

Genómica Funcional de Plantas: Estudio del Desarrollo de Flores y Frutos

Nayelli Marsch Martínez*, Víctor Manuel Zúñiga Mayo**, José Irepan Reyes Olalde**, Octavio Rubén Salazar Moya*** y Stefan de Folter*

RESUMEN

La última fase del desarrollo floral es la fertilización de los óvulos y la formación de los frutos, que son muy importantes tanto biológica como económicamente. Notoriamente, más del 80% de los alimentos que son consumidos por el ser humano proviene de flores y frutos. La obtención de conocimientos acerca de las bases moleculares del desarrollo de frutos en especies modelo es de gran interés científico, y un paso indispensable para poder facilitar investigaciones y de ser factible, aplicaciones en frutos de consumo humano. Especialmente en un país como México, con tal riqueza en la diversidad de frutos, este tipo de estudios es necesario y científicamente muy interesante, y tiene repercusiones económicas potenciales importantes. La meta del laboratorio es descubrir genes nuevos involucrados en el desarrollo de frutos, empleando los recursos que brindan plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Se hace un enfoque especial en genes que afectan la identidad celular, morfología y que causan partenocarpia (frutos carentes de semillas), para más tarde estudiarlos en otras especies y hacer ensayos para conocer sus alcances en dichas especies.

ABSTRACT

The last stages of floral development are ovule fertilization and fruit formation. Fruits are very important both biologically and economically. Notably, more than 80% of human food is obtained from flowers and fruits. Gathering basic knowledge about the molecular mechanisms of fruit development from model species is of great scientific interest, and is an essential step to facilitate research and, when feasible, applications in fruits consumed by humans. Especially in countries like Mexico, which has such a great diversity of fruits, this kind of research is both necessary and scientifically interesting, and has potentially important economic repercussions. The goal of the lab is to discover new genes that are involved in flower development, making use of the resources provided by model plants like *Arabidopsis thaliana*. A special focus is made on genes and processes that can affect cell and tissue identity, morphology, and that can cause parthenocarpy (fruits without seed). These genes and processes can then be studied in other species and their effects in those species assessed.

Recibido: 4 de Agosto de 2008
Aceptado: 5 de Diciembre de 2008

INTRODUCCIÓN

El desarrollo floral es un proceso clave en todas las angiospermas y es esencial para la reproducción sexual. La última fase del desarrollo floral es la fertilización de los óvulos y la formación del fruto, que es muy relevante desde el punto de vista biológico y económico, ya que más del 80% de los alimentos proviene de flores y frutos.

El estudio de los procesos moleculares del desarrollo de plantas, además de ser muy interesante científicamente (saber cómo ocurre el desarrollo coordinado de diferentes tejidos de un organismo multicelular para producir una estructura de forma y tamaño definido) y necesario económicamente, es muy relevante en sí mismo, dada su importancia para la vida en el planeta.

Palabras clave:

Factores de Transcripción; Desarrollo de flores y frutos; Genómica; *Arabidopsis*.

Keywords:

Transcription factors; Flower and fruit development; Genomics; *Arabidopsis*.

La meta del grupo de investigación es el estudio de los mecanismos moleculares del desarrollo frutal, principalmente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, con un enfoque especial en Factores de Transcripción (FTs) que afecten la identidad celular, morfología y FTs que puedan causar partenocarpia (frutos sin semillas).

* Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio), CINVESTAV-IPN, Irapuato, Gto., México. Correos electrónicos: nmarsch@ira.cinvestav.mx y sdfolter@ira.cinvestav.mx.

** Estudiantes de programa de posgrado del CINVESTAV-IPN, Irapuato, Gto., México.

*** Estudiante de Licenciatura en Ciencias Genómicas, Campus Morelos, Cuernavaca, UNAM, México.

Los FTs son proteínas de unión a ADN que reconocen secuencias específicas y que son capaces de activar y/o reprimir la transcripción de genes, actuando como reguladores maestros de ciertos procesos. En general, muchas mutantes afectadas en el desarrollo, respuestas alteradas al medio ambiente o procesos metabólicos han sido asociadas con niveles alterados de expresión de FTs, pues la correcta regulación génica a nivel de transcripción es crucial para la mayoría de los procesos biológicos en una célula u organismo (Riechmann, 2002).

En principio, los esfuerzos del laboratorio se centran en la caracterización molecular del desarrollo del fruto de la planta *Arabidopsis thaliana* como modelo, con el fin de emplear los resultados obtenidos para guiar estudios en otras plantas, mexicanas principalmente, cuyos frutos sean utilizados para consumo humano o que tengan particularidades que se puedan estudiar en esta planta modelo.

