

INDICE

	Pág.
Introducción	1
CAPITULO I: FUNDAMENTO TEORICO	
1.1. Los Orígenes del Cultivo de Arroz	3
1.2. Morfología del Arroz	4
1.3. Cultivo de Tejido Vegetal	5
1.3.1. Producción de Callos y Cultivo de Células en Suspensión	6
1.4. Expresión de la Información Genética	7
1.4.1. ARN Polimerasas	8
1.4.2. La ARN Polimerasa IV	9
1.4.2.1. Regulación Genética; la maquinaria de los siRNAs.	9
1.5. Ingeniería Genética: Orígenes y Aplicaciones	10
1.5.1. Amplificación de ADN por PCR	11
1.5.2. Síntesis de ADN complementario (Reacción de la Reversa Transcriptasa)	13
1.6. Objetivos	14
1.6.1. Objetivo General	14
1.6.2. Objetivos Específicos	14
1.7. Justificación	14

CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales	16
2.1.1. Material Vegetal	16
2.2. Metodología	17
2.2.1. Diseño Experimental	17
2.2.2. Plantas de Campo	17
2.2.3. Cultivo de tejido vegetal para la producción de callos y células en suspensión	18
2.2.3.1. Desinfección y siembra de cariópsides en medio semisólido	18
2.2.3.2. Inducción de callos a partir de hipocótilos	18
2.2.3.3. Recuperación de callos y células en suspensión	19
2.2.4. Metodología de extracción de ARