual

4.1.1 Ciclo Celular

El ciclo celular en las plantas es un proceso fundamental para la producción de nuevas células, esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este proceso está influenciado por varios factores internos y externos, incluyendo señales hormonales y ambientales; El ciclo celular está compuesto por cuatro fases principales: G1, S, G2 y M, con puntos de control críticos en G1/S y G2/M. El avance a través de estos puntos de control depende de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y sus subunidades reguladoras conocidas ciclinas (Qi y Zhang, 2021, Gopal Banerjee *et al*., 2021)

La fase G1 del ciclo celular da lugar al crecimiento y a la preparación de la célula para la replicación del ADN en la fase S. Durante esta fase, ocurren varios procesos importantes, como el aumento del tamaño de la célula, la síntesis de orgánulos y proteínas necesarias para la replicación del material genético y la división celular (Lataster, L *et al*., 2023). Además, en esta fase se encuentran puntos de regulación donde se decide si continuar con la división celular o entrar en un estado de quiescencia (Pennycook y Barr, 2020).

En la fase S ocurre la replicación del ADN y la preparación para la división celular. Durante esta fase, se lleva a cabo la síntesis de ADN, que duplica el material genético para asegurar que cada célula hija reciba una copia completa del genoma y evitar errores o inestabilidades genómicas (Lin y Prasanth, 2021) (Lee y Osley, 2021).

En la fase G2 del ciclo celular se produce la reparación de rupturas de la doble cadena del ADN y la preparación para la división celular en la mitosis. En este punto, la célula verifica que

el ADN se haya replicado correctamente y se haya reparado adecuadamente en caso de daños ocurridos durante esta fase, con el fin de evitar la producción de mutaciones. Durante la fase G2, las células utilizan principalmente la recombinación homóloga para reparar rupturas de doble hebra en el ADN, un proceso que es más preciso que la unión de extremos no homólogos, la cual también puede ocurrir en esta fase. (Mohseni-Salehi *et al.*, 2020)

La fase M, también conocida como mitosis, es crucial para la división celular y la formación de nuevos tejidos, e implica la división del núcleo y la distribución equitativa de los cromosomas a las células hijas. En la mitosis, la división del núcleo celular en dos núcleos hijos está regulada por la actividad temporal de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), las quinasas Aurora y el complejo promotor del anafase (Francis, 2007). Las ciclinas de tipo A y B, junto con las CDKs, son fundamentales para asegurar la correcta progresión del proceso de división celular durante la mitosis (Veylder *et al*., 2003; Burssens *et al.*, 1998). Dentro de la fase M, se distinguen otras cuatro fases: la profase, en la cual la célula descompone algunas estructuras y construye otras, como el huso mitótico, y se produce la condensación de los cromosomas; la metafase, donde el huso mitótico captura todos los cromosomas y los alinea en el centro de la célula, en la placa metafásica, preparándose para la división; la anafase, en la que las cromátides hermanas se separan y son arrastradas a los polos opuestos de la célula; y la telofase, en la que el huso mitótico se descompone, se forman dos nuevos núcleos, uno para cada conjunto de cromosomas, y las membranas nucleares y los nucléolos reaparecen. Finalmente, en la citocinesis, se produce la división del citoplasma y de la pared celular, en el caso de las plantas, para formar dos nuevas células con el mismo juego de cromosomas de la célula madre (Khan Academy, s.f).

4.1.2 Regulación Del Ciclo Celular

La regulación del ciclo celular es un proceso fundamental que garantiza la proliferación celular ordenada y la integridad del genoma. Algunos reguladores, como las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), ciclinas, inhibidores de CDK, el complejo APC y los factores de transcripción E2F, desempeñan roles cruciales en la coordinación de la división celular, el crecimiento y el metabolismo. Las CDKs, junto con sus subunidades reguladoras conocidas como ciclinas, son esenciales para la progresión del ciclo celular y también controlan directamente la maquinaria de transcripción basal, incluida la actividad de la ARN polimerasa II y III (Enserink y Chymkowitch, 2022).

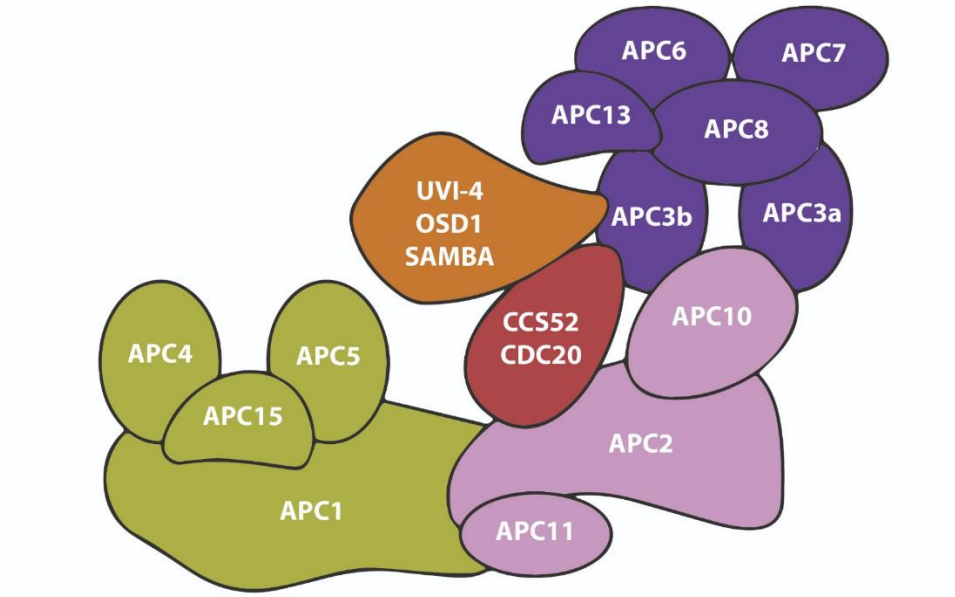
En las plantas, las fitohormonas son esenciales en la regulación del ciclo celular, y las citoquinasas (CK) son reconocidas por activar la proliferación celular. El factor de transcripción *Cytokinin-Responsive Growth Regulator* (CKG) media la regulación dependiente de CK de la expansión celular y la progresión del ciclo celular en *A. thaliana*, promoviendo la entrada en la fase S del ciclo celular y el aumento del tamaño celular. Además, la sinergia entre diferentes fitohormonas es crucial para la progresión del ciclo celular y la adaptación a factores ambientales. (Akie Shimotohno *et al.*, 2021).

4.1.3 *APC/C*

El complejo promotor del anafase/ciclosoma (APC/C) es una ligasa de ubiquitina E3 altamente conservada en eucariotas, esencial para la regulación del ciclo celular. Su principal función es la ubiquitinación y posterior degradación de proteínas específicas, permitiendo transiciones clave en las fases del ciclo celular, como la metafase-anafase y la salida de la mitosis. Aunque su composición y funciones son conservadas en organismos multicelulares, los objetivos específicos y las adaptaciones funcionales muestran variaciones significativas según la

especie, particularmente en plantas, donde el APC/C desempeña roles únicos en el desarrollo y la diferenciación celular (Bentley *et al*., 2002).

Figura 1. *Estructura teórica del APC/C*



Nota: Tomada y rediseñada de: Full article: The Role of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Plant Growth. Saleme *et al*., 2021.

En plantas, este complejo no solo desempeña funciones similares a las observadas en otros eucariotas, sino que también está involucrado en procesos específicos como la poliploidización, la diferenciación celular, el desarrollo vascular, la gametogénesis y la regulación de la señalización hormonal (Wang *et al*., 2012),(Wang *et al*., 2013).

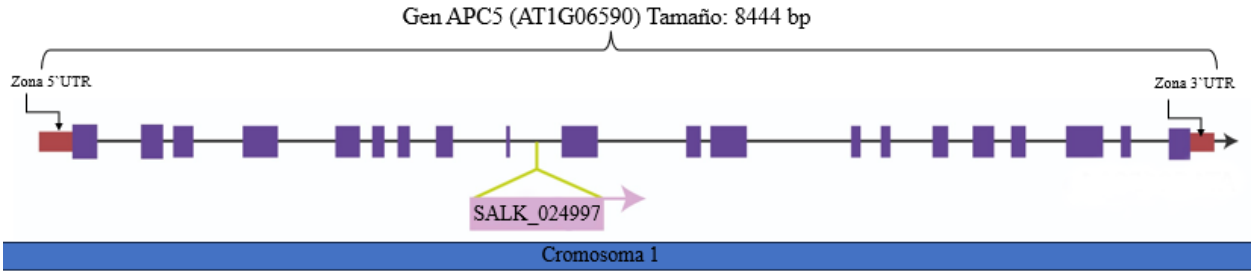
Reguladores negativos específicos de plantas, como las proteínas SAMBA y GIGAS CELL1 (GIG1), modulan su actividad en contextos como el control del tamaño de los órganos y la progresión mitótica (Eloy *et al*., 2012). Además, el APC/C juega un papel en la respuesta a interacciones simbióticas y estrés ambiental, lo que resalta su relevancia tanto en el desarrollo

como en la adaptación de las plantas, constituyendo una prometedora área de investigación para mejorar el rendimiento y la resiliencia de los cultivos. Aunque se han identificado ciertas diferencias en la organización genómica de APC/C entre especies como *A. thaliana*, arroz y álamos, su papel en la regulación del ciclo celular y el desarrollo vegetal parece estar ampliamente conservado, con especialización adaptativa en ciertas especies para responder a demandas específicas de desarrollo y medioambientales (Acquaviva y Pines, 2006; M. deF Lima *et al*., 2010; Saleme *et al*., 2021)

4.1.4 *El Gen APC5 (AT1G06590) Y SALK_024997*

El gen APC5 en *A. thaliana* se encuentra localizado en el cromosoma 1, entre las posiciones 2016306 – 2024749 bp, este gen tiene un tamaño de 8444 bp, y una proteína que codifica una longitud de 916 aminoácidos. Cuenta con 20 exones y 19 intrones, su zona 5`UTR está ubicada entre 1-244 pb, y la zona 3`UTR a 8247-8444 pb, respecto al tamaño del gen (*TAIR - Arabidopsis*, 2024).

Figura 2. *Representación del gen APC5 (AT1G06590) con la inserción del T-DNA.*



Nota: Esquema que ilustra la localización de la inserción del T-DNA en el intrón 9 del gen APC5. Este gráfico permite visualizar cómo el evento de inserción podría interrumpir la transcripción y, por ende, la función del gen en las plantas mutantes. Adaptada de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) por (JBrowse, 2024.).JBrowse Chr1:2015468..2024654.

El gen APC5 es interrumpido por la inserción del T-DNA con un tamaño aproximado entre 561 pb a 861 pb en las coordenadas 2021077 -2021113 (Anexo 1), respecto al cromosoma 1 y se inserta en el intrón 9 del gen (*TAIR - Arabidopsis*, 2024.-b) como se ilustra en la Figura 2, (*SALK_024997.29.40. NCBI*, 2024.).

4.1.5 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta modelo fundamental en la biología vegetal, utilizada ampliamente en la investigación de procesos fisiológicos, celulares, moleculares y químicos. Como una especie de eudicotiledónea del orden *Brassicales* perteneciente a la familia *Brassicaceae* (LFP Lima *et al* ., 2024; NCBI, 2024), se caracteriza por ser una planta herbácea anual de pequeño tamaño, generalmente no superior a 20-25 cm de altura (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Su genoma, pequeño y completamente caracterizado, ha permitido avances significativos en la genética, biología y fisiología vegetal. Se considera una planta endogámica capaz de autopolinizarse (Eguiarte *et al* ., 2003), con un sistema radicular pivotante, hojas pubescentes en roseta basal y flores blancas pequeñas típicas de su familia. Nativa de Europa y Asia (*Arabidopsis thaliana*, s.f.), crece en diversos ambientes como praderas, bordes de caminos y claros de bosques, completando su ciclo de vida en aproximadamente 6-8 semanas (Cuesta, 2012). Su estructura morfológica simple, junto con su alta adaptabilidad y tolerancia a condiciones ambientales variables, la convierte en un modelo experimental único, especialmente valorado por su corto ciclo de vida, eficiente reproducción y facilidad de cultivo en laboratorio (Cuesta, 2012).

El conocimiento del genoma secuenciado ha permitido revelar que *A. thaliana* cuenta con un genoma dinámico enriquecido por la transferencia lateral de genes, lo que ha proporcionado información sobre los procesos conservados presentes en la mayoría de las plantas. Además, se

han identificado cinco cromosomas (2n=10) (Eguiarte *et al*., 2003) y un tamaño total del genoma de 119 mega pares de bases (Mb) (NCBI, 2024). Esto ha permitido a los científicos realizar diferentes modificaciones e inserciones en el genoma para evaluar, medir y replicar en otras plantas con múltiples fines, como resistencia, inmunidad, rápido crecimiento y mayor producción de frutos, entre otros.

Unos de los linajes de *A. thaliana* más usados en la investigación es el ecotipo Columbia-0 (Col-0), es ampliamente utilizado como organismo modelo en biología vegetal debido a su genoma pequeño, completamente secuenciado, y a su facilidad de manipulación genética. Col-0 es la referencia estándar para estudios genéticos y genómicos, gracias a su alta homogeneidad genética, lo que reduce la variabilidad experimental y permite identificar funciones génicas con precisión (O'Malley et al., 2015).

4.1.6 *Proyecto SALK T-DNA*

Los avances en genómica funcional han proporcionado a los científicos herramientas fundamentales para comprender las funciones génicas en diversos organismos. *A. thaliana* se ha consolidado como un modelo vegetal central en estas investigaciones, gracias a sus características distintivas: un genoma compacto, un ciclo de vida acelerado y una amplia disponibilidad de recursos genéticos.

El Proyecto Salk T-DNA representa un hecho clave en la investigación genómica vegetal. Esta iniciativa innovadora generó millares de líneas mutantes de *Arabidopsis* mediante la inserción de T-DNA, una estrategia que permite interrumpir genes específicos y analizar sus funciones a través de los fenotipos resultantes (SIGnAL. 2024.). El proyecto ha sido crucial para que los investigadores puedan identificar y caracterizar genes responsables de procesos

biológicos fundamentales, incluyendo el desarrollo, el metabolismo y las respuestas a factores de estrés ambiental.

Entre sus principales contribuciones, el Proyecto Salk T-DNA se distingue por: La generación sistemática de mutantes genéticos, el desarrollo de una base de datos pública (TAIR) (Huala *et al.*, 2001) con información detallada sobre inserciones de T-DNA y su capacidad para proporcionar herramientas genéticas a la comunidad científica internacional. Así, a partir de esta metodología, se ha transformado radicalmente el análisis genómico en plantas, consolidándose como un recurso esencial para estudios funcionales y aplicaciones en biotecnología vegetal.

En este contexto, la presente investigación se apoya en el uso de mutantes de *A. thaliana* para determinar la presencia de inserciones de T-DNA en el gen APC5, evaluar su impacto en características fenotípicas como la longitud radicular, la viabilidad embrionaria, y analizar la localización espacial de la expresión de este gen; de esta manera, profundizar en la comprensión de mecanismos moleculares específicos, destacando el potencial de estas aproximaciones para el avance científico y la eventual mejora de cultivos.

4.1.8 *Agrobacterium spp.*

Agrobacterium spp. es un bacilo gramnegativo de aproximadamente 0,6-1,0 µm por 1,5-3,0 µm, que no forma esporas y posee flagelos perítricos. Generalmente, es aeróbico, utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones; sin embargo, se sabe que algunos géneros son anaeróbicos y pueden utilizar el nitrato como fuente (Andrade *et al*., 2003). Dentro de este grupo, se encuentran los siguientes géneros*: A. tumefaciens, A. radiobacter, A. rhizogenes y A. rubi* (López, 1991).

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo conocida por su capacidad de causar la enfermedad de la agalla de la corona en las plantas mediante transferencia horizontal de genes (Brown *et al*., 2023). Esta capacidad única la ha convertido en una herramienta valiosa en biotecnología vegetal y en un organismo modelo para estudiar diversos procesos biológicos. La penetración en la planta se produce a través de heridas en las raíces o el tallo, causadas por herramientas de cultivo, insectos, nematodos, injertos, entre otras. Una vez que *A. tumefaciens* entra en la planta, coloniza la herida, se divide y se disemina intracelularmente, para luego transmitir su plásmido, el cual se integra en el genoma de la planta, modificándolo (Gan y Savka, 2018).

A. tumefaciens se utiliza ampliamente para la transformación genética de plantas, ya que esta bacteria tiene la capacidad de reemplazar los genes inductores de tumores en el ADN-T con los genes deseados, introduciendo así nuevos rasgos en las plantas. Este método es fundamental y se emplea con frecuencia en la biología molecular de las plantas y en la biotecnología agrícola (Khan *et al*., 2022; Escobar y Dandekar, 2003). El fragmento de ADN de *A. tumefaciens,* conocido como T-DNA, se transfiere junto con las proteínas Vir, que modulan la expresión de los genes del huésped para facilitar la transformación y suprimir los mecanismos de defensa de la planta.

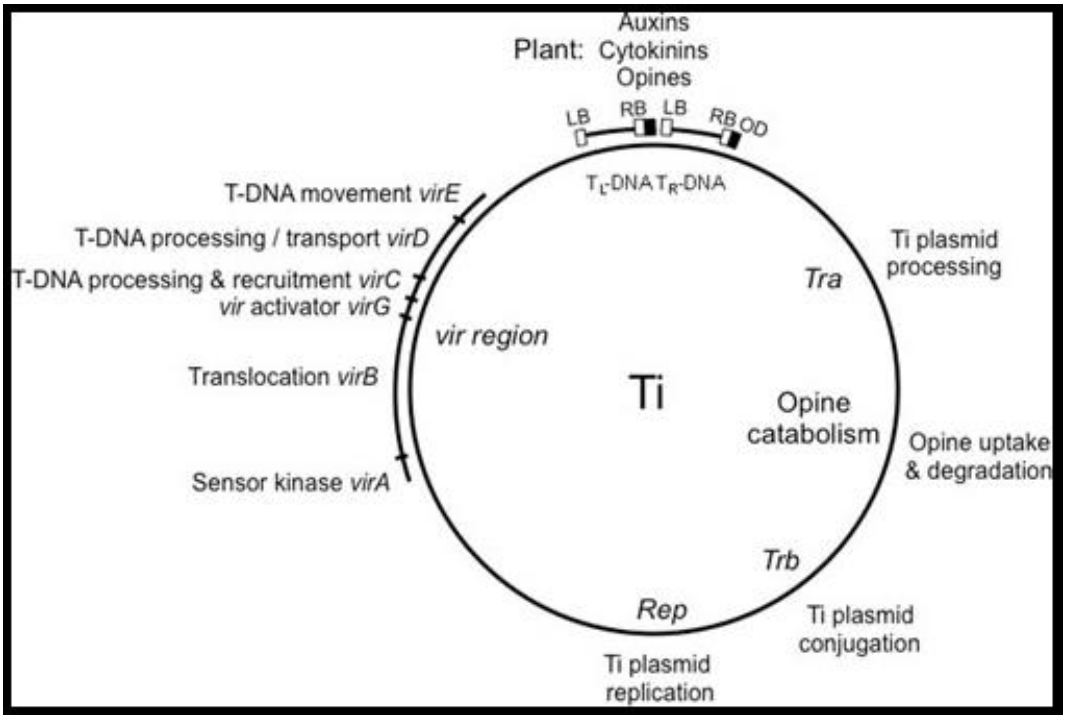
4.1.9 *T-DNA*

El T-DNA (ADN de transferencia) representa un mecanismo molecular sofisticado de transferencia genética empleado por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que ha revolucionado las técnicas de ingeniería genética vegetal. Este segmento de ADN, ubicado en el plásmido Ti (Figura 3), posee características únicas que permiten su transferencia e integración en el genoma de células vegetales huéspedes.

La región T-DNA se caracteriza por estar delimitada por dos secuencias altamente conservadas denominadas bordes izquierdo y derecho, cada uno de aproximadamente 25 pares de bases (Tzfira *et al*., 2013). Estos bordes, que no contienen información genética específica para su procesamiento, actúan como señales de reconocimiento fundamentales para el sistema de transferencia genética bacteriana. Entre estos bordes puede introducirse información genética con un tamaño aproximado de 10 a 20 kilopares de bases, susceptible de ser transferida e integrada en el genoma vegetal (Gordon y Christie, 2014).

El proceso de transferencia genética es orquestado por proteínas codificadas en los genes *vir* (virulencia), localizados en otra región del plásmido Ti. Destacan las proteínas VirD1 y VirD2, responsables de procesar el T-DNA mediante un corte preciso en sus bordes, generando un fragmento de ADN monocatenario (cadena T) (Martineau et al., 1994). La proteína VirD2 cumple un papel crítico al unirse covalentemente al extremo 5' del T-DNA, proporcionando protección durante su transporte e impulsando su posterior integración en el genoma vegetal (Gordon y Christie, 2014).

Figura 3. *Representación del* plásmido *Ti, con la ubicación del T-DNA*



Nota: Tomado de: https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.plas-0010-2013

La transferencia implica la conversión del ADN monocatenario en una estructura bicatenaria que se inserta aleatoriamente en el genoma del huésped. Es importante resaltar que el T-DNA no contiene elementos propios para su replicación, sino que porta genes capaces de modificar el metabolismo vegetal. Típicamente, estos genes están relacionados con la síntesis de fitohormonas como auxinas y citoquininas, así como con la producción de opiniones, estrategias que facilitan el establecimiento de *Agrobacterium* en el tejido infectado (Gordon y Christie, 2014).

Esta capacidad de reemplazar la región T-DNA original por fragmentos de ADN de interés ha transformado al plásmido Ti en una herramienta fundamental para la investigación biotecnológica y las aplicaciones agrícolas. Mediante esta técnica, los científicos pueden introducir genes específicos en plantas, permitiendo el desarrollo de cultivos con características

agronómicas mejoradas, resistencia a patógenos o mayores rendimientos (Gordon y Christie, 2014).

4.1.10 In Silico

La técnica *in silico* representa una herramienta esencial en la biología moderna, permitiendo el análisis, modelado y simulación de procesos biológicos mediante enfoques computacionales. En el caso específico de la plataforma ePlant, diseñada para el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, se facilita la integración de datos genómicos, transcriptómicos y funcionales en una interfaz interactiva y accesible. Esta plataforma emplea tecnologías avanzadas como la matriz Affymetrix ATH1, un microarreglo de expresión génica que permite evaluar la expresión de millas de genes simultáneamente. Los datos obtenidos son posteriormente normalizados utilizando el método *GeneChip Operating Software* (GCOS), lo que garantiza la precisión y comparabilidad de los resultados al corregir variaciones técnicas y mejorar la calidad de las señales detectadas (*ePlant*, 2024).

La matriz Affymetrix ATH1, contiene sondas complementarias a más de 22.000 genes, proporcionando un panorama detallado de la actividad transcripcional en diversas condiciones experimentales (Cambier, 2024; Thermofisher, 2024). Este enfoque, combinado con la normalización por GCOS, optimiza la interpretación de los datos al minimizar los aspectos técnicos y maximizar la relevancia biológica. Gracias a estas técnicas, la plataforma ePlant ofrece un marco robusto para investigar interacciones génicas, perfiles de expresión y patrones de regulación, posicionándose como una herramienta valiosa para la comprensión integral de los sistemas biológicos en plantas modelo (Sánchez y Teresa., 2019).

4.2 Marco Referencial

El crecimiento y desarrollo de las plantas son procesos fundamentales controlados por mecanismos altamente regulados, entre los cuales, se destaca el ciclo celular. Este proceso asegura la correcta proliferación y especialización de las células a través de una secuencia de eventos coordinados. Dentro de esta maquinaria, el Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma (APC/C) desempeña un papel crucial como una ligasa ubiquitina E3, encargada de marcar proteínas clave del ciclo celular para su degradación mediante el proteasoma 26S (Eloy *et al*., 2015). Dentro del APC/C encontramos subunidades con roles importante como APC5.

El papel específico de la subunidad 5 del Complejo Promotor de la Anafase (APC 5) no ha sido explorado hasta la fecha en plantas. Sin embargo, estudios realizados en otros organismos, como levaduras, mamíferos y *Drosophila melanogaster*, han proporcionado información valiosa sobre las posibles funciones de esta subunidad. En los apartados siguientes, se presentan investigaciones relevantes en estos modelos, que aportan evidencias sobre el papel crucial del APC/C y sus subunidades en la regulación del ciclo celular y otros procesos biológicos fundamentales, estableciendo una base para futuras investigaciones en el contexto de las plantas.

En levaduras el estudio realizado por Zachariae y colaboradores en 1998, indica que el complejo promotor del anafase (APC/C), se compone de al menos 12 subunidades, entre las que se encuentran las proteínas altamente conservadas Apc1p, Cdc16p, Cdc23p, Cdc26p y Cdc27p. A través de análisis proteómicos de alta resolución, identificaron cinco subunidades adicionales, incluyendo Apc2p, Apc5p y Apc11p, la cual posee un dominio RING-finger. Notablemente estas últimas tres subunidades se encontraron conservadas evolutivamente desde levaduras hasta

humanos, sugiriendo una función esencial en la regulación del ciclo celular eucariota (Zachariae *et al*., 1998).

La investigación realizada por Nadejda Koloteva-Levine y colaboradores ha identificado a APC5 como un componente que interactúa con la proteína de unión a poli(A), lo que sugiere un papel en la regulación de la traducción mediada por el sitio de entrada del ribosoma interno. Esta interacción es única ya que APC5 no posee un dominio clásico de unión a ARN, pero su sobreexpresión puede contrarrestar la activación de la traducción mediada por IRES con la estabilización estructural del complejo, facilitando interacciones críticas entre subunidades catalíticas y reguladoras (Nadejda Koloteva-Levine *et al*., 2023).

Bentley y sus colaboradores en el año 2002 realizaron un estudio sobre los mutantes de *Drosophila ida*, el cual se centra en entender el papel del gen *Ida* (*Imaginal Discs Arrested*), homólogo a APC5, en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. Los mutantes de ida presentan defectos mitóticos significativos, incluyendo aneuploidía y fallos en la degradación de ciertos sustratos del APC/C, lo que subraya la importancia de IDA/APC5 en la regulación de la mitosis y el desarrollo celular (Bentley *et al*., 2002) .

En humanos, el estudio realizado por (Melloy, 2020) identificó que las mutaciones en las subunidades del APC/C, incluyendo APC5, están asociadas con diversos tipos de cáncer. Estudios genómicos han identificado que ciertas subunidades del APC/C tienen una frecuencia de alteración superior al 5 % en varios cánceres y están significativamente asociadas con un pronóstico desfavorable en pacientes. Esto sugiere que las subunidades del APC/C podrían ser biomarcadores útiles.

En el contexto de las plantas, el conocimiento sobre el APC/C está comenzando a consolidarse. Estudios en *A. thaliana* han demostrado que, niveles reducidos de los genes que codifican las subunidades APC6 y APC10 en *Arabidopsis* provocan varios defectos en el desarrollo vascular (Marrocco *et al*, 2010; Eloy *et al*., 2011). El estudio realizado por Eloy y colaboradores en el 2011 analizaba mutantes de pérdida y ganancia de función de APC 10, demostrando que los mutantes *knockout* de APC 10 son letales para el gameto femenino y, por el contrario, la sobreexpresión constitutiva de APC10 aumentó el tamaño de las hojas.

Aunque aún no existen investigaciones específicas sobre APC5 en plantas, el análisis de otras subunidades y la función del complejo en general sugiere que APC5 podría estar implicado en la modulación de la división celular, el crecimiento y la respuesta a estímulos ambientales. Además, el uso de mutantes generados por el Proyecto SALK T-DNA ofrece una herramienta valiosa para explorar la funcionalidad de APC5 en plantas, estableciendo un puente entre los estudios en modelos animales y vegetales.

4.3 Marco Legal

En el laboratorio de crecimiento y desenvolvimiento vegetal e biología molecular que se encuentra en la Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz de la universidad de São Paulo, para la aplicación y manipulación de las plantas cuenta y se rige por la Resolución Normativa Nº 40, de 29 de abril de 2024, que deroga la Resolución Normativa CTNBio nº 02, de 27 de noviembre de 2006, esta normativa establece la clasificación de riesgos de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y los niveles de medidas de bioseguridad requeridas para las actividades y proyectos que involucren OGM y sus derivados (CTNBio, 2024).

5. METODOLOGÍA

5.1 Capítulo 1: Identificación mediante PCR gel genotipo de las plantas SALK_024997

5.1.1 *Elección y obtención de la línea de plantas*

La línea de mutante con pérdida de función se eligió y obtuvo del banco de germoplasma del *National Arabidopsis Stock Centre* (NASC) ubicado en la Universidad de Nottingham, Campus Sutton Bonington, Reino Unido. Se seleccionó un linaje SALK, variedad de *A. thaliana* modificada genéticamente mediante la inserción aleatoria T-DNA para el gen APC5 (At1g06590.1). Esta semilla SALK_024997, tiene una inserción de 561-861 pb localizada en el intrón 9 del gen en cuestión (TAIR - Sequence Viewer, 2024).

5.1.2 *Crecimiento de las plantas*

5.1.2.1 *Preparación de sustratos.*

Para la elaboración se siguió las indicaciones y normativas establecidas en el laboratorio de trabajo (Crecimiento y desenvolvimiento vegetal) en Brasil. Este sustrato se elaboró con proporciones 3:1: se procedió a medir 3 litros de sustrato comercial (turfa) (*Jiffy Growing Solutions*, Oslo, NO), 1 litro de vermiculita expandida y 3 litros de agua destilada, esta mezcla se dejó reposar por 24 horas para posteriormente envasar en macetas de 100 mL.

5.1.2.2 *Siembra de semillas.*

Se tomo 16 semillas del linaje SALK_024997 y 6 semillas del linaje WT SALK para el crecimiento in *vivo*, de plantas *A. thaliana* y se sembraron por separado en macetas.

5.1.2.3 *Condiciones de crecimiento.*

Las macetas sembradas se taparon con un domo de germinación y se llevaron a condiciones controladas en el equipo fitotrón a temperatura de 22.8 ºC, luminiscencia de (16 h de

luz (45 µmol fotones m^{-2} s^{-1} irradiancia PAR) /8 h de oscuridad), humedad aproximada del 55 % durante todo el día, con riego diario.

5.1.3 *Extracción de ADN genómico de las plantas SALK_024997*

Para la extracción de ADN con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1991) se tomó una hoja de cada planta de 30 días de crecida y se dispuso cada una en un microtubo *eppendorf* estéril debidamente marcado; se adicionaron perlas medianas y pequeñas de metal, se cerraron los tubos y se colocaron en nitrógeno líquido por 5 minutos. Seguidamente los tubos se pusieron en el equipo macerador por 30 segundo a una frecuencia de 25 s^{-1} pasado el tiempo se adicionaron 500 µL de CTAB en todos los microtubos, se agitó en *vortex* por 10 segundos y se incubó a 65 ºC por 30 minutos, invirtiéndolos cada 5-10 minutos. Luego de la incubación se transfirieron los tubos a hielo por un minuto y se les agregó 375 µL de una mezcla en proporción (24:1) de cloroformo y alcohol isoamílico, posteriormente se agitó en *vortex* por 10 segundos y se centrifugó a 13000 rpm a 4 ºC por 10 minutos. Del tubo se recolectó el sobrenadante superior y se transfirió a un nuevo microtubo y se repitió una vez los pasos desde la adición del cloroformo-alcohol isoamílico.

A partir del sobrenadante se recolectaron (400 µL c/u) y se les adicionó 4 µL de RNAsa en cada tubo, se incubó nuevamente a 37 ºC por 20 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionó 280 µL de isopropanol al volumen que se tenía de muestra y se mezcló por inversión. Seguidamente se centrifugó por 20 minutos a 13000 rpm y 4ºC y luego se descartó el sobrenadante adicionándole 500 µL de etanol al 70 % frío, consecuentemente se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 13000 rpm para descartar el sobrenadante y dejar evaporar totalmente; finalmente, se resuspendió la muestra en 20 µL de agua mili-q estéril y se guardó a -20 ºC hasta su posterior uso.

5.1.4 *Verificación de la calidad de los reactivos del kit* "GoTaq® Green Master mix

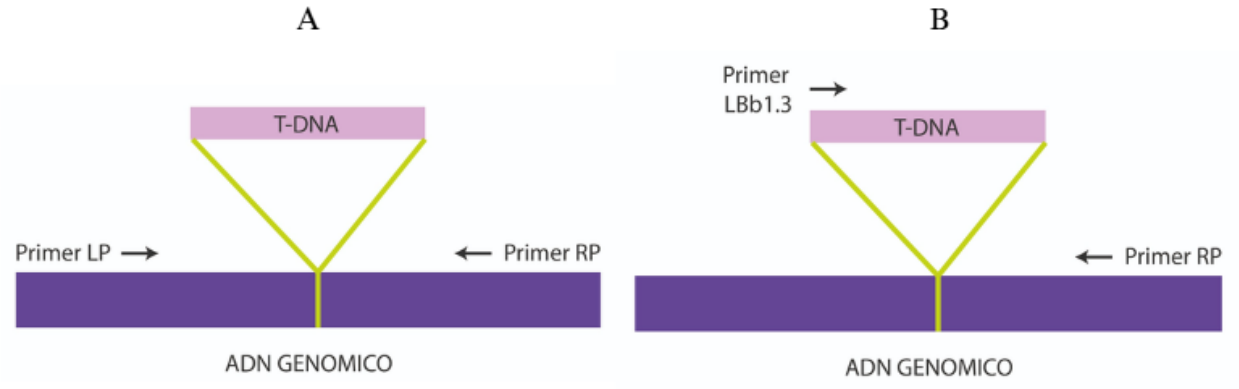
Para la verificación de la calidad de los reactivos del *kit* "GoTaq® Green Master mix" que se iban a utilizar se realizó una PCR para amplificar el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con los *primers* GAPDH RV, GAPDH FW (Anexo **2**). La reacción se llevó a cabo en un termociclador T100 (BioRad) utilizando la siguiente programación: primer ciclo a 94 ºC durante cinco minutos para la primera desnaturalización, seguido de 28 ciclos secuenciales de 94 ºC durante 30 segundos, 50 ºC durante 30 segundos y 72 ºC durante un minuto y un ciclo final de 72ºC durante cinco minutos; los fragmentos de ADN amplificados por PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% tenido con *SafeView,* para comprobar el tamaño correcto del producto de reacción.

5.1.5 *Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR) para el genotipado de las plantas.*

Una vez extraído el ADN genómico, se utilizó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de determinar el genotipo de los individuos analizados.

Se llevaron a cabo dos reacciones con objetivos diferentes: la PCR WT y la PCR ADN-T, la primera utilizó cebadores específicos para los bordes izquierdo y derecho de la región silvestre (LP-SALK_024997) y (RP-SALK_024997), respectivamente (Tabla 1), con el fin de amplificar la secuencia original del gen APC5 como se ilustra en la Figura 4a. El segundo, por su parte, utilizó el cebador LBb1.3 (Tabla 1), que se adhirió al borde izquierdo del fragmento del T-DNA insertado, junto con el cebador RP-SALK_024997, que se adhirió al borde derecho del gen silvestre, amplificando así el T-DNA insertado como se ilustra en la Figura 4b, las reacciones se llevaron a cabo utilizando el *kit* "GoTaq® Green Master mix".

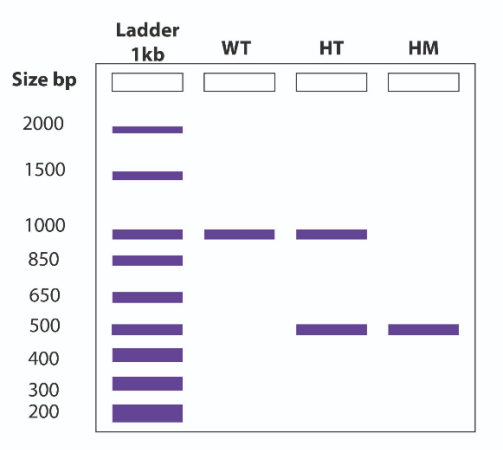
Figura 4. *Representación de la amplificación del gen APC5 mediante primers específicos para el gen silvestre (WT) y la inserción de T-DNA*



Nota: Representación esquemática de la orientación de los *primers*. En la parte A, son utilizados el LP y RP en la PCR para amplificar la región silvestre del gen. Mientras que en el lado B, son utilizados el LBb.1.3 y RP para amplificar la inserción de T-DNA. Figura tomada y rediseñada de *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (SIGnAL) por http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html

La reacción de PCR WT se llevó a cabo en un termociclador T100 (BioRad) utilizando la siguiente programación: primer ciclo a 94 ºC durante cinco (5) minutos para la primera desnaturalización, seguido de 35 ciclos secuenciales de 94 ºC durante 30 segundos, 50 ºC durante 30 segundos y 72 ºC durante un minuto y un ciclo final de 72 ºC durante cinco minutos. Para la reacción del T-DNA primer ciclo a 94 ºC durante cinco minutos para la primera desnaturalización, seguido de 35 ciclos secuenciales de 94 ºC durante 30 segundos, 55 ºC durante 30 segundos y 72 ºC durante un minuto y un ciclo final de 72 ºC durante cinco minutos. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% y teñido con *SafeView,* para comprobar el tamaño correcto del producto de reacción. La presencia o ausencia de bandas de tipo salvaje o de bandas de ADN-T indicó el genotipo de los individuos, ver Figura 5.

Figura 5. *Representación teórica de los resultados de la PCR: bandas de inserción del T-DNA y banda silvestre.*



Nota: Representación de un gel de agarosa, indicando la caracterización genotípica de un individuo. En el carril dos se observa una sola banda entre 1000 bp y 900 bp, correspondientes a un individuo con genes silvestres (WT), en el carril 3 se observan dos bandas, una para la inserción del T-DNA entre 500 bp y 400 bp y otra para WT, siendo un individuo heterocigoto con la mutación en una sola copia del cromosoma. En el carril 4, se observa una sola banda en la inserción del T-DNA, pero no se observa ninguna banda para el gen silvestre por lo que se podría decir que el individuo es homocigoto, pues tiene la mutación en las dos copias del cromosoma. Figura tomada y rediseñada de *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (SIGnAL) por http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html

Tabla 1. *Primers 1-2 utilizados para genotipificar y amplificar la banda WT y los primers 2-3 amplifican la banda del T-DNA de la SALK_024997.*

Primers	Secuencia (5`-3`)
1 LP-SALK_024997 *(Forward)*	ATTCATTCTCCCGAGAGCTTC
2 RP-SALK_024997 *(Reverse)*	TACCCCAGATTCTCACGACAG
3 LBb1.3 *(Forward)*	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

5.2 Capítulo 2: Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Transcripción Inversa Cuantitativa (RT-qPCR)

5.2.1 *Cultivo In Vitro*

5.2.1.1 *Esterilización de las semillas.*

Para la esterilización de las semillas que se inocularon *in vitro* (WT SALK y SALK_024997) se dispuso en microtubos una cantidad mínima de las semillas por separado y se les adicionó 1 mL de Etanol al 70 % se dejó actuar por dos minutos haciendo una agitación suave constantemente, seguidamente se retiró el líquido y se les adicionó 1 mL de solución de hipoclorito sodio 5 %, se cerraron y se agitaron suavemente por 9 minutos.

Finalizado este tiempo se retiró el residuo y se les hizo cinco lavados con agua destilada estéril para finalmente resuspender las semillas en un (1) mL de agua destilada estéril.

5.2.1.2 *Inoculación de las semillas.*

Para el cultivo *in vitro*, las semillas previamente esterilizadas se sembraron en placas de Petri PS cuadradas con medio de cultivo *Murashige-Skoog*, en adelante (MS) con 10 g/L de sacarosa y 9g/L de agar, se dispuso de cinco semillas de cada una de las referencias mencionadas anteriormente por placa, finalizada la implantación se sellaron los bordes laterales con microporo y se envolvieron las placas en papel aluminio para almacenar a 4 ºC por 3 días. Transcurrido este tiempo se dispuso en el equipo CONVIRON a temperatura de 22.8 ºC, luminiscencia de (16 h de luz (45 μmol fotones m^{-2} s^{-1} irradiancia PAR) /8 h de oscuridad.

5.2.2 *Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Transcripción Inversa Cuantitativa (RT-qPCR)*

5.2.2.1 *Extracción de RNA.*

De la parte aérea de las plántulas cultivadas *in vitro* se hizo un *pool* (mezcla de varias muestras de una misma línea de trabajo) por cada semilla de referencia para obtener seis (6) *pools*, correspondientes a WT SALK (3) y plántulas heterocigóticas SALK_024997 (3). Estos, almacenados en microtubos de 1.5 mL se les adicionó una perla metálica mediana y una pequeña; con nitrógeno líquido y se procedió a macerar por 30 segundos a una frecuencia de 25 ^{1}/sg, transcurrido este tiempo se pusieron de nuevo en nitrógeno líquido.

Posterior al nitrógeno líquido se les adicionó 1 mL de trizol, se realizó *vortex* por 10 segundos para homogenizar, se dejó reposar a temperatura ambiente por cinco minutos.

Después de este tiempo se adicionó 200 µL de Cloroformo (100 %) frio y se mezcló por inversión, con reposo de cinco minutos a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 ºC, seguido se recolectaron 500 µL de la fase acuosa para transferir a nuevos microtubos de 1.5 mL; seguidamente se precipitó el ARN con la adición de 1 mL de isopropanol (100 %) frio; para esto, se mezcló hasta siete veces por inversión suave con reposo a temperatura ambiente por 20 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 ºC y se retiró todo el sobrenadante para dejar secar los microtubos completamente.

En los pasos finales, se adicionó 1 mL de etanol (70 %) frío y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4ºC, se retiró todo el sobrenadante y se repitió nuevamente este proceso. Se dejó secar la muestra para resuspender con 20 µL de agua ultrapura estéril y almacenar a -20 ºC hasta su posterior uso.

5.2.2.2 *Tratamiento con DNAsa.*

Para el tratamiento con DNAsa se descongelaron las muestras en una cubeta con hielo y se les añadió 12 µL de un mix preparado que contenía por muestra una cantidad de 8 µL de H_2O, 2 µL de RQ1 DNAsa *Buffer* y 2 µL de RQ1 DNAsa; se mezcló bien las muestras con la pipeta de RNA con el mix y se llevó a incubar a 37 ºC por 30 minutos, seguidamente se adicionó 1 µL de *RQ1 stop solution* para cada muestra y se llevó nuevamente a incubar a baño seco por 10 minutos a 65 ºC; transcurrido este tiempo se pasaron las muestras a una cuba con hielo.

5.2.2.3 *Purificación de RNA total.*

Para la purificación del RNA total, a las muestras se les adicionó 100 µL de isopropanol (100 %) a temperatura ambiente, luego se mezcló con la micropipeta, después de sellados los microtubos, se dejaron reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y seguidamente las muestras se centrifugaron a 13500 rpm/40 minutos a 4 ºC, retirado el sobrenadante de las muestras se les adicionó 500 µL de Etanol al 70 % temperatura ambiente, se centrifugaron a 13500 rpm por 25 minutos a 4 ºC. Finalmente se removió el líquido y se dejó secar nuevamente para luego resuspender con 20 µL de agua ultrapura estéril y se almacenaron a -20 ºC.

5.2.2.4 *Cuantificación del RNA.*

Para la medición de la cantidad y calidad del RNA se utilizó el equipo *NanoDrop* de la marca Thermofisher, donde siguiendo las instrucciones del fabricante se procedió hacer las lecturas de cada muestra con 1µL.

5.2.2.5 *Síntesis de cDNA.*

Se realizó una dilución de cada muestra con agua ultrapura estéril para tener todas las muestras en una concentración de 300 ng/µL. Para la síntesis de cDNA se usó el Kit SiperSciptIII™ First Strand Synthesis de Thermo fisher así, se descongeló y se dió un ligero *spin*

down antes de usar. De las muestras de ARN diluidas se tomó 3,33µL y se llevaron a un microtubo de PCR con 1µL de Oligo DT (50 uM), 1 µL de dNTP mix (10 mM) y se aforó hasta 10 µL con agua ultra pura estéril. Posteriormente se llevó a incubar por 65 ºC por 10 minutos y luego se pasó a hielo por cinco minutos. A las muestras se le adicionó 10 µL de un segundo mix que contenía 12µL de RT Buffer (10X), 24 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 12 µL de DTT (0,1 M), 6 µL de RNAsa out (40 U/µL) y 6 µL de Super Script III RT (200 uM/µL). Las muestras se mezclaron con micropipeta y se incubaron a 50 ºC por 50 minutos, luego a 85 ºC por cinco minutos para luego ponerlos en una cubeta con hielo por dos minutos. Seguidamente se les dió un *spin down* a las muestras y se les adicionó 1 µL de RNAsa H a cada tubo, finalmente se incubaron a 37 ºC por 20 minutos y se llevaron a ultra congelación a -20 ºC.

5.2.2.6 *Cuantificación del cDNA.*

Para la medición de la cantidad y calidad del cDNA se utilizó el equipo *NanoDrop* de la marca *Thermo fisher*, siguiendo las instrucciones del fabricante se procedió hacer las lecturas de cada muestra con 1µL.

5.2.2.7 *Preparación de la placa para la RT-qPCR.*

A los 20 µL de muestra obtenidos se les adicionó 80 µL de agua ultrapura estéril para diluir 4X; seguidamente se prepararon los *primers* para APC5 y Ubiquitina 10 como gen endógeno a una concentración de 10 µmol/µL; seguidamente se realizaron dos mix, cada uno contenía 118,75 µL de *Gotaq Syber*, 2,85 µL de *Primer Forward,* 2,85 µL de *Primer Reverse* y 65.55 µL de agua ultrapura estéril, estas mismas cantidades para cada par de *primers*. En una placa de 96 pocillos luego de depositar el *mix* y el cDNA para un volumen total de 12,5 µL por pozo, como se muestra en el Anexo 6, se llevó al equipo (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systemy) siguiendo las condiciones del fabricante.

5.3 Capítulo 3: Análisis De La Ubicación Tisular Del Gen APC5

5.3.1 *Expresión del gen APC5 en plantas con GUS*

5.3.1.1 *Siembra de las plantas GUS.*

Para las plantas *in vivo*, en macetas con proporción 3:1 de sustrato comercial (turfa) (*Jiffy Growing Solutions*, Oslo, NO), y vermiculita expandida se sembraron las semillas GUS 3.6 que ya habían sido transformadas fusionando un fragmento de 2,5 Kb *Upstream* del codón ATG con el gen reportero de la β -glucuronidase (GUS); para las plantas *in vitro* en una placa con medio MS se depositaron 10 semillas GUS 3.6. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas, planteadas anteriormente en el ítem 5.1.2.3 y 5.2.1.2 respectivamente.

5.3.1.2 *Protocolo GUS.*

De las plantas *in vivo* se recolectaron las flores surgidas entre los 35 a 40 días después de la siembra. Del cultivo *in vitro*, se tomó las raíces laterales de 10 días de crecimiento.

El material se dispuso en microtubos por separado y se adicionó heptano hasta cubrir y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el heptano y se adiciono solución GUS que contenía (4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide (X-Gluc), 100 mM de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS)-HCl, 50 mM de tampón NaCl (pH 7,0), 2 mM de K3[Fe(CN)6]). Las muestras se infiltraron con la solución GUS a 400 mmHg de vacío durante 15 minutos. A continuación, se incubó a 37 °C durante 18 h y posteriormente se retiró la solución GUS y se adicionó etanol al 95 % por 12 h. Luego, las muestras se mantuvieron en ácido láctico al 90 % y se fotografiaron bajo un microscopio estereoscópico fluorescente Leica M165 FC con contraste de interferencia diferencial, equipado con el *software* LAS AF (Leica Application Suite Advance Fluorescence).

5.3.2 *Predición In Silico del gen APC5*

Para la predición *in silico* del gen APC5 se utilizó la base de datos *The Bio-Analytic Resource for Plant Biology* (BAR) donde se introdujo el nombre del gen AT1G06590 y arrojó los resultados de los niveles expresión génica en los órganos de *A. thaliana*.

5.4 Capítulo 4: Efectos fenotípicos de la interrupción del gen APC5

5.4.1 *Medición de la longitud radicular*

Se tomaron las placas de crecimiento *in vitro* y se procedió a fotografiar al mismo nivel, mediante el programa *ImageJ* se realizó la medición de la longitud de las raíces de las plantas y se transcribieron los datos a una hoja Excel para determinar el promedio de longitud por placa sembrada.

5.4.2 *Análisis de viabilidad embrionaria*

La evaluación de la influencia del gen APC5 en la gametogénesis de las plantas mutantes SALK_024997, se llevó a cabo con un análisis de los frutos de *A. thaliana* heterocigóticos para la inserción de ADN-T, verificado mediante genotipado. Para ello, se abrieron los frutos con una lupa y se contó el número de óvulos fecundados viables y de óvulos abortados para su posterior comparación con las silicuas de los individuos silvestres.

6. CRONOGRAMAS DE ACTIVIDADES

Tabla 2. *Cronograma de actividades realizadas durante las prácticas profesionales*

Cronograma de actividades Semestre 2024-2																						
Actividades/Meses / Actividades	Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre					
Limpieza y desinfección de laboratorio			Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ					
Limpieza y desinfección de equipos				Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ					
Preparación de medio de cultivos			Δ	Δ	Δ	Δ		Δ	Δ			Δ	Δ		Δ	Δ	Δ					
Evaluación de la calidad del agua destilada de la sala fitotron						Δ				Δ				Δ			Δ					
Evaluación de la calidad de agua destilada de la sala principal						Δ				Δ				Δ			Δ					
Evaluación de la calidad de aire del laboratorio			Δ	Δ			Δ				Δ				Δ		Δ					
Evaluación del funcionamiento del filtro de la cabina de bioseguridad					Δ	Δ		Δ			Δ				Δ		Δ					
Seminario curso: Análisis de amplicones para el estudio de comunidades microbianas												Δ										
Seminario: Principios básicos y usos del liofilizador						Δ																
Simposio: III Simposio de manejo biológico											Δ											
Extracción ADN				Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ					
Evaluación de la funcionalidad de los kits de extracción de ADN			Δ	Δ	Δ																	
Revisión de literatura		Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ					
Escritura de trabajo de grado		Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ					
Entrega de trabajo									Δ				Δ		Δ	Δ	Δ					
Defensa de trabajo																		Δ				

Nota: Cronograma de actividades realizadas en paralelo, al desarrollo de trabajo “Caracterización molecular y fenotípica de mutantes APC5 en *Arabidopsis thaliana”*

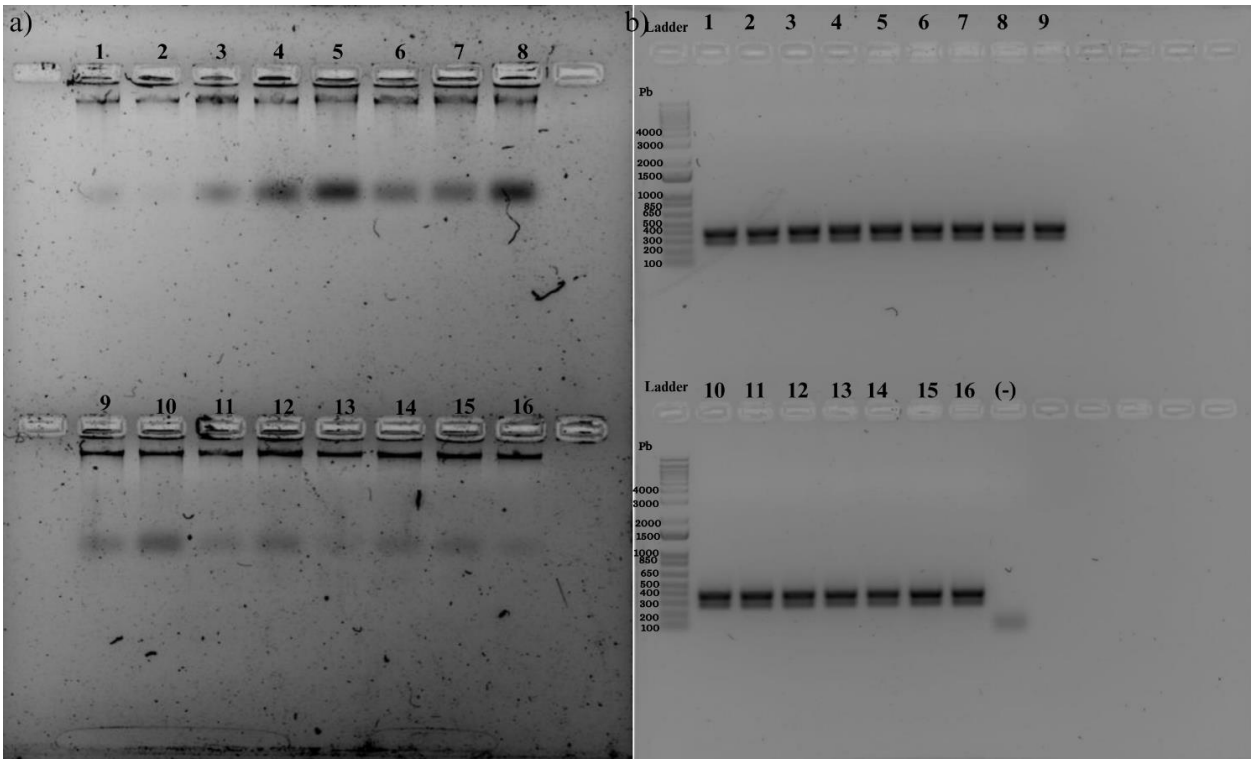
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del genotipo de las plantas SALK_024997

Para identificar las plantas que contenían la mutación en el gen APC5, localizada en el cromosoma 1, se cultivaron semillas de *A. thaliana* de la línea SALK_024997 y se analizaron 16 plantas presuntivamente heterocigóticas.

Inicialmente, se realizó una extracción de ADN utilizando 2 a 3 hojas de cada una de las 16 plantas mediante el método CTAB. El resultado de esta extracción se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con *SafeView*. En la Figura 6a se pueden observar los carriles 1-16, que muestran bandas intensas y de buena calidad genómica. Posteriormente, se verificó la calidad de los reactivos del kit GoTaq® Green Master Mix utilizando los cebadores GAPDH RV y GAPDH FW, que amplifican el gen del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Anexo 3). Las bandas de este gen amplificado se encontraban entre 300 y 400 pares de bases (Figura 6b) lo que indicaba que los reactivos estaban en condiciones adecuadas para su uso en reacciones de PCR posteriores.

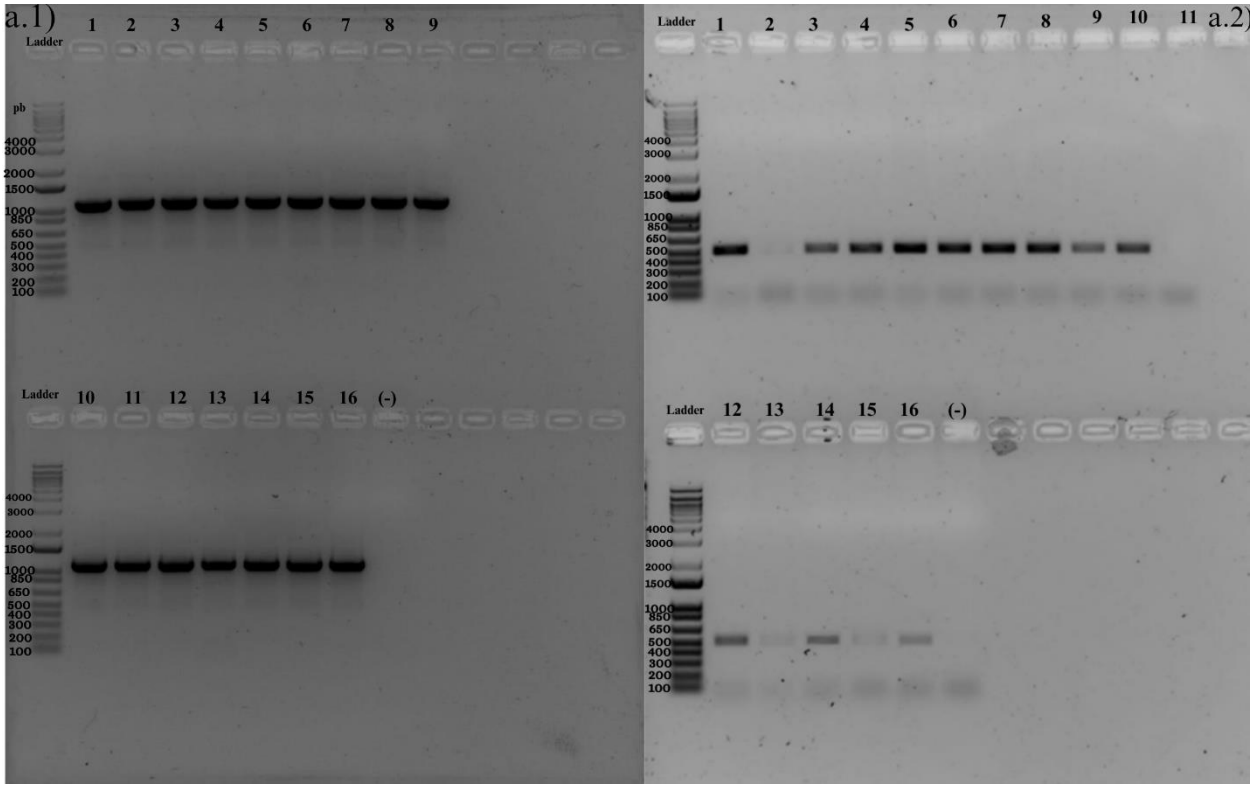
Figura 6. *Electroforesis del DNA y PCR GAPDH53*



Nota: a) Electroforesis para la visualización de la calidad del ADN extraído; b) Electroforesis del gen GAPDH para la verificación de la calidad de los reactivos.

Para verificar el genotipo de las plantas SALK_024997, se realizaron dos reacciones de PCR con diferentes propósitos: la primera para verificar la presencia del gen de tipo silvestre (WT) y descartar posibles plantas con mutación homocigótica, y la segunda para identificar las plantas con inserción de T-DNA. En la Figura 7a.1 se muestra el resultado de la electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con *SafeView*, donde las 16 muestras de ADN amplificaron el fragmento de tipo silvestre. En el primer carril se ubicó el marcador de peso molecular de 1 kb de Thermo Fisher, utilizado para comparar las bandas WT, que presentaban un tamaño aproximado de 1000 pares de bases y se observaban claramente desde el pocillo 1 hasta el 16.

Figura 7. *Amplificaciones de las PCR para el gen WT y T-DNA de las 16 muestras.*



Nota: a.1) Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, en el cual se utilizaron los *Primers* LP y RP para la amplificación WT. a.2) Gel en las mismas condiciones, con la utilización de los *Primers* LBb1.3 y RP para la amplificación de la inserción T-DNA. En ambos geles del pocillo 1 al 16 corresponden al ADN de las plantas texteadas y el pocillo (-), es el control negativo de la reacción. El marcador de peso molecular usado es de 1kb de la marca Thermo Fisher.

Se pueden observar los resultados de la PCR para el T-DNA (Figura 7a. 2), donde se evidencia que, de las 16 muestras de ADN obtenidas, 15 muestras tenían la inserción de la mutación del gen APC5, a excepción de la muestra 11, en la que no se observa banda de amplificación, lo que sugiere que esta planta es silvestre. Dentro de las muestras que amplificaron la inserción del T-DNA, se observa que algunas no se marcan tan intensamente como las bandas 2, 13 y 14; sin embargo, sí presentan la mutación.

Con base en estos resultados, se puede afirmar que de las 16 muestras de ADN obtenido de las plantas *A. thaliana*, provenientes de las semillas SALK_024997, las plantas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 16 presentaron la inserción de T-DNA siendo plantas heterocigotas. La planta número 11 no evidencia la inserción de T-DNA, por lo tanto, se asume que es silvestre (WT). Ninguna de las 16 plantas para este gen presento una mutación homocigota. Estos resultados corroboran un análisis previo realizado en el laboratorio de crecimiento y desenvolvimiento vegetal de la universidad de Sao Paulo en Brasil, en el 2023 por un estudiante , donde se analizaron muestras de ADN de 125 individuos del mismo linaje (SALK_024997), y se obtuvieron 67 plantas WT, 58 plantas con la inserción T-DNA, y no se encontraron individuos homocigóticos de la mutación de APC5; demostrando que la inserción de T-DNA ubicada en el intrón 9 de este linaje es letal para la planta, ya que los individuos homocigotos, es decir, aquellos que tienen la deleción en ambos alelos, son incapaces de sobrevivir. Esta información se respalda con el trabajo publicado sobre la subunidad APC/C en plantas y otros organismos que han demostrado que estas proteínas son esenciales para el desarrollo, ya que la supresión completa de este gen es letal para los organismos (Eloy *et al*., 2015).

7.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Transcripción Inversa Cuantitativa (RT-qPCR)

Para verificar el nivel de expresión del gen APC5 en plantas provenientes de semillas que tenían la inserción de T-DNA, se cultivaron tres placas *in vitro* con medio MS, que contenían cada una 5 semilla WT SALK y 5 semillas SALK_024997. Tras 15 días después de la estratificación (DAS), se realizó la recolección de las muestras,para la obtención de cDNA y la posterior realización de RT-qPCR. El cDNA se amplificó utilizando el sistema “Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System” en una placa de 96 pocillos, empleando el “SYBR™ Green PCR Master mix” (Thermo Fisher Scientific, MA) siguiendo las recomendaciones del

fabricante y utilizando tres réplicas técnicas por muestra. El gen *UBQ10* se usó como referencia endógena para la normalización de los niveles de expresión.

Los resultados mostraron una ligera disminución de la expresión del gen *APC 5* (Grafico 1) en la línea heterocigótica SALK_024997 en comparación con las plantas WT SALK. La media de expresión fue de 1,00 para la planta WT y 0,92 para la línea SALK_024997, con errores estándar de 0,05665 y 0,03092, respectivamente (Anexo 7). Esta diferencia, aunque mínima, concuerda con lo esperado para una línea heterocigótica, en la que solo una copia funcional del gen está presente. Este comportamiento puede explicarse por la redundancia genética parcial, un fenómeno en el que una única copia funcional es suficiente para mantener los niveles de expresión requeridos y la función biológica como se ha reportado en estudios previos sobre haploinsuficiencia en plantas (Birchler *et al*., 2005).

El uso del gen UBQ10 como referencia endógena para la normalización en los experimentos de RT-qPCR asegura la confiabilidad de los datos (Anexo 7), ya que su expresión estable ha sido ampliamente validada en un estudio similar (Schwedersky *et al*., 2021). Esto refuerza la solidez de los resultados obtenidos.

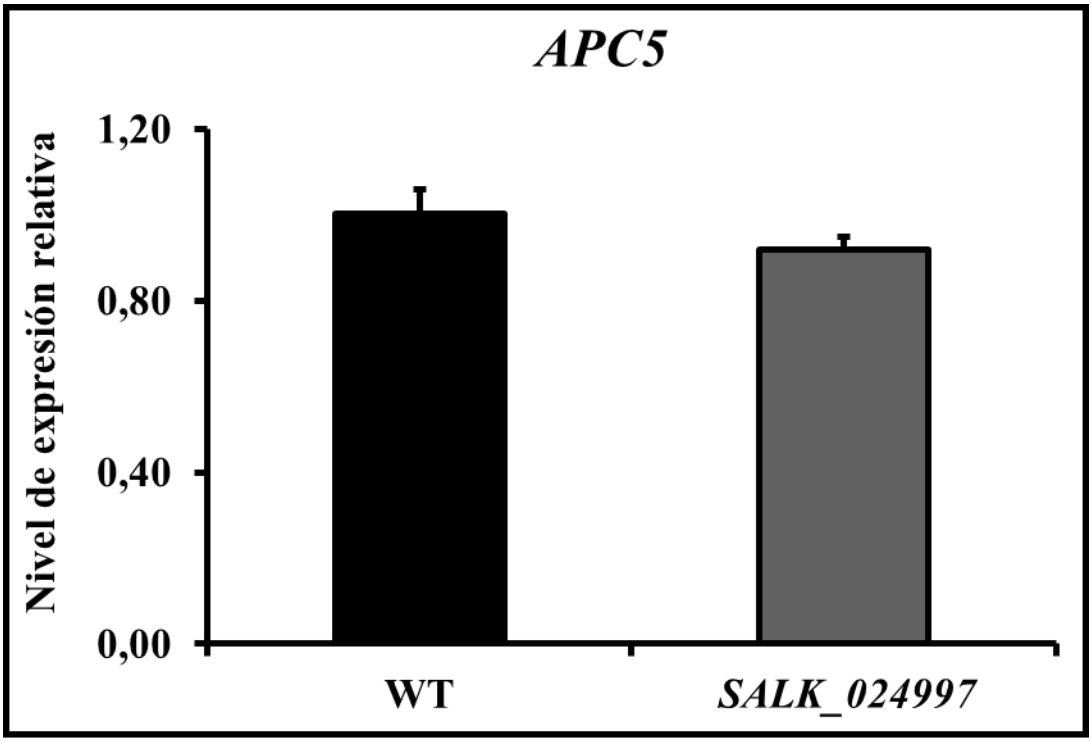


Gráfico 1. *Análisis de transcripción del gen APC5 mediante RT-qPCR*

Nota: Representación gráfica del nivel de expresión relativa del gen APC5 en plantas WT y SALK_024997. Los valores, normalizados contra el gen endógeno Ubiquitina 10, evidencian una ligera disminución en plantas heterocigóticas, consistente con la naturaleza de la mutación; con replica biológica (N=3).

7.3 Análisis de la expresión tisular del gen APC5 *In Vivo*, *In Vitro* E *In Silico*, en *Arabidopsis thaliana*

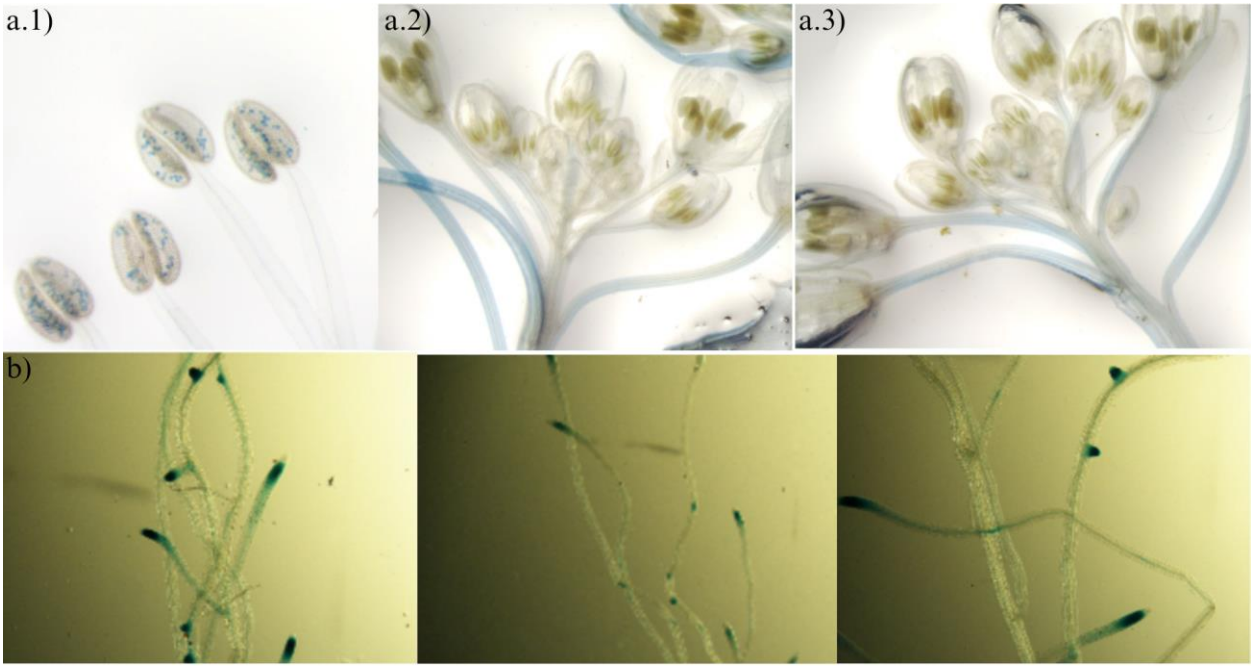
Para analizar la expresión tisular del gen APC5 in *vivo* e *in vitro*, se utilizaron semillas GUS 3.6 que habían sido modificadas previamente fusionando un fragmento de 2,5 Kb *Upstream* del codón ATG con el gen reportero β -glucuronidase (GUS); en plantas de *A. thaliana* col-0 mediante el microrganismo *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Este sistema permitió evaluar la actividad del promotor *APC5* en diferentes tejidos. Según el ensayo GUS, los resultados mostraron una expresión específica en las anteras, evidenciada por los puntos azules que indican actividad en el polen (Figura 8a). Adicionalmente, se observó en la flor y en raíces

laterales provenientes de cultivos *in vitro.* En estas últimas, la actividad del gen se localizó en el meristemo apical de la raíz y en los meristemos de las raíces laterales, lo que fue visualizado como puntos azules a lo largo de la raíz principal (Figura 8b).

Estos resultados reflejan un patrón de expresión espacialmente específico del gen *APC5*. La actividad observada en las anteras sugiere que este gen juega un papel relevante en el desarrollo y funcionalidad del polen, lo cual está en línea con un estudio previo que destaca la importancia del complejo APC/C en la regulación del ciclo celular durante la formación del gametofito masculino (Eloy *et al*., 2012). La presencia de actividad en este tejido podría estar relacionada con la correcta progresión mitótica y el mantenimiento de la integridad genética en las células reproductivas masculinas.

Por otro lado, la expresión detectada en los meristemos radiculares resalta la contribución de *APC5* al crecimiento y desarrollo de la planta. Los meristemos apicales y de raíces laterales son zonas de alta actividad proliferativa, esenciales para la división y diferenciación celular. La actividad del promotor en estos tejidos es coherente con el papel conocido del complejo APC/C en la regulación del ciclo celular en tejidos vegetativos (Capron *et al*., 2003).

Figura 8. *Expresión del gen APC5 mediante ensayo GUS en Arabidopsis thaliana*

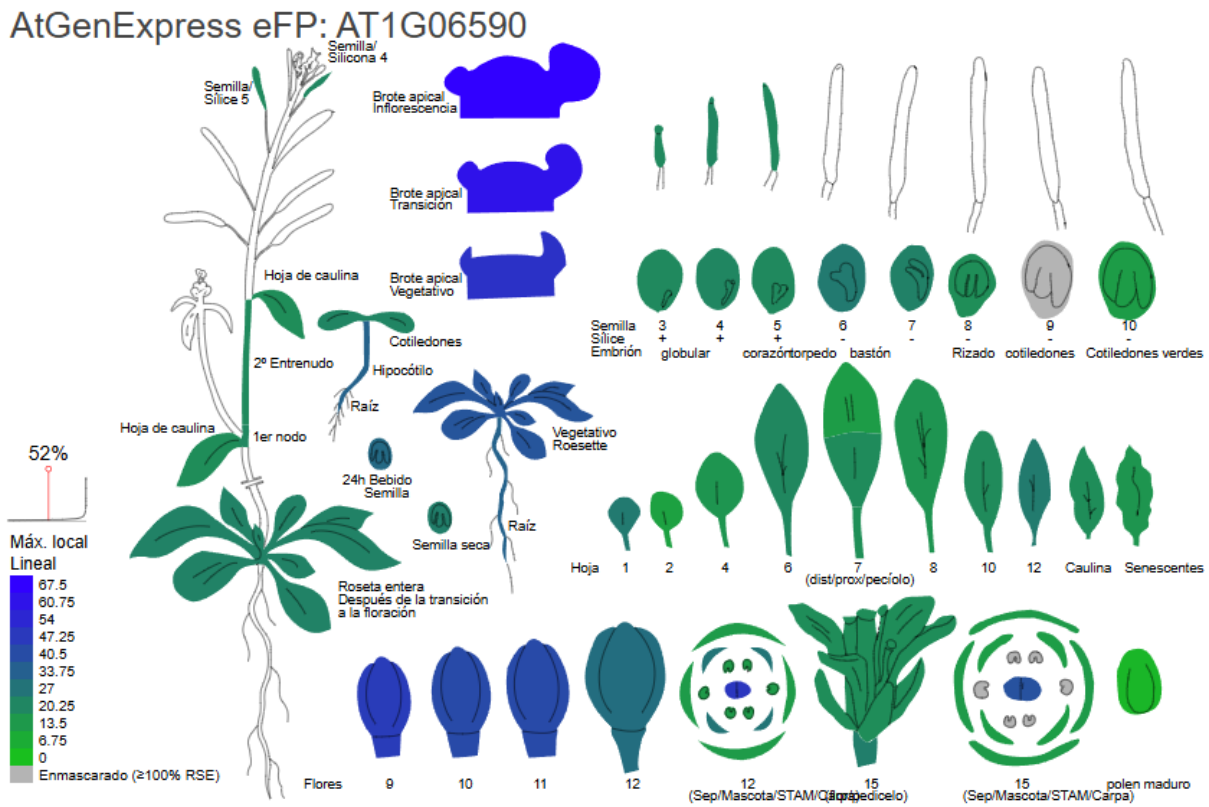


Nota: a) Fotografía evidenciando puntos azules en las anteras y flores, indicando expresión del gen en estas estructuras. b) Imágenes de raíces laterales donde se detecta actividad del gen APC5 en el meristemo apical y raíces laterales, resaltado con tinción azul.

Para el análisis de los niveles de expresión del gen APC5 *in silico* se utilizó la base de datos BAR. Los datos de expresión génica utilizados en este estudio provienen del Mapa de Expresión Génica del Desarrollo de *Arabidopsis*, reportado por Schmid *et al.* (2005) en *Nature Genetics* (37:501) y del laboratorio de Nambara en Canada, para las etapas de semilla absorbida y seca, así como de Nakabayashi *et al*., (2005) en *The Plant Journal* (41:697). Estos datos fueron generados mediante la matriz Affymetrix ATH1 y normalizados utilizando el método GCOS, con un valor TGT de 100. La mayoría de los tejidos se muestrearon por triplicado. Además, la imagen fue generada con el navegador eFP de AtGenExpress por Waese *et al.,* 2017, disponible en *bar.utoronto.ca/eplant*, basado en el diseño original de B. Vinegar, con ilustraciones de J. Alls

y N. Provart, y posteriormente redibujada y programada en formato vectorial por J. Waese (BAR, s.f.)

Figura 9. *Expresión in silico del gen APC5 en Arabidopsis thaliana.*

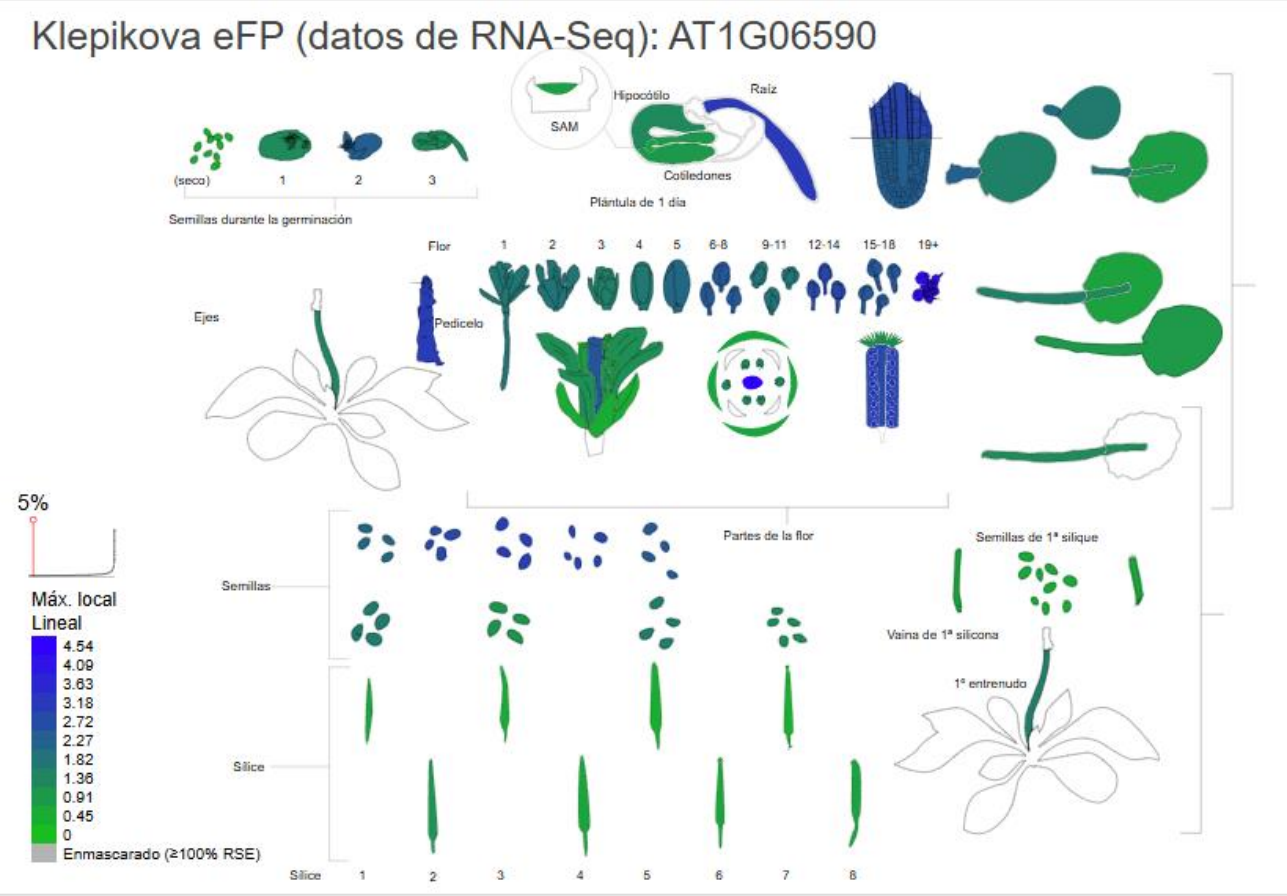


Nota: Mapa generado con la base de datos BAR (ePlant) que muestra un nivel máximo de expresión del gen APC5 del 52%, en tejidos específicos. Los datos provienen de análisis transcriptómicos normalizados de diversos estadios de desarrollo. Tomado de https://bar.utoronto.ca/eplant/

En la Figura 9, se pueden apreciar las partes de la planta *Arabidopsis thaliana* en las que se presenta mayor expresión del gen APC5 a una escala de 0 – 67.5; en esta podemos observar en azul el nivel máximo, en partes como el brote apical, flores, raíz y roseta vegetativa; y en verde se muestran los niveles de expresión mínimos, como en el polen maduro, semillas sin silicuas y hojas mitad distal.

En la figura 10, a una escala menor de 0 - 4,54 con el mismo indicativo de color, podemos observar que el mayor nivel de expresión de este gen se encuentra en la raíz de las plántulas de un día, en las flores y en las semillas jóvenes; y por el contrario en semillas secas, en las hojas maduras, vainas de silicuas y en los sépalos de flor madura, el nivel de expresión del gen es de 0.

Figura 10. *Expresión in silico del gen APC5 en Arabidopsis thaliana (Nivel máximo del 5%).*



Nota: Imagen complementaria de la Figura 9 que destaca zonas de expresión más limitada del gen, sugiriendo una regulación tisular específica.

Estos resultados indican que la expresión del gen APC está más activo en los estadios inmaduros de *A. thaliana*, probablemente contribuyendo a procesos específicos del desarrollo temprano. Por otro lado, su menor expresión en etapas maduras y secas, podría indicar que su

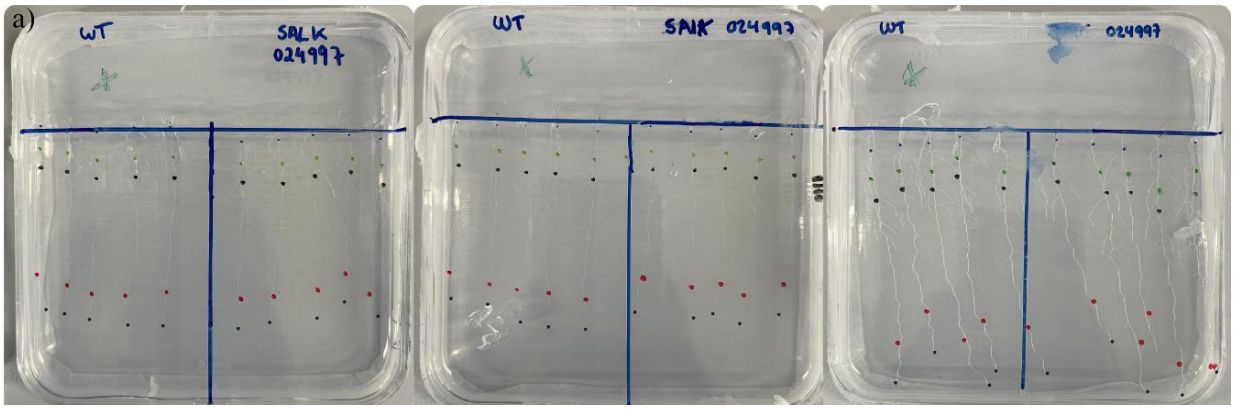
función está más ligada al crecimiento y desarrollo que al mantenimiento o envejecimiento de los tejidos. Estos resultados indican un patrón de expresión diferencial del gen *APC5*, con una actividad predominante en tejidos y estadios asociados con el desarrollo temprano de la planta. La alta expresión en tejidos como las raíces jóvenes, flores y semillas inmaduras refuerza la hipótesis de que este gen desempeña un papel crucial en el crecimiento y la proliferación celular en estas etapas iniciales y en el desarrollo y funcionalidad de las estructuras reproductivas (Borges *et al*., 2008).

Por otro lado, la baja expresión de *APC5* en hojas maduras, sépalos de flores maduras y semillas secas sugiere que su función está menos relacionada con el mantenimiento o envejecimiento de los tejidos. Este comportamiento diferencial es consistente con los estudios de Nakabayashi *et al.* (2005), que reportaron que la actividad de ciertos genes asociados al desarrollo es más pronunciada en estadios inmaduros, cuando la planta requiere una intensa actividad metabólica y proliferativa para completar su ciclo de vida.

7.4 Efectos fenotípicos de la interrupción del gen APC5

Para evaluar los efectos fenotípicos de la interrupción del gen *APC5* en *Arabidopsis thaliana*, se consideraron dos parámetros: la longitud radicular y la viabilidad embrionaria de las silicuas. En este análisis, la longitud radicular fue medida a los 15 DAS en plantas WT SALK y SALK_024997 cultivadas en placas *in vitro* (Figura 11). Las mediciones fueron realizadas utilizando el softward ImageJ, y los datos obtenidos se tabularon (Anexo 8) y graficaron (Gráfico 2).