ARABIDOPSIS THALIANA COMO PLANTA MODELO

Arabidopsis thaliana pertenece a la familia de las crucíferas y crece naturalmente en regiones de clima moderado de Asia, Europa y Africa del Norte, y



Figura 1. La planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

ha sido introducida en otras áreas como América del Norte y Australia. Crece bien en suelos arenosos donde el agua se filtra fácilmente. Se trata de una planta pequeña, de cerca de 30 cm de altura, dependiendo del ecotipo y de las condiciones de crecimiento. Su tamaño permite crecer un gran número de plantas en un espacio reducido. Aunque no tiene importancia comercial, *Arabidopsis* se ha empleado como modelo por muchos científicos por numerosas razones: Además de su tamaño compacto, su genoma es relativamente pequeño comparado con otras angiospermas. Con 125 Mb es aproximadamente 20 veces el tamaño de *Escherichia coli*, y 10 veces el de *Saccharomyces cerevisiae*. Su genoma ya ha sido secuenciado, y se estima que contiene cerca de 27 000 genes que codifican para proteínas, además de más de 6 000 que no codifican para proteínas [TAIR release 2008 www.arabidopsis.org, (Arabidopsis Genome Initiative, 2000)]. La disponibilidad del genoma y su tamaño facilitan mucho los estudios de mutagénesis y clonación de genes. *Arabidopsis* tiene 5 cromosomas (número haploide), y en contraste con algunas otras plantas, es diploide, lo cual facilita los estudios de mutaciones recesivas, ya que los efectos de dosis de genes son menores que en plantas poliploides. Además, el ciclo de vida de *Arabidopsis* dura entre seis y ocho semanas desde que se siembran las semillas y se vuelve a obtener la primera semilla, por lo que se pueden obtener muchas generaciones en un año, y puede crecerse en condiciones independientes de la estación en invernaderos o cámaras de crecimiento. Gracias a esto, los estudios genéticos pueden realizarse relativamente rápido. Asimismo, *Arabidopsis* se autofertiliza, por lo cual no requiere de mucho trabajo el mantenimiento de líneas mutantes homocigotas, y una sola planta puede producir miles de semillas, lo cual es muy útil en experimentos de mutagénesis. Por otro lado, si se requiere, es posible cruzar diferentes plantas de *Arabidopsis* y realizar análisis de interacciones genéticas (Anderson y Wilson, 2000; Weigel y Glazebrook, 2002).

Adicionalmente, los métodos de transformación genética de *Arabidopsis* se han simplificado al punto que la transformación se realiza poniendo inflorescencias jóvenes de plantas crecidas en tierra en contacto con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, seguido de la cosecha de las semillas y un paso final de selección, el cual se realiza generalmente empleando antibióticos o herbicidas (Clough y Bent, 1998).

Además de las características arriba mencionadas, que hacen a *Arabidopsis* una planta modelo muy adecuada, la comunidad científica que trabaja con esta planta ha generado una gran cantidad de colecciones

de mutantes, herramientas bioinformáticas, bases de datos útiles, y gran diversidad de líneas con construcciones que llevan genes reporteros bajo el control de diversos promotores, entre otras.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE ESTRATEGIAS DE MUTAGÉNESIS

En diferentes organismos, las mutantes han sido cruciales para descubrir y estudiar funciones génicas. Dichas mutantes pueden encontrarse naturalmente o ser generadas en el laboratorio. Para *Arabidopsis* se han generado poblaciones de mutantes mediante varias técnicas de mutagénesis como son: empleando compuestos químicos, radiación o por la inserción aleatoria de fragmentos de ADN como los transposones o T-DNA (ADN "transferido"). El uso de agentes insercionales como T-DNA o transposones permite la identificación del gen mutado de manera relativamente sencilla. La mutagénesis con T-DNA se basa en la inserción de un fragmento de ADN por medio de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que infecta naturalmente a la planta. Generalmente se trata de un fragmento codificado en un plásmido especial que ha sido modificado para fines de ingeniería genética (Gelvin, 2003). *Agrobacterium* inserta al T-DNA de manera casi aleatoria en el genoma de la planta y al insertarse dentro de las regiones codificantes o regulatorias de un gen, ocasiona su interrupción o alteraciones en su regulación que pueden dar lugar a la pérdida de su función. Esta estrategia es conocida como mutagénesis no dirigida y existen grandes proyectos cuyo objetivo es crear mutantes para los genes en *Arabidopsis* y otras especies con el fin de encontrar una función para cada gen (ej. Alonso *et al.*, 2003). En el laboratorio se hace uso de este tipo de inserciones, ya sean para la interrupción de genes, para su silenciamiento o sobreexpresión (o expresión alterada) con vectores o para la adición de nuevos genes a la planta.

Por otro lado, los transposones también son fragmentos de ADN, codificados en el genoma de diferentes organismos, y poseen la capacidad de moverse a diferentes posiciones del genoma (fenómeno denominado "transposición"). En esta estrategia de mutagénesis se hace uso de la capacidad de los transposones de transponerse a diferentes lugares del genoma de modo relativamente aleatorio, pudiendo provocar la interrupción de genes o sus regiones regulatorias. La mutagénesis con transposones se realiza haciendo uso de transposones ya presentes en el genoma del organismo en estudio ("endógenos") o transposones provenientes de otros organismos ("heterólogos"), por

ejemplo, otras plantas como maíz, en el caso de *Arabidopsis thaliana*. El uso de estos últimos facilita su localización en el genoma (Martienssen, 1998). Para introducirlos en la planta de interés se utiliza al T-DNA como un "acarreador".

Cuando se cuenta con la población de mutantes, para identificar la función de un gen se pueden emplear dos estrategias genéticas: La genética directa (Forward Genetics) y la genética reversa (Reverse Genetics). En el método de genética directa se identifican y seleccionan individuos de una población mutante que posean fenotipos interesantes tales como: Flores de *Arabidopsis* sin pétalos, frutos sin semilla, hojas con morfología alterada, etc. Una vez seleccionados, se procede a identificar el gen afectado en dichos individuos. La genética reversa, por el otro lado, parte de un gen o familia de genes para los que se estudian los efectos de su alteración, ya sea en la secuencia codificante o en el nivel y patrón de expresión. Las alteraciones en un gen, encontrado por genética directa o estudiado por genética reversa, pueden deberse a mutaciones de pérdida de función o mutaciones de ganancia de función (Martienssen, 1998).

Las mutaciones de pérdida de función dan como resultado la disminución de la expresión, o la desaparición o disminución en la actividad de la proteína para la que codifica. En contraste, las mutaciones de ganancia de función representan aquellas en las que el nivel o patrón espacio-temporal de expresión del gen se incrementa o extiende a nuevos dominios (por ejemplo, un gen que se expresa normalmente únicamente en flores, se expresará ahora también en hojas). También se pueden ocasionar fenotipos de ganancia de función cuando la región codificante del gen sufre cambios, dando como resultado que la proteína que produce tenga mayor actividad o sea más estable que la silvestre. Una estrategia para producir mutaciones de ganancia de función debida a incremento en la expresión de genes, es el uso de agentes insercionales modificados (T-DNA o transposones) en los cuales se introducen amplificadores de la expresión génica ("enhancers"¹) que pueden causar activación transcripcional de genes cercanos² (Walden, 1994). Además de la búsqueda de genes afectados en poblaciones mutagenizadas aleatoriamente, el estudio funcional de genes puede hacerse de modo más directo: modificando o reemplazando las secuencias regulatorias del gen para cambiar su patrón espacio-temporal y nivel de expresión, o empleando técnicas de silenciamiento de genes que permiten disminuirla. Estas modificaciones se introducen en plantas silvestres o plantas con ge-

¹ Elementos reguladores que actúan a distancia e interactúan con promotores de genes, amplificando su expresión.

² Esta estrategia se denomina "Activación etiquetada de genes" ("Activation Tagging" en inglés).

notipos especiales dependiendo del estudio en cuestión, y se evalúan los cambios en las características del organismo (fenotipo³). Los cambios en el fenotipo pueden dar indicaciones importantes o revelar la función (o una de las funciones) del gen estudiado.

DESARROLLO DE FRUTOS EN GENERAL (¿QUÉ SE SABE DEL DESARROLLO DE FRUTOS EN ARABIDOPSIS?)

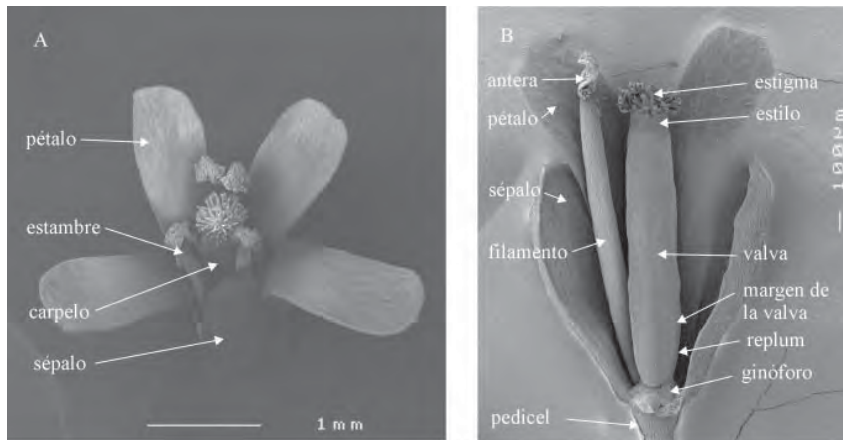


Figura 2. Detalles de los órganos florales de *Arabidopsis*. Fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido. 2A. Flor de *Arabidopsis* completa. Se indican los cuatro órganos principales que conforman la flor. 2B. Vista lateral de la flor de *Arabidopsis*. Se han removido algunos órganos frontales para facilitar la visualización del pistilo, del cual se indican las partes principales.