Figura 11. *Resultados de la medición longitudinal radicular.*



Nota: Placas in vitro cultivadas con WT y SALK_024997 con 15 DAS

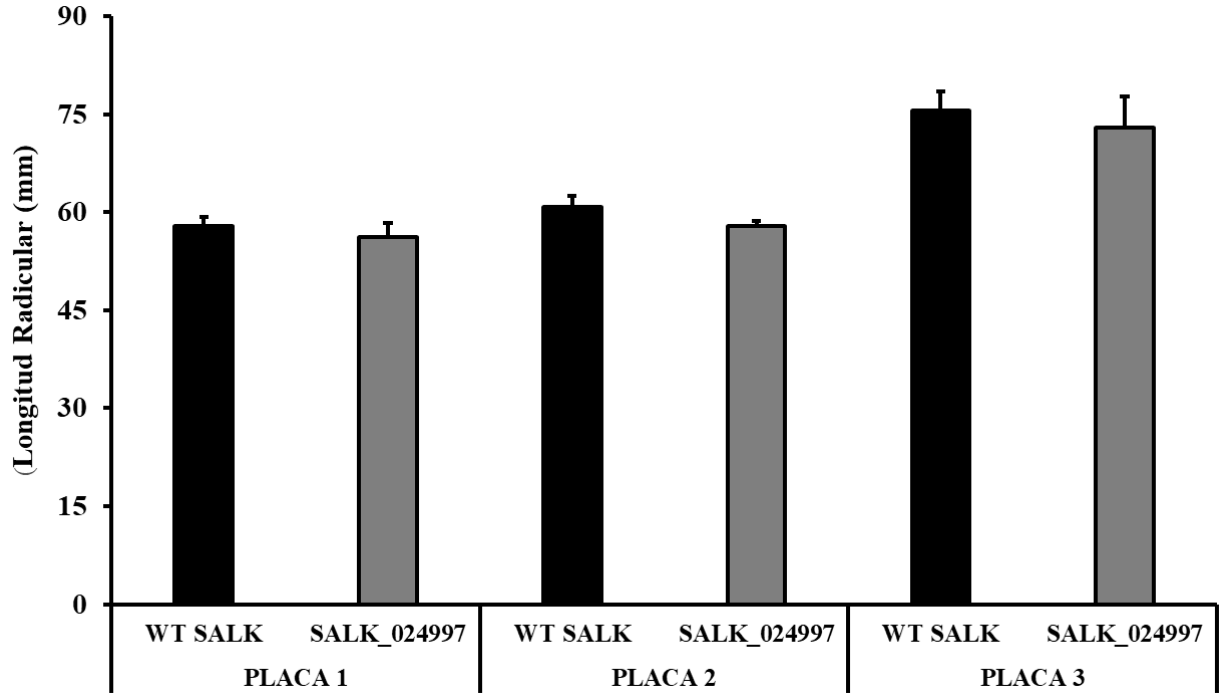


Gráfico 2. *Longitud Radicular.*

Nota: a) Fotografía de las placas in vitro con plantas WT y SALK_024997 cultivadas en medio MS. b) Gráfica de la longitud promedio de las raíces. Se observa que no hay diferencias significativas en el crecimiento radicular entre ambas líneas genéticas, aunque las plantas WT presentan un crecimiento ligeramente superior en algunas placas.

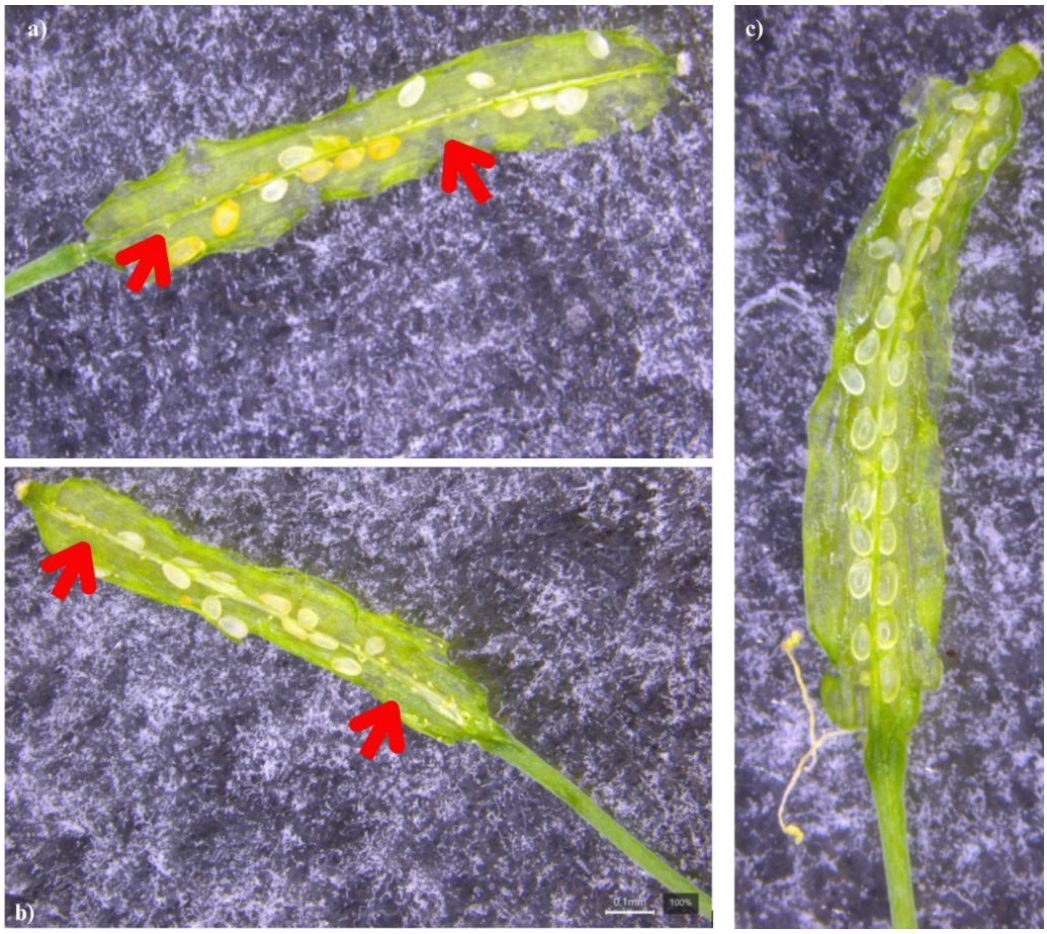
Los resultados demostraron que no hay diferencias significativas en la longitud radicular entre las plantas WT SALK y la mutantes SALK_024997. Aunque se observó una ligera

variación en las tres placas analizadas (con diferencias promedio de1,6 mm, 3 mm y 2,6 mm en las placas 1, 2 y 3, respectivamente), estas diferencias no son estadísticamente relevantes. Este resultado sugiere que la interrupción del gen *APC5* no afecta significativaamente el desarrollo radicular en esta etapa de crecimiento *A. thaliana*.

Desde un punto de vista funcional, estos resultados pueden explicarse por la repetición parcial o completa de los genes relacionados con el complejo APC/C. Estudios previos, como los realizados por Capron *et al.* (2003), han demostrado que las subunidades del APC/C suelen tener funciones compensatorias en la regulación del ciclo celular. En el caso de *APC5*, su función en la regulación del ciclo celular puede ser suplida por otras subunidades del complejo o vías metabólicas redundantes, especialmente en un estado heterocigótico, como el presente en SALK_024997.

Además, la falta de impacto significativo en la longitud radicular es consistente con la observación de que *APC5* tiene niveles de expresión más altos en etapas iniciales y en tejidos específicos, como se discutió en los análisis previos de expresión *in silico*.

Figura 12. *Visualización de los óvulos dentro de las silicuas*



Nota: Imágenes obtenidas mediante lupa estereoscópica que muestran: a), b) Silicuas de plantas SALK_024997 con flechas indicando óvulos abortados. c) Silicuas de plantas WT usadas como control, donde no se observan óvulos abortados. Este análisis respalda el impacto de la mutación en la viabilidad embrionaria.

La viabilidad embrionaria fue evaluada en silicuas de las plantas *A. thaliana* SALK_024997, que poseen la inserción de T-DNA, y en plantas WT como referencia. Las silicuas fueron abiertas (Figura 12) y, utilizando una lupa Leica, se realizó un conteo de los óvulos totales y los óvulos abortados, calculando así el porcentaje de viabilidad embrionaria (Anexo 9, Anexo 10 y Gráfico 3). Los resultados mostraron que las silicuas de las plantas SALK_024997 presentan un mayor número de óvulos abortados, alcanzando un porcentaje de

viabilidad del 50 %, mientras que la planta 11, que no mostró la inserción del T-DNA, pero presentó la banda WT de referencia, que también presentó un 97 % con un mínimo de 0-1 óvulos abortados por silicua. Este porcentaje fue comparable al observado en una planta WT de referencia, que también presentó un 97% de viabilidad embrionaria (Gráfico 3).

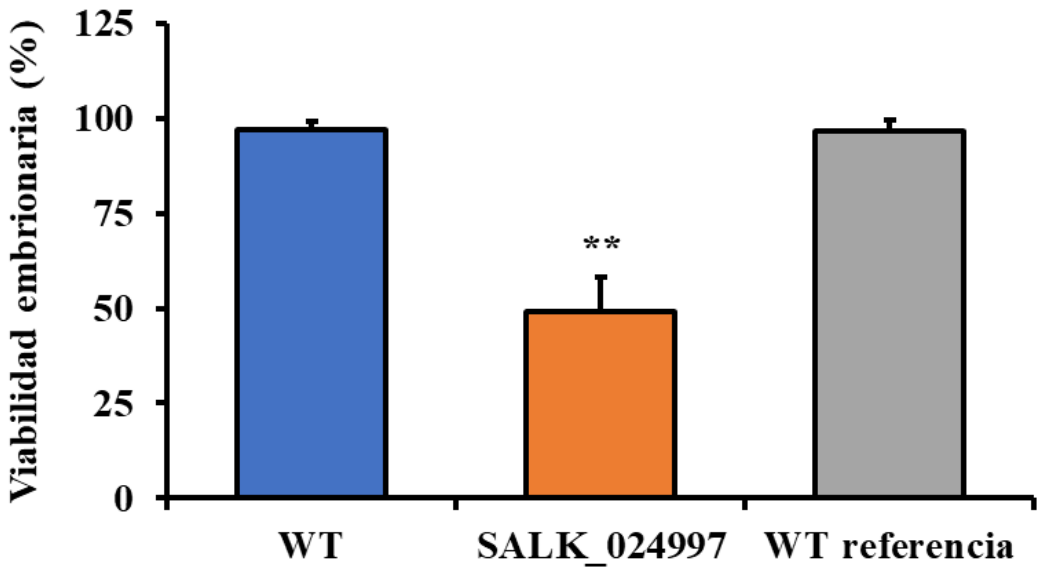


Gráfico 3. *Viabilidad embrionaria de plantas SALK_024997 y WT.*

Nota: Este gráfico compara el porcentaje de viabilidad embrionaria entre las plantas heterocigóticas SALK_024997 y las plantas silvestres (WT). Los datos, calculados a partir del conteo de óvulos totales y abortados en silicuas, muestran una reducción significativa en la viabilidad de las plantas SALK_024997 (50 %) en comparación con las plantas WT (97 %). Los valores corresponden a la media ± error estándar de la media de cuatro réplicas biológicas. *** $p < 0{,}001$. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la mutación en el gen APC5 afecta los procesos reproductivos de *A. thaliana*.

Estos resultados sugieren que la interrupción del gen *APC5* está afectando negativamente los órganos reproductivos, específicamente la viabilidad de los óvulos. Esto puede explicarse por el papel crucial del complejo APC/C, al cual pertenece *APC5*, en la correcta formación de los

gametofitos, como se ha reportado previamente en *Arabidopsis thaliana* (Capron *et al.*, 2003; Eloy *et al*. 2012). La reducción en la viabilidad embrionaria en las plantas SALK_024997 podría deberse a la interrupción de procesos clave durante la formación o desarrollo de los óvulos, lo que resultaría en abortos embrionarios.

La comparación con la planta 11, que no presenta la inserción del T-DNA pero muestra niveles normales de viabilidad embrionaria similares a las plantas WT, refuerza la idea de que la mutación en *APC5* es responsable de la disminución observada en la viabilidad. Estos resultados son consistentes con la literatura, donde se ha destacado que genes relacionados con el complejo APC/C tienen papeles esenciales en la división celular y la estabilidad genética durante la reproducción (Nakabayashi *et al., 2005*).

Así, estos resultados evidencian que la interrupción del gen *APC5* tiene un impacto directo en la viabilidad embrionaria de *A. thaliana*, probablemente debido a su participación en procesos reproductivos esenciales. Aún, muestra la necesidad de realizar estudios adicionales, como experimentos de expresión génica en óvulos abortados y análisis funcionales de mutantes, para entender mejor el mecanismo por el cual *APC5* regula el desarrollo reproductivo en plantas.

8. CONCLUSIONES

A pesar de los avances significativos, las funciones específicas del complejo APC/C en plantas permanecen parcialmente inexploradas, por tanto, el presente trabajo busco la apertura de la línea de investigación en el APC5, presentando un pequeño punto de partida para mayores investigaciones. A partir del siguiente trabajo se pudo concluir:

- La caracterización genotípica confirma que las plantas SALK_024997 son heterocigóticas para la mutación en el gen APC5, lo que implica la presencia de un alelo silvestre y otro mutante.
- Los análisis de RT-qPCR mostraron una ligera reducción en la expresión del gen APC5 en las plantas heterocigóticas en comparación con las plantas silvestres. Este hallazgo es coherente con la naturaleza heterocigótica de la mutación y sugiere que la interrupción del gen tiene un efecto limitado sobre la transcripción.
- La longitud radicular no presentó diferencias significativas entre las plantas silvestres y las mutantes, lo que indica que la interrupción del gen APC5 no afecta este aspecto del desarrollo vegetal.
- La viabilidad embrionaria, sin embargo, mostró una disminución significativa en las plantas mutantes, con un porcentaje de viabilidad del 50 % en comparación con el 97 % de las plantas silvestres. Esto sugiere un impacto importante de la mutación en los órganos reproductivos.
- Los ensayos GUS y el análisis *in silico* revelaron que la expresión del gen APC5 se concentra en regiones específicas de la planta, incluidas raíces, hojas y flores,

en especial en etapas inmaduras y de desarrollo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que APC5 desempeña un papel regulador en el desarrollo tisular y la diferenciación.

9. RECOMENDACIONES

Aunque los resultados hayan cumplido con los objetivos, y el laboratorio cumpla con la normativa se recomienda:

- Establecer un protocolo para el cultivo de *Arabidopsis thaliana* con las condiciones y equipos con los que cuenta el laboratorio, esto en aras de evitar fluctuaciones y mejorar los resultados.
- Establecer protocolos de limpieza y desinfección de los equipos para evitar la contaminación de las muestras con hongos.
- Optimizar las prácticas de manipulación de reactivos, asegurando el uso constante de guantes estériles para prevenir la contaminación cruzada y la posible degradación de los compuestos utilizados en los experimentos
- Se sugiere realizar réplicas adicionales del experimento con el fin de validar los resultados obtenidos, asegurando su reproducibilidad y fortaleciendo la confiabilidad de las conclusiones.

10. REFERENCIAS

Acquaviva, C., & Pines, J. (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *Journal of Cell Science*, *119*(12), 2401-2404. https://doi.org/10.1242/jcs.02937

Akie Shimotohno, Shiori S. Aki, Naoki Takahashi, & Masaaki Umeda. (2021). *Regulación del ciclo celular vegetal en respuesta a las hormonas y al medio ambiente—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33689401/

Andrade, G. M. de, Sartoretto, L. M., & Brasileiro, A. C. M. (2003). Biologia molecular do processo de infecção por Agrobacterium spp. Fitopatologia Brasileira, 28, 465-476. https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000500001

Arabidopsis thaliana. (2024). iNaturalist Ecuador. Recuperado el 11 de diciembre de 2024, de https://ecuador.inaturalist.org/taxa/55021-Arabidopsis-thaliana

BAR. (2024). *Planta electrónica*. Recuperado 28 de noviembre de 2024, de https://bar.utoronto.ca/eplant/

Bentley, A. M., Williams, B. C., Goldberg, M. L., & Andres, A. J. (2002). Phenotypic characterization of Drosophila ida mutants: Defining the role of APC5 in cell cycle progression. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 5), 949-961. https://doi.org/10.1242/jcs.115.5.949

Birchler JA, Riddle NC, Auger DL, Veitia RA. Dosage balance in gene regulation: biological implications. Trends Genet. 2005 Apr;21(4):219-26. doi: 10.1016/j.tig.2005.02.010.

Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijó JA, Becker JD. Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. Plant Physiol. 2008 Oct;148(2):1168-81. doi: 10.1104/pp.108.125229.

Burssens, S., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1998). The cell cycle in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry, 36(1–2), 9–19. https://doi.org/10.1016/s0981-9428(98)80087-9

Capron A, Serralbo O, Fülöp K, Frugier F, Parmentier Y, Dong A, Lecureuil A, Guerche P, Kondorosi E, Scheres B, Genschik P. The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. Plant Cell. 2003 Oct;15(10):2370-82. doi: 10.1105/tpc.013847

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 16(6), 735-743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x. PMID: 10069079

CTNBio. (2024). *Resolución Normativa N° 40, de 29 de abril de 2024—Resoluciones Normativas—Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad$ &ndash CTNBio*. https://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-40-de-29-de-abril-de-2024

Cuesta, C. y. C. E. (2012). *ARABIDOPSIS THALIANA COMO ORGANISMO MODELO EN BIOLOGÍA*. Researchgate.net. https://www.researchgate.net/profile/Eduardo-Cires/publication/260076781_Arabidopsis_thaliana_como_organismo_modelo_en_Bi

ologia/links/5400f24b0cf2bba34c1ae30c/Arabidopsis-thaliana-como-organismo-modelo-en-Biologia.pdf

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1, 13-15, 1991.

Eguiarte, L. E., Castillo, A., & Souza, V. (2003). Evolución molecular y genómica en angiospermas. Interciencia, 28(3), 141-147. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0378-18442003000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Eloy, N. B., de Freitas Lima, M., Ferreira, P. C. G., & Inzé, D. (2015). The Role of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Plant Growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(5), 487-505. https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1078613

Eloy, N. B., de Freitas Lima, M., Van Damme, D., Vanhaeren, H., Gonzalez, N., De Milde, L., Hemerly, A. S., Beemster, G. T. S., Inzé, D., & Ferreira, P. C. G. (2011). The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 68(2), 351–363. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2011.04691.x

Eloy, N. B., Gonzalez, N., Van Leene, J., Maleux, K., Vanhaeren, H., De Milde, L., Dhondt, S., Vercruysse, L., Witters, E., Mercier, R., Cromer, L., Beemster, G. T. S., Remaut, H., Van Montagu, M. C. E., De Jaeger, G., Ferreira, P. C. G., & Inzé, D. (2012). SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(34), 13853-13858. https://doi.org/10.1073/pnas.1211418109

Enserink, J. M., & Chymkowitch, P. (2022). Cell Cycle-Dependent Transcription: The Cyclin Dependent Kinase Cdk1 Is a Direct Regulator of Basal Transcription Machineries. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/ijms23031293

ePlant. (2024). Utoronto.Ca. Retrieved December 3, 2024, from https://bar.utoronto.ca/eplant/

Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). Agrobacterium tumefaciens como agente patógeno. Trends in Plant Science, 8(8), 380-386. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6

Francis, D. (2007). The plant cell cycle − 15 years on. The New Phytologist, 174(2), 261–278. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02038.x

Gan, H. M., & Savka, M. A. (2018). One More Decade of Agrobacterium Taxonomy. En S. B. Gelvin (Ed.), Agrobacterium Biology (Vol. 418, pp. 1-14). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2018_81

Gopal Banerjee, Dhanraj Singh, Alok Krishna Sinha, & ,. (2020). *Reguladores del ciclo celular de las plantas: La proteína quinasa activada por mitógenos, ¿un nuevo interruptor regulador? - ScienceDirect*. Recuperado 19 de noviembre de 2024, de https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945220302661?via%3Dihub

Gordon, J. E., & Christie, P. J. (2014). The *Agrobacterium* Ti plasmids. *Microbiology Spectrum*, *2*(6). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0010-2013

Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L. A., Bhattacharyya, D.,

Bhaya, D., Sobral, B. W., Beavis, W., Meinke, D. W., Town, C. D., Somerville, C., & Rhee, S. Y. (2001). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): A comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research*, *29*(1), 102-105. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29827/

JBrowse. (2024). AT1G06590.1. Retrieved 2024, from https://jbrowse.arabidopsis.org/index.html?data=Araport11&loc=Chr1%3A2015881..202 5168&tracks=TAIR10_genome%2CA11-GL%2CA11-PC%2CSALK_tDNAs&highlight=

Khan Academy. (s/f). Khanacademy.org. Recuperado el 20 de noviembre de 2024, de https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/cellcycle/a/phases-of-mitosis

Khan, H., Manan, A., Shah, S. y Raheem, M. (2022). Una revisión sistemática sobre el aislamiento, la identificación y la caracterización de Agrobacterium tumefaciens a partir de plantas leguminosas. Revista de Ciencia y Tecnología Aplicadas de Oriente Medio . https://doi.org/10.46431/mejast.2022.5403

Lataster, L., Huber, HM, Böttcher, C., Föller, S., Takors, R. y Radziwill, G. (2023). Control del ciclo celular mediante la proteína inhibidora del ciclo celular regulada optogenéticamente p21. Biology , 12 (9), 1194. https://doi.org/10.3390/biology12091194

Lee, P.-H., & Osley, M. A. (2021). Who gets a license: DNA synthesis in quiescent cells re-entering the cell cycle. *Current Genetics*, *67*(4), 539-543. https://doi.org/10.1007/s00294-021-01170-7

Lima, M. deF, Eloy, N. B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., de Oliveira, A. C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. (2010). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 254. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-254

Lima, L. F. P., Salvador, R. B., Secretti, E., & Dettke, G. A. (s. f.). Flora e Funga do Brasil—Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Recuperado 11 de noviembre de 2024, de https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=&idsFilhosFungos=&lingua=&grupo=5&genero=Arabidopsis&especie=thaliana&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica

Lin, Y.-C., & Prasanth, S. G. (2021). Replication initiation: Implications in genome integrity. *DNA Repair*, *103*, 103131. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103131

López, M. M. (1991). Género Agrobacterium. En Electronico (pp. 149-168). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/8563

Marrocco, K., Bergdoll, M., Achard, P., Criqui, M.-C., & Genschik, P. (2010). Selective proteolysis sets the tempo of the cell cycle. Current Opinion in Plant Biology, 13(6), 631–639. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.07.004

Martineau, B., Voelker, T., & SAnders, R. (s.f.). Sobre la definición del ADN-T | La célula vegetal | Oxford Academic. Recuperado 18 de noviembre de 2024, de https://academic.oup.com/plcell/articleabstract/6/8/1032/5984819?redirectedFrom=fulltext&login=false

Melloy, P. G. (2020). The anaphase-promoting complex: A key mitotic regulator associated with somatic mutations occurring in cancer. Genes, Chromosomes & Cancer, 59(3), 189–202. https://doi.org/10.1002/gcc.22820

Mohseni-Salehi, F. S., Zare-Mirakabad, F., Sadeghi, M., & Ghafouri-Fard, S. (2020). A Stochastic Model of DNA Double-Strand Breaks Repair Throughout the Cell Cycle. *Bulletin of Mathematical Biology*, *82*(1), 11. https://doi.org/10.1007/s11538-019-00692-z

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

Nadejda Koloteva-Levine, D. Pinchasi, Idan Pereman, Amit Zur, M. Brandeis, & O. Elroy-Stein. (s.f.). *La subunidad Apc5 del complejo promotor de anafase/ciclosoma interactúa con la proteína de unión a poli(A) y reprime la traducción mediada por el sitio de entrada interno del ribosoma: Biología molecular y celular: Vol. 24, n.º 9—Obtener acceso*. Recuperado 29 de noviembre de 2024, de

https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1128/MCB.24.9.3577

3587.2004?scroll=top&needAccess=true

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. Plant J. 2005 Mar;41(5):697-709. doi: 10.1111/j.1365- 313X.2005.02337.x.

NCBI. (2024). Arabidopsis thaliana. NCBI. Recuperado 16 de noviembre de 2024, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/3702/

O'Malley, R. C., Barragan, C. C., & Ecker, J. R. (2015). A User's Guide to the Arabidopsis T-DNA Insertional Mutant Collections. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1284*, 323-342. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_16

Pennycook, B. R., & Barr, A. R. (2020). Restriction point regulation at the crossroads between quiescence and cell proliferation. *FEBS Letters*, *594*(13), 2046-2060. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13867

Qi, F., & Zhang, F. (2020). Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. *Frontiers in Plant Science*, *10*. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01765

Saleme, M. de L. S., Andrade, I. R., & Eloy, N. B. (2021). The Role of Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) in Plant Reproduction. *Frontiers in Plant Science*, *12*. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.642934

Sánchez, S., & Teresa., M. (2019). *Machine learning para la selección de genes implicados en el desarrollo de Arabidopsis thaliana utilizando datos de expresión génica*.

https://openaccess.uoc.edu/bitstream/10609/91266/6/saurasanchezTFM0119memoria.pdf

SALK_024997.29.40.x Arabidopsis thaliana TDNA insertion lines Arabidop - Nucleotide - NCBI. (2024). Nih.gov. Recuperado el 29 de noviembre de 2024, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/BZ661525

SIGnAL. (2024). A sequence-indexed library of insertion mutations in the Arabidopsis genome. Salk.edu. Retrieved December 3, 2024, from http://signal.salk.edu/tabout.html

Schwedersky RP, Saleme MLS, Rocha IA, Montessoro PDF, Hemerly AS, Eloy NB, Ferreira PCG. The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Subunit 11 and Its Role in Organ Size and Plant Development. Front Plant Sci. 2021 Nov 23;12:563760. doi: 10.3389/fpls.2021.563760.

Stein, K. K., Nesmith, J. E., Ross, B. D., & Golden, A. (2010). Functional redundancy of paralogs of an anaphase promoting complex/cyclosome subunit in Caenorhabditis elegans meiosis. Genetics, 186(4), 1285–1293. https://doi.org/10.1534/genetics.110.123463

TAIR - Arabidopsis. (2024). Arabidopsis.org. Recuperado el 29 de noviembre de 2024, de https://www.arabidopsis.org/locus?name=AT1G06590

TAIR - Arabidopsis. (2024-b). Arabidopsis.org. Recuperado el 29 de noviembre de 2024, de https://www.arabidopsis.org/polyallele?key=500169847

TAIR - Sequence Viewer. (2024). Arabidopsis.org. Retrieved December 2, 2024, from https://seqviewer.arabidopsis.org/servlets/sv?action=seq&start=2015906&length=10000 &band=0&option2=0

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, *408*(6814), 796-815. https://doi.org/10.1038/35048692

Thermofisher. (2024). *GeneChip Command Console Software - US*. https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/microarray-analysis/microarray-analysis-instruments-software-services/microarray-analysis-software/affymetrix-genechip-command-console-software.html

Tzfira, T., Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). Nuclear Import of Agrobacterium T-DNA. En Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6493/

Veylder, L. D., Joubès, J., & Inzé, D. (2003). Plant cell cycle transitions. Current Opinion in Plant Biology, 6(6), 536–543. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.09.001

Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z.-L., Liu, J., & Qu, L.-J. (2013). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, *55*(1), 64-74. https://doi.org/10.1111/jipb.12018

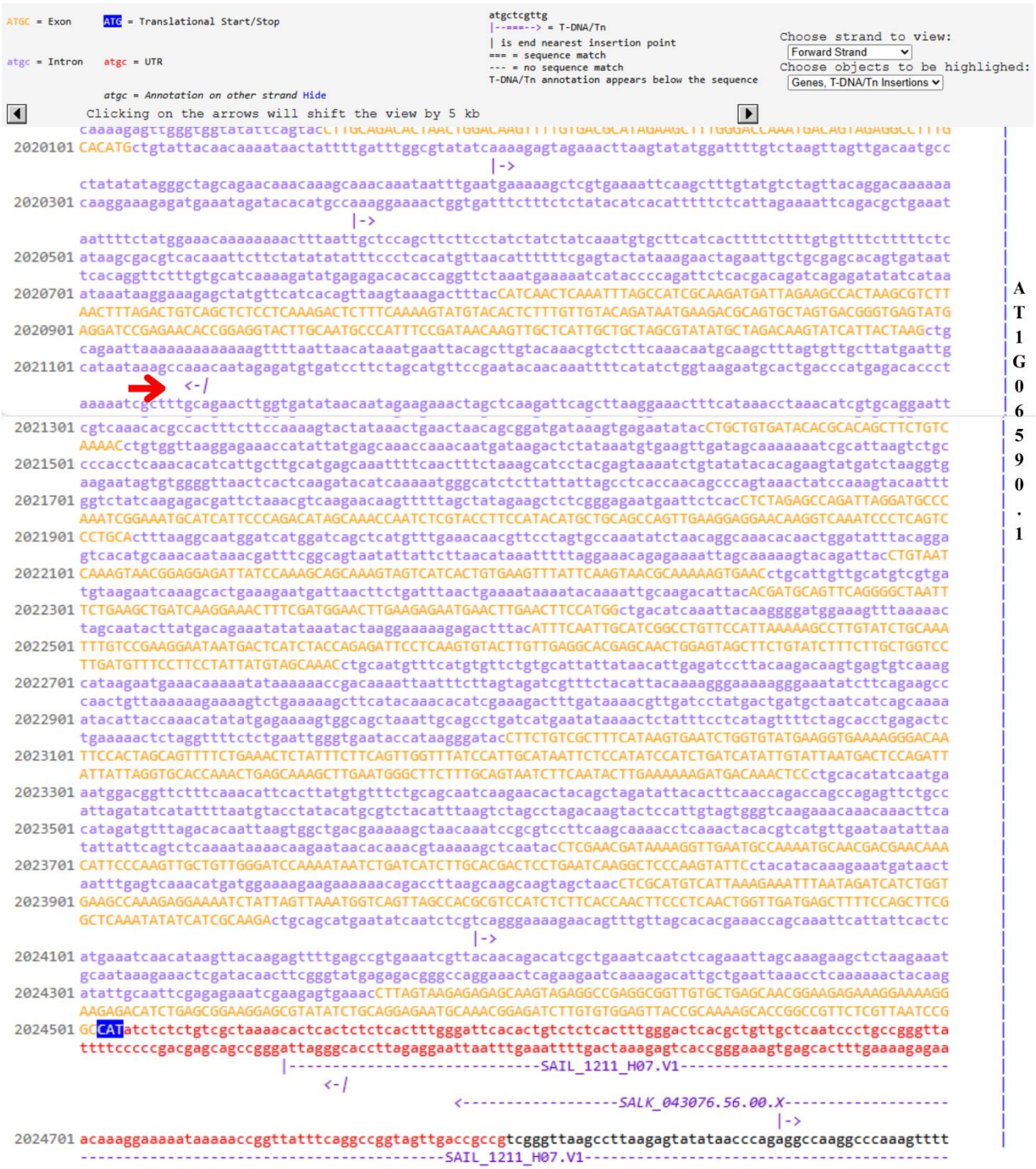
Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J., & Qu, L.-J. (2012). The Arabidopsis APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for

both female gametogenesis and embryogenesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *69*(2), 227–240. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2011.04785.x

Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P. D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M. J., Mann, M., & Nasmyth, K. (1998). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5354), 1216–1219. https://doi.org/10.1126/science.279.5354.1216

11. ANEXOS

Anexo 1. *SeqViewer Nucleotide View*



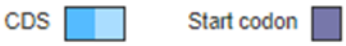
Nota: Secuencia del gen APC5, en amarillo se marcan los exones y en azul los intrones. La flecha roja marca donde entra la inserción de T-DNA. Figura tomada de TAIR, (*TAIR - Sequence Viewer*, s.f.), en: Chromosome 1 start: 2015901 length: 10000

Anexo 2. *Tabla de primers utilizados para la amplificación del gen GADPH, y aplicación de la RT-qPCR con los primers APC5 y UBQ10.*

PRIMER	SECUENCIA
GAPDH FW	TCCGTGTTCCAACCGTTGAT
GAPDH RV	GCCTTGGCATCGAAAATGCT
APC5 FW	CAGCAAATGTGGCACACTCC
APC5 RV	GCAAAACGAGATTGCTTGCCA
UBQ10 FW	CACACTCCACTTGGTCTTGCGT
UBQ10 RV	TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA

Anexo 3. *Secuencias de los primers utilizados para el análisis PCR GAPDH*

GAPDH_ AT1G13440



Primer FW: TCCGTGTTCCAACCGTTGAT

Primer RV: GCCTTGGCATCGAAAATGCT

ATGGCTGACAAGAAGATCAGAATCGGAATCAACGGTTTCGGAAGAATCGGTCGTTTGGTTGC
TAGAGTTGTTCTTCAGAGGGATGATGTTGAGCTCGTCGCTGTTAACGATCCTTTCATCACCACC
GAGTACATGACATACATGTTTAAGTATGACAGTGTTCACGGTCAGTGGAAGCACCATGAGCTT
AAGGTGAAGGATGACAAAACTCTTCTCTTCGGTGAGAAGCCAGTCACTGTTTTCGGCATCAG
GAACCCTGAGGACATCCCATGGGGTGAGGCTGGAGCTGACTTTGTTGTTGAGTCTACTGGTGT
CTTCACTGACAAAGACAAGGCTGCTGCTCACTTGAAGGGTGGTGCTAAAAAGGTTGTCATCT
CTGCCCCAAGCAAAGATGCGCCCATGTTCGTTGTTGGTGTCAACGAGCACGAGTACAAGTCT

GACCTTGACATTGTTTCCAACGCTAGTTGCACCACTAACTGCCTTGCTCCTCTTGCCAAGGTTA
TTAATGACAGGTTTGGCATTGTTGAGGGACTCATGACCACTGTCCACTCTATCACTGCTACTCA
GAAGACAGTTGATGGTCCATCAATGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTGCTTCCTTCAACA
TTATTCCTAGCAGCACTGGTGCCGCCAAGGCTGTTGGGAAAGTGTTGCCATCCCTCAATGGAA
AATTGACCGGAATGTCTTTCCGTGTTCCAACCGTTGATGTCTCAGTTGTTGATCTCACCGTTAG
ACTTGAGAAAGCTGCAACATACGACGAAATCAAGAAGGCCATCAAGGAGGAATCTGAAGGC
AAAATGAAGGGAATTTTGGGATACACTGAGGATGATGTTGTGTCTACCGACTTTGTTGGTGAC
AACAGGTCAAGCATTTTCGATGCCAAGGCTGGGATTGCATTGAGCGACAAGTTTGTGAAGTT
GGTGTCATGGTACGACAACGAATGGGGTTACAGTTCTCGTGTCGTTGACCTTATCGTTCACAT
GTCAAAGGCCTAA

Anexo 4. *Tabla de resultados de la cuantificación del ARN en el equipo NanoDrop de la marca Thermo Fisher*

Muestras	Concentración en ng/µL	260/280	260/230
WT.1	2075,3	2,11	2,09
WT.2	2321,8	2,11	2,09
WT.3	369,1	2,09	1,88
SALK.1	2023,4	2,08	2,10
SALK.2	1703,4	2,12	2,12
SALK.3	928,8	2,16	2,23

Anexo 5. *Tabla de resultados de la cuantificación del cDNA, medido en el equipo NanoDrop.*

Muestra	Concentración de ácido nucleico ng/µL	A260	A280	260/280	260/230
WT.1	1103,2	22,065	12,381	1,78	1,63
WT.2	1254,4	25,088	13,886	1.81	1,88
WT.3	1164,9	23,298	13,130	1,77	1,66
SALK.1	1064,5	21,290	11,882	1,79	1,66
SALK.2	1024,8	20,496	11,416	1,80	1,64

SALK.3	948,9	18,978	10,618	1,79	1,54

Anexo 6. *Guía del montaje de la placa para la RT-qPCR*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WT_{SALK}.1	WT_{SALK}.3	SALK.3	WT_{SALK}.3	SALK.2							BRANCO
B	WT_{SALK}.1	SALK.1	SALK.3	WT_{SALK}.3	SALK.3							
C	WT_{SALK}.1	SALK.1	WT_{SALK}.1	WT_{SALK}.3	SALK.3							
D	WT_{SALK}.2	SALK.1	WT_{SALK}.1	SALK.1	SALK.3							BRANCO
E	WT_{SALK}.2	SALK.2	WT_{SALK}.1	SALK.1								
F	WT_{SALK}.2	SALK.2	WT_{SALK}.2	SALK.1								
G	WT_{SALK}.3	SALK.2	WT_{SALK}.2	SALK.2								
H	WT_{SALK}.3	SALK.3	WT_{SALK}.2	SALK.2								

Nota: En azul se marca los pocillos dispuestos para el gen APC5, en amarillo para el gen endógeno ubiquitina 10.

Anexo 7. *Tabulación de los datos arrojados por el equipo de la RT-qPCR*

	UBIQUITINA (UBI)					APC5										
Sample	Ct1	Ct2	Ct3	Average Ct	Sample	Ct1	Ct2	Ct3	Average Ct	ΔCt	ΔΔCt	2^-(ΔΔCt)		Média	Desvio.pad	Erro.pad	*t test*
WT 1	19,24	19,30	19,10	19,21	WT 1	24,1589	23,5895	23,5123	23,75	4,54	0,10	0,93					
WT 2	16,28	16,19	16,17	16,21	WT 2	20,4506	20,5935	20,6057	20,55	4,34	-0,10	1,07	WT	1,00	0,098115	0,05665	*0,310418387*
WT 3	27,15	27,22	27,39	27,25	WT 3	32,5329	37,1596	32,541	34,01	6,76	2,32	0,20					
SALK 1	19,62	19,59	19,51	19,57	SALK 1	22,7606	23,3591	23,328	23,15	3,58	-0,86	1,82	SALK	0,92	0,053562	0,03092	
SALK 2	19,70	19,39	19,44	19,51	SALK 2	23,9135	23,8688	24,2534	24,01	4,50	0,06	0,96					
SALK 3	16,98	16,96	16,90	16,95	SALK 3	21,5162	21,386	21,8095	21,57	4,62	0,18	0,88					
Control					Control					4,44							
average					average												

Anexo 8.*Tabulación de la medición longitudinal de las raíces, de las placas in vitro. Medidas por el software ImageJ.*

PLACAS IN VITRO MEDICIÓN EN MILIMETROS						
PLANTA	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	WT SALK	SALK_024997	WT SALK	SALK_024997	WT SALK	SALK_024997
1	59	51	56	58	72	72
2	61	54	61	60	75	81
3	58	57	61	57	81	69
4	55	59	62	58	70	81
5	56	60	64	56	80	62
PROMEDIO	57,8	56,2	60,8	57,8	75,6	73
PLANTA	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	WT SALK	SALK_024997	WT SALK	SALK_024997	WT SALK	SALK_024997
PROMEDIO	57,8	56,2	60,8	57,8	75,6	73
DESVIO	2,387467277	3,701351105	2,949576241	1,483239697	4,827007354	8,154753215
ERROR	1,378404875	2,136976057	1,702938637	0,856348839	2,786873995	4,708148964
T test	0,4401321		0,0766362		0,556577831	

Anexo 9.*Tabla de Viabilidad embrionaria en plantas SALK_024997 y WT.*

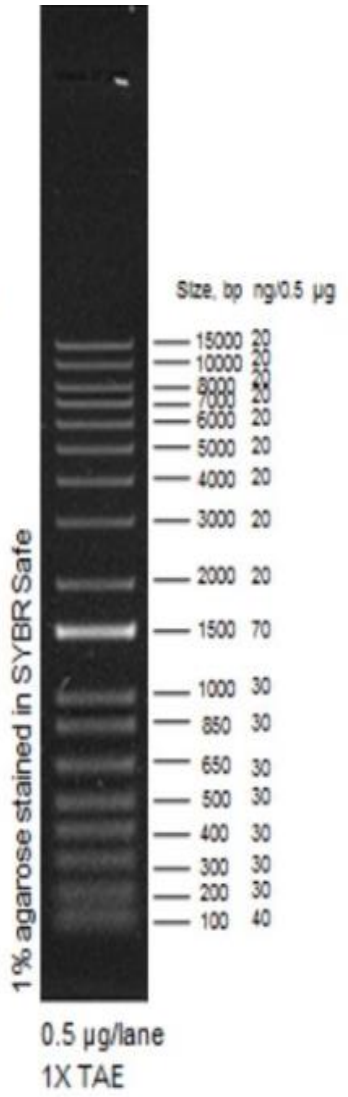
ANALISIS VIABILIDAD EMBRIONARIA									
SILICUA	**PLANTA 11**			**PLANTA SALK_024997**			**PLANTA WT REFERENCIA**		
	Óvulos totales	**Óvulos abortados**	**Total viables**	**Óvulos totales**	**Óvulos abortados**	**Total viables**	**Óvulos totales**	**Óvulos abortados**	**Total viables**
1	**48**	**4**	**44**	**36**	**21**	**15**	**27**	**3**	**24**
2	**46**	**2**	**44**	**39**	**15**	**24**	**31**	**0**	**31**
3	**50**	**0**	**50**	**48**	**18**	**30**	**38**	**1**	**37**
4	**47**	**0**	**47**	**39**	**27**	**12**	**39**	**0**	**39**
SUMATORIA	**191**	**6**	**185**	**162**	**81**	**81**	**135**	**4**	**131**
PORCENTAJE DE VIABILIDAD	**96,9**			**50**			**97,0**		

*Nota***:** Tabulación del conteo de los óvulos en las silicuas de plantas, con la inserción T-DNA, con el gen silvestre (WT) como referencia y con la planta 11 que no amplifico la mutación, correspondiendo a WT.

Anexo 10. *Estadística de la viabilidad embrionaria*

Ovulos totales	Total viables	%	Ovulos totales	Total viables	%	Ovulos totales	Total viables	%			
48	44	91,6667	36	15	41,6667	27	24	88,8889			
46	44	95,6522	39	24	61,5385	31	31	100		t test	0,001014982
50	50	100	48	30	62,5	38	37	97,3684	WT	SALK_024997	WT referencia
47	47	100	39	12	30,7692	39	39	100	96,82971	49,11858974	96,56432749
	Media	96,8297		Media	49,1186		Media	96,5643	2,312889	8,978650531	3,039857734
	Desviación	4,00604		Desviación	15,5515		Desviación	5,26519			
	Error	2,31289		Error	8,97865		Error	3,03986			

Anexo 11. *Ladder 1kpb marca invitrogen Thermo fisher*



Nota: Marcador de peso molecular utilizado como referencia en todas las PCR, figura tomada de :https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018?gclid=CjwKCAiA0rW6BhAcEiwAQH28IsSh3Yq2UozwmTsc66r31g2ksRu_oCmMTlKKhdVShDJXzjJvsVgdhoC5CcQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAiA0rW6BhAcEiwAQH28IsSh3Yq2UozwmTsc66r31g2ksRu_oCmMTlKKhdVShDJXzjJvsVgdhoC5CcQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!572074520526!e!!g!!invitrogen%201%20kb%20plus!11199571100!118288771828&cid=bid_mol_pch_r01_co_cp1358_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con&gad_source=1#/10787018

Anexo 12. *Secuencias y inserción de los primers APC5 utilizados para el análisis RT-qPCR*

APC5_ AT1G06590

CDS Start codon

Primer FW: CAGCAAATGTGGCACACTCC

Primer RV: GTCAACATACAGTACAAACATGCC

ATGGCCGGATTAACGAGAACGGCCGGTGCTTTTGCGGTAACTCCACACAAGATCTCCGTTTGC
ATTCTCCTGCAGATATACGCTCCTTCCGCTCAGATGTCTCTTCCTTTTCCTTTCTCTTCCGTTGC
TCAGCACAACCGCCTCGGCCTCTACTTGCTCTCTCTTACTAAGTCTTGCGATGATATATTTGAG
CCGAAGCTGGAAAAGCTCATCAACCAGTTGAGGGAAGTTGGTGAAGAGATGGACGCGTGGC
TAACTGACCATTTAACTAATAGATTTTCCTCTTTGGCTTCACCAGATGATCTATTAAATTTCTTTA
ATGACATGCGAGGAATACTTGGGAGCCTTGATTCAGGAGTCGTGCAAGATGATCAGATTATTT
TGGATCCCAACAGCAACTTGGGAATGTTTGTTCGTCGTTGCATTTTGGCATTCAACCTTTTATC
GTTCGAGGGAGTTTGTCATCTTTTTTCAAGTATTGAAGATTACTGCAAAGAAGCCCATTCAAG
CTTTGCTCAGTTTGGTGCACCTAATAATAATCTGGAGTCATTAATACAATATGATCAGATGGATA
TGGAGAATTATGCAATGGATAAACCAACTGAAGAAATAGAGTTTCAGAAAACTGCTAGTGGA
ATTGTCCCTTTTCACCTTCATACACCAGATTCACTTATGAAAGCGACAGAAGGTTTGCTACATA
ATAGGAAGGAAACATCAAGGACCAGCAAGAAAGATACAGAAGCTACTCCAGTTGCTCGTGCC
TCAACAAGTACACTTGAGGAATCTCTGGTAGATGAGTCATTATTCCTTCGGACAAATTTGCAG
ATACAAGGCTTTTTAATGGAACAGGCCGATGCAATTGAAATCCATGGAAGTTCAAGTTCATTC
TCTTCAAGTTCCATCGAAAGTTTCCTTGATCAGCTTCAGAAATTAGCCCCTGAACTGCATCGTG
TTCACTTTTTGCGTTACTTGAATAAACTTCACAGTGATGACTACTTTGCTGCTTTGGATAATCTC
CTCCGTTACTTTGATTACAGTGCAGGGACTGAGGGATTTGACCTTGTTCCTCCTTCAACTGGCT
GCAGCATGTATGGAAGGTACGAGATTGGTTTGCTATGTCTGGGAATGATGCATTTCCGATTTGG
GCATCCTAATCTGGCTCTAGAGGTTTTGACAGAAGCTGTGCGTGTATCACAGCAGCTTAGTAAT
GATACTTGTCTAGCATATACGCTAGCAGCAATGAGCAACTTGTTATCGGAAATGGGCATTGCAA
GTACCTCCGGTGTTCTCGGATCCTCATACTCACCCGTCACTAGCACTGCGTCTTCATTATCTGTA
CAACAAAGAGTGTACATACTTTTGAAAGAGTCTTTGAGGAGAGCTGACAGTCTAAAGTTAAG
ACGCTTAGTGGCTTCTAATCATCTTGCGATGGCTAAATTTGAGTTGATGCATGTGCAAAGGCCT

CTACTGTCATTTGGTCCCAAAGCTTCTATGCGTCACAAAACTTGTCCAGTTAGTGTCTGCAAG
GAAATAAGACTAGGGGCACACCTAATCAGCGACTTTTCTTCTGAAAGCTCTACAATGACAATT
GATGGTTCTCTAAGCTCGGCTTGGCTTAAAGACTTGCAAAAACCATGGGGTCCACCTGTGATT
TCCCCAGACTCCGGTTCTAGAAAAAGTTCAACTTTTTTTCAACTCTGTGATCATTTGGTCTCAA
TTCCTGGATCCGTGTCACAATTAATAGGTGCTTCTTATTTACTCCGGGCTACTTCATGGGAGTTA
TATGGCAGCGCTCCCATGGCTCGGATGAATACCTTGGTGTATGCAACTTTATTCGGTGACTCTT
CTAGTTCGTCTGACGCAGAGTTAGCATACTTGAAGCTCATTCAACATTTGGCACTATATAAGGG
ATACAAAGATGCCTTTGCTGCTCTTAAGGTCGCAGAGGAAAAGTTCTTAACCGTATCGAAATC
AAAAGTATTGTTGCTCAAGTTGCAACTACTACATGAGCGTGCCTTGCATTGTGGGAATTTAAA
ACTAGCTCAACGAATATGTAATGAGCTAGGAGGCTTGGCATCAACAGCCATGGGTGTAGACAT
GGAGCTAAAAGTAGAAGCAAGTCTTCGTGAAGCTCGGACTTTGCTTGCAGCAAAACAGTATA
GCCAGGCAGCAAATGTGGCACACTCCCTCTTCTGCACATGTCACAAATTCAATTTGCAAATCG
AAAAGGCGTCTGTTCTTCTTCTGCTCGCAGAGATCCATAAGAAGTCAGGAAATGCTGTCCTGG
GTCTTCCATATGCGCTGGCAAGCATCTCGTTTTGCCAGTCATTCAACTTGGATCTTCTCAAAGC
ATCAGCTACTCTCACTCTGGCCGAGCTTTGGCTTGGTCTTGGATCAAATCATACCAAACGAGC
ATTAGACCTTTTGCATGGGGCTTTCCCTATGATTCTTGGCCATGGAGGTTTGGAGTTGCGTGCT
CGAGCTTACATCTTTGAAGCAAACTGCTATCTATCTGATCCAAGTTCTTCAGTTTCCACAGATT
CTGACACTGTCTTGGATTCTCTAAGGCAAGCTTCAGATGAGCTTCAAGCTTTGGAGTACCATG
AACTGGCAGCGGAAGCCTCGTACTTAATGGCCATGGTATATGACAAGTTGGGACGGCTTGATG
AGAGGGAAGAAGCTGCGTCTTTGTTTAAGAAACATATCATAGCTCTCGAGAACCCTCAAGATG
TGGAACAAAACATGGCATGA