La definición más simple de fruto es ovario maduro. Este tipo de órgano es exclusivo de las Angiospermas, donde cumple dos funciones importantes para la sobrevivencia de las diferentes especies que lo producen, encargándose de proteger la semilla y asegurar su dispersión. Los frutos se presentan en variados tamaños y formas. La dispersión de semillas es una etapa crucial en el ciclo vital de las plantas, por lo que el fruto se ha diversificado, dependiendo de su habitat, para hacer más eficiente este evento; como consecuencia, actualmente podemos observar frutos carnosos y jugosos, que por lo regular son de colores llamativos y sabor dulce, y frutos secos. Los frutos carnosos desarrollan estructuras exquisitas que al ser comidas por los animales llevan a cabo la dispersión de semillas. Los frutos secos pueden ser clasificados en dehiscentes, si se abren dispersando la semilla al madurar o indehiscentes si no lo hacen. Muchos frutos tienen importancia económica como fuente de alimento o materia prima, por lo que es necesario estudiar los diferentes procesos que hacen posible su desarrollo. La planta modelo *Arabidopsis thaliana*, provee un excelente sistema para lograr comprender cómo se llevan a cabo dichos procesos. En *Arabidopsis*, el ovario se divide en tres zonas (parte exterior): Valvas, margen de la valva y replum; en la parte interior el fruto cuenta con: óvulos, tubo de transmisión y septum. Las valvas son estructuras externas que protegen a los óvulos y semillas durante su desarrollo, separándose al madurar el fruto, dispersando las semillas; el margen de la valva se encuentra entre el replum y la valva. Por dentro el

septum divide al ovario a la mitad y se conecta el replum en el exterior. En el centro del septum se desarrolla el tubo de transmisión, a través del cual crece el tubo polínico que conduce al polen hasta los óvulos para su fecundación. El fruto se desarrolla a partir del gineceo, también llamado pistilo, el cual cuenta, además de los componentes antes mencionados, con: El ginóforo que se encuentra en la base del ovario, el estigma que es donde llega el polen antes de la fecundación y el estilo que une al estigma con el ovario (ej. Gasser y Robinson-Beers, 1993; Ferrandiz *et al.*, 1999; Sessions, 1999; Balanza *et al.*, 2006; Roeder y Yanofsky, 2006).

En los últimos 10 años se ha logrado identificar componentes genéticos involucrados en el desarrollo del fruto. Muchos de ellos son factores de transcripción, y algunos de los más relevantes se mencionan a continuación. *SHATTERPROOF1* y *2* (*SHP*), factores de transcripción tipo MADS-box (Liljegren *et al.*, 2000), están involucrados en el desarrollo del margen de la valva, al igual que los genes *ALCATRAZ* y *INDEHISCENT*, ambos miembros de la familia de genes bHLH (Rajani y Sundaresan, 2001; Liljegren *et al.*, 2004). La expresión de estos genes está regulada negativamente por *FRUITFUL* (*FUL*), otro factor de transcripción tipo MADS-box, en la valva (Ferrandiz *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2004) y *REPLUMLESS* (*RPL*), un gen homeobox, en el replum (Roeder *et al.*, 2003; Liljegren *et al.*, 2004). Los genes *FUL* y *SHP1/2* son inducidos por *JAGGED* (*JAG*), un factor de transcripción con dominio dedo de zinc tipo C2H2, y por los genes *YABBY3* (*YAB3*) y *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*), ambos de la familia *YABBY* (Dinneny *et al.*, 2005). Además, *JAG*, *YAB3* y *FIL* son reprimidos por genes de

³ El fenotipo constituye las características "observables" de un organismo.

la familia KNOX clase I y éstos a su vez son regulados negativamente por *ASYMMETRIC LEAVES1* y *2* (*AS*), factores de transcripción de la familia MYB, en la valva (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007).

Como se puede apreciar el fruto es un órgano muy complejo, al igual que la red de interacciones génicas necesarias para su adecuado desarrollo, la cual apenas comienza a ser dilucidada. Los genes antes mencionados probablemente sólo representan la punta del iceberg y aún queda mucho por hacer.

Los estudios del desarrollo de frutos también se han realizado en jitomate como modelo de fruto carnoso y climatérico (capaz de seguir madurando incluso después de haber sido recolectado). Hasta el momento se ha estudiado principalmente con respecto al tamaño, forma y maduración de su fruto (Giovannoni, 2004; Tanksley, 2004; Giovannoni, 2007). Recientemente, se ha propuesto a la papaya como una planta modelo para frutos tropicales, y su genoma de aproximadamente 372 Mb ha sido secuenciado (Ming *et al.*, 2008).

RECURSOS Y ESTRATEGIAS QUE SE SIGUEN EN EL LABORATORIO PARA EL ESTUDIO MOLECULAR DEL DESARROLLO DE FRUTOS

En el laboratorio se cuenta con varios recursos que nos brindan indicaciones sobre genes candidatos con posibles funciones importantes en la regulación del desarrollo de frutos, que se estudian actualmente con diferentes estrategias, los cuales se enumeran a continuación:

1. De manera complementaria a otros estudios de patrones de expresión en flores y órganos florales (ej. Zik y Irish, 2003; Hennig *et al.*, 2004; Wellmer *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2005; Wellmer *et al.*, 2006), se han analizado los patrones de expresión de cerca de 1,100 genes únicos de Factores de Transcripción (FTs) durante los diferentes estadios de desarrollo de la silicua en *Arabidopsis* y comparando contra frutos de una mutante partenocárpica, incluyendo casi 200 FTs que no están presentes en el microarreglo⁴ ahora ampliamente usado Affymetrix GeneChip® ATH1 (de Folter *et al.*, 2004). Aunque este microarreglo de transcritos incluye cerca de 22 000 genes no cubre los cerca de 27 000 genes codificados en el genoma. Los patrones de expresión obtenidos fueron agrupados en cinco clases y los datos contienen, además de los genes de FTs con funciones conocidas, FTs que no han sido estudiados y que reve-

lan un patrón de expresión muy interesante para ser estudiado en relación con el desarrollo de frutos. De estos últimos, genes con funciones aún desconocidas, se ha elegido un grupo para el cual se desea identificar si juegan un papel relevante en el proceso, y cuál es su papel. Para lograrlo, se realizan estudios de pérdida de función empleando la tecnología de RNAi (RNA interferente), que ofrece una forma rápida, fácil y específica para análisis de genética reversa (Small, 2007). En principio el RNAi, permite reducir cuantitativamente la expresión de algún gen específico (o grupo de genes si ciertas partes de sus secuencias son homólogas) que se desea estudiar, mediante un proceso de silenciamiento⁵ (Brodersen y Voinnet, 2006; Ossowski *et al.*, 2008).

Esta tecnología presenta ventajas interesantes, es específica a nivel de secuencia, requiriendo pocas transformantes por cada gen o grupo de genes a analizar, es de tipo dominante, por lo que los fenotipos, si se presentan, pueden ser observados en la primera generación. También puede ser controlada en un tejido específico utilizando algún promotor específico del tejido de interés, al silenciar un grupo de genes con regiones conservadas, facilita el estudio de redundancia de función, además se obtiene un rango de fenotipo con severidad variada, permitiendo el análisis de genes esenciales, los cuales por ser letales no pueden ser estudiados por mutantes de pérdida de función.

A pesar de sus numerosas ventajas, como toda tecnología el RNAi también presenta ciertas desventajas. Por ejemplo: algunos genes pueden tener una expresión muy reducida sin generar algún fenotipo, e incluso se ha observado inestabilidad, al presentarse pérdida de fenotipos mutantes en las generaciones siguientes de las plantas transformadas. A pesar de esto, actualmente la tecnología del RNAi es ampliamente usada en plantas, lo que ha generado una revolución en el entendimiento funcional y de expresión de genes.

2. Algunos de los FTs aún no estudiados pertenecen a la familia de genes MADS-box, especialmente a la subfamilia de tipo I (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000), y muestran un patrón de expresión que sugiere que están involucrados en el desarrollo de frutos (de Folter *et al.*, 2004). Hasta la fecha, todos los genes MADS-box bien caracterizados y mutantes florales estudiadas (ej. *apetala1*, *apetala3*, *pistillata*, *agamous* y *sepallata*'s) pertenecen a la subfamilia tipo II (Ng y Yanofsky, 2001). Los genes de este grupo que han sido carac-

⁴ En un microarreglo se ordenan regiones microscópicas con oligonucleótidos de ADN. Cada región consiste de oligonucleótidos de ADN con secuencias específicas. Dichas secuencias pueden corresponder, entre otros, a una sección de un gen y se usan como sondas para hibridar muestras de cDNA o cRNA, en condiciones de alta astringencia. La hibridación, detectada generalmente como fluorescencia, permite determinar la abundancia relativa de cada secuencia en la muestra.

⁵ El silenciamiento de genes es llevado a cabo por pequeñas moléculas de RNA, generalmente de 21 nucleótidos de longitud, que se unen a un complejo de proteínas de diferentes familias como: ARGONAUTA, DICER y HEN1, haciendo posible el rompimiento de mRNAs, previniendo su traducción, o promueven la modificación de la cromatina (por metilación ya sea de citocinas o de lisinas en las histonas), inhibiendo la transcripción de genes blanco (Brodersen y Voinnet, 2006).

terizados, tienen funciones clave en la determinación de la identidad de órganos florales y tejidos de fruto o en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva entre otras. En contraste, el conocimiento acerca de los genes tipo I es aún muy limitado (Parenicová *et al.*, 2003), y el disponible sugiere que están involucrados en el desarrollo embrionario (Portereiko *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008) y en el desarrollo del endospermo (Portereiko *et al.*, 2006). El descubrimiento de funciones para estos genes MADS tipo I es muy interesante desde varios puntos de vista, y aún más si son funciones relacionadas con el desarrollo de frutos (o frutos y semillas). Para estos genes también se emplea RNAi, además de líneas donde el gen se encuentra interrumpido por T-DNA o transposones, y estudios de sobreexpresión y expresión utilizando fusiones de sus regiones reguladores con un gen reportero, cuyo producto produce fluorescencia (Green Fluorescent Protein: GFP), o una enzima capaz de actuar sobre un substrato produciendo un compuesto de color azul (β -glucoronidasa: GUS).

3. Un factor de transcripción MADS-box bien caracterizado por su papel en el desarrollo de estambres y carpelos es AGAMOUS (AG) (Yanofsky *et al.*, 1990). Mutaciones en este gen de identidad de órganos florales ocasiona la carencia de todos los órganos reproductivos. En un estudio reciente, se buscó identificar genes cuya transcripción se afectaba tras activar AG (Gómez-Mena *et al.*, 2005). En él se encontraron varios FTs afectados. Sin embargo, aún no puede asegurarse que la acción de AG sobre estos genes es directa (es decir, que sean genes blanco directos). Estamos interesados en los blancos directos de este importante FT que finalmente llevan a cabo las acciones requeridas para la correcta iniciación y desarrollo de los carpelos (y estambres). Un método relativamente nuevo en el área de plantas, que permite identificar genes blanco directos en escala del genoma completo se denomina ChIP-on-chip (por Chromatin Immunoprecipitation y chip -microarreglo-) (Bulyk, 2006; de Folter y Angenent, 2006; de Folter *et al.*, 2007). Se realiza primero la inmunoprecipitación de cromatina empleando un anticuerpo contra la proteína de interés (en este caso AG), se purifica el ADN y se hibrida con un microarreglo genómico. Recientemente se realizó un estudio de este tipo en el laboratorio del Dr. Gerco Angenent, y se identificó una lista de candidatos que pueden ser blancos directos de AG, que probablemente son importantes para el desarrollo de carpelos y/o estambres. Actualmente, se están estudiando los cambios en acumulación de transcritos de estos genes al inducir AG en diferentes tejidos, lo cual puede indicar si son realmente blancos transcripcionales.

4. Finalmente, en el laboratorio se cuenta con tres mutantes de fruto con fenotipos interesantes, en los que el gen afectado modifica el desarrollo del fruto, lo cual sugiere que tiene un posible papel relevante en dicho proceso. Normalmente cuando un pistilo es polinizado y los óvulos fertilizados, el fruto comienza a desarrollarse. Una pregunta básica es cuál es el estímulo que induce el desarrollo frutal, y la caracterización de mutantes puede ayudar a contestarla. Un ejemplo de mutante partenocárpica (en la cual se forman frutos sin haber tenido lugar la fertilización) es *arf8*. *ARF8* codifica para un factor de transcripción involucrado en la señalización de auxinas, y cuando el gen no es funcional el fruto se desarrolla sin fertilización (Goetz *et al.*, 2006). Por lo tanto, se presume que este gen es un regulador negativo de la iniciación de frutos. Otra mutante que produce frutos sin semillas es *empty siliques* (Ito y Meyerowitz, 2000; Marsch-Martinez *et al.*, 2002). Este mutante se estudia en el laboratorio y en ella, contrariamente a *arf8*, la expresión de un gen que codifica para una citocromo oxidasa p450 no está disminuida sino aumentada. Este mutante fue empleada antes en los experimentos en donde se estudió el perfil de transcritos de factores de transcripción durante el desarrollo del fruto. Notoriamente, se desarrollan óvulos en esta mutante, pero se degeneran, dando como resultado un fruto carente de semillas. Aún se desconoce el mecanismo por el cual se da este fenómeno, si se trata de un proceso activo o es el resultado de fertilización defectuosa o interrumpida o de una señal faltante. Los conocimientos que se puedan generar sobre partenocarpia son de gran interés científico y además pueden ser eventualmente interesantes económicamente, por ejemplo, si se dirigen a la obtención de frutos sin semilla. Generalmente, existe cierta preferencia por el consumo de frutos sin semilla (partenocárpicos), existiendo ya varios ejemplos, como manzana, plátano, sandía y limón. También se puede obtener partenocarpia empleando transgénicos, por ejemplo, sobreproduciendo auxina, como se ha demostrado en berenjena, jitomate, uvas, fresas y frambuesas entre otras. En México existen muchas especies de frutos tropicales y algunas se producen en gran escala para consumo humano, sería interesante hacer ensayos para obtener frutos partenocárpicos en éstas especies.

Además de la mutante partenocárpica, se cuenta con otras dos en las que el fruto presenta una morfología peculiar. En una de ellas crece en forma helicoidal y es interesante para estudiar el desarrollo de la forma en frutos. En otra el desarrollo del pistilo está interrumpido en la mayoría de las flores, mientras que en el resto el fruto se desarrolla asimétricamente. Para

estas mutantes se tienen ya genes candidatos que pudiesen estar afectados, y es necesario confirmar cuál de ellos es el responsable de los fenotipos observados. Una vez confirmado, se realizarán análisis de expresión y de su interacción con otros genes con funciones conocidas en el desarrollo frutal. Estos estudios permitirán ubicar a los nuevos genes identificados en redes de control de los procesos que dan lugar al desarrollo adecuado del fruto.

Con las estrategias arriba descritas, se espera obtener un grupo de genes novedosos que regulen el desarrollo frutal. Se pretende entonces estudiar los efectos de dichos genes en especies mexicanas con mayor importancia para el consumo humano, de dos maneras principalmente: mediante la introducción del gen encontrado en *Arabidopsis* y buscando homólogos en el genoma de las otras plantas. Para corroborar su función en otras plantas, se pueden hacer ensayos de silenciamiento del (o los) gen(es) endógeno(s). Para especies difíciles de transformar se puede probar la técnica de silenciamiento empleando inyecciones de *Agrobacterium*, o la técnica de silenciamiento con virus (VIGS – Virus Induced Gene Silencing, en condiciones controladas en invernadero). Así, aprovechando los recursos que brinda el empleo de especies modelo como *Arabidopsis*, se espera facilitar el descubrimiento de genes (presumiblemente parecidos a los de *Arabidopsis*) que sirvan de herramientas para introducir características deseables en frutos de consumo humano.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La recolección de conocimiento básico acerca del desarrollo de frutos en especies modelo es un prerrequisito para ser capaz de entender, agilizar la investigación y transferir resultados a frutos de importancia en el consumo humano. Este tipo de estudios en un país como México especialmente, que cuenta con una gran diversidad de frutos, es científicamente muy interesante, además de ser importante económicamente.

Científicamente, además del interés dentro de la Biología de las plantas, el estudio del desarrollo de frutos puede proveer modelos de desarrollo útiles para elaborar comparaciones entre organismos, que den lugar a teorías sobre el desarrollo de órganos en organismos multicelulares en general.

Tanto económicamente como socialmente, la modificación de características de frutos que los hacen menos atractivos comercialmente, y la adición de aquellas que incrementan su valor comercial, aunado

a programas eficaces de cultivo, empaque, transporte y estrategias de mercadotecnia y comercialización, serían de gran valor. Incrementando las ventas de este tipo de productos es posible aumentar el nivel de vida de las poblaciones que se dedican a ellos, y especialmente aquellos que crecen en regiones difíciles para la agricultura (por ejemplo, en el caso de la tuna). Con las tendencias actuales de retomar el consumo de productos naturales y el encarecimiento de alimentos básicos y en el futuro, la necesidad de introducir nuevamente el uso de biomateriales, el estudio de los procesos de desarrollo de plantas se vuelve cada vez más relevante.

REFERENCIAS

- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J.J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C., and Martínez-Laborda, A. (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the *Arabidopsis* *ASYMMETRIC LEAVES1* gene. *Development* 134, 2663-2671.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., de Pouplana, L.R., Martínez-Castilla, L., y Yanofsky, M.F. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 5328-5333.
- Anderson, M., and Wilson, F. (2000). Growth, maintenance, and use of *Arabidopsis* genetic resources in *Arabidopsis*: a practical approach. In *Arabidopsis*, Z.A. Wilson, ed (Oxford University press), pp. 1-26.
- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M., and Ferrandiz, C. (2006). Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* 57, 3457-3469.
- Brodersen, P., and Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22, 268-280.
- Bulyk, M.L. (2006). DNA microarray technologies for measuring protein-DNA interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 422-430.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M.M., and Colombo, L. (2008). AGL23 a Type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J. doi/10.1111/j.1365-3113X.2008.03485.x*

- De Folter, S., y Angenent, G.C. (2006). *Trans* meets *cis* in MADS science. *Trends in Plant Science* 11, 224-231.
- De Folter, S., Busscher, J., Colombo, L., Losa, A., y Angenent, G.C. (2004). Transcript profiling of transcription factor genes during silique development in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 56, 351-366.
- De Folter, S., Urbanus, S.L., van Zuijlen, L.G., Kaufmann, K., y Angenent, G.C. (2007). Tagging of MADS domain proteins for chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biology* 7, 47.
- Dinneny, J.R., Weigel, D., y Yanofsky, M.F. (2005). A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 4687-4696.
- Ferrandiz, C., Pelaz, S., y Yanofsky, M.F. (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry* 68, 321-354.
- Ferrandiz, C., Liljegren, S.J., y Yanofsky, M.F. (2000). Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* 289, 436-438.
- Gasser, C.S., y Robinson-Beers, K. (1993). Pistil development. *The Plant cell* 5, 1231-1239.
- Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 16-37.
- Giovannoni, J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16, S170-180.
- Giovannoni, J.J. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 283-289.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S.D., and Koltunow, A.M. (2006). *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18, 1873-1886.
- Gómez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M.M.R., Angenent, G.C., and Sablowski, R. (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* 132, 429-438.
- Hennig, L., Gruitsem, W., Grossniklaus, U., and Kohler, C. (2004). Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 1765-1775.
- Ito, T., y Meyerowitz, E.M. (2000). Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, *CYP78A9*, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12, 1541-1550.
- Kang, I.H., Steffen, J.G., Portereiko, M.F., Lloyd, A., and Drews, G.N. (2008). The *AGL62* MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* doi/10.1105/tpc.107.05137.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, H.Y., Savidge, B., Bowman, J.L., y Yanofsky, M.F. (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404, 766-770.
- Liljegren, S.J., Roeder, A.H., Kempin, S.A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., y Yanofsky, M.F. (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* 116, 843-853.
- Ma, L., Sun, N., Liu, X., Jiao, Y., Zhao, H., y Deng, X.W. (2005). Organ-specific expression of *Arabidopsis* genome during development. *Plant Physiol.* 138, 80-91.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L., y Pereira, A. (2002). Activation tagging using the En-1 maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 1544-1556.
- Martienssen, R.A. (1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 2021-2026.
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J.H., Senin, P., Wang, W., Ly, B.V., Lewis, K.L.T., Salzberg, S.L., Feng, L., Jones, M.R., Skelton, R.L., Murray, J.E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R.E., Michael, T.P., Wall, K., Rice, D.W., Albert, H., Wang, M.-L., Zhu, Y.J., Schatz, M., Nagarajan, N., Acob, R.A., Guan, P., Blas, A., Wai, C.M., Ackerman, C.M., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J.-K., Shakhov, E.V., Haas, B., Thimmapuram, J., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J.E., Gschwend, A.R., Delcher, A.L., Singh, R., Suzuki, J.Y., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, N., Zhang, W., Presting, G., Windsor, A., Navajas-Perez, R., Torres, M.J., Feltus, F.A., Porter, B., Li, Y., Burroughs, A.M., Luo, M.-C., Liu, L., Christopher, D.A., Mount, S.M., Moore, P.H., Sugimura, T., Jiang, J., Schuler, M.A., Friedman, V., Mitchell-Olds, T., Shippen, D.E., dePamphilis, C.W., Palmer, J.D., Freeling, M., Paterson, A.H., Gonsalves, D., Wang, L., y Alam, M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452, 991-996.
- Ng, M., y Yanofsky, M.F. (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev. Genet.* 2, 186-195.
- Ossowski, S., Schwab, R., y Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* 53, 674-690.
- Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C., y Colombo, L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: New openings to the MADS world. *The Plant Cell* 15, 1538-1551.
- Portereiko, M.F., Lloyd, A., Steffen, J.G., Punwani, J.A., Otsuga, D., y Drews, G.N. (2006). *AGL80* is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18, 1862-1872.
- Rajani, S., y Sundaresan, V. (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* 11, 1914-1922.
- Riechmann, J.L. (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview: April 4, 2002. *The Arabidopsis book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0085, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Roeder, A.H.K., y Yanofsky, M.F. (2006). Fruit development in *Arabidopsis*: February 22, 2006. *The Arabidopsis book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0075, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Roeder, A.H.K., Ferrandiz, C., y Yanofsky, M.F. (2003). The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current Biology* 13, 1630-1635.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., y Lohmann, J.U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37, 501-506.

- Sessions, A. (1999). Piecing together the *Arabidopsis* gynoecium. *Trends in Plant Science* 4, 296-297.
- Small, I. (2007). RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 148-153.
- Tanksley, S.D. (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell* 16, S181-189.
- Walden, R., Fritze, K., Hayashi, H., Miklashevichs, E., Harling, H., Schell, J. (1994). Activation tagging: A means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 26, 1521-1528.
- Weigel, D., y Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M., y Meyerowitz, E.M. (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *The Plant Cell* 16, 1314-1326.
- Wellmer, F., Alves-Ferreira, M., Dubois, A., Riechmann, J.L., y Meyerowitz, E.M. (2006). Genome-wide analysis of gene expression during early *Arabidopsis* flower development. *PLoS Genetics* 2, e117.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., y Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35-39.
- Zik, M., y Irish, V.F. (2003). Global identification of target genes regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* floral homeotic gene action. *The Plant Cell* 15, 207-222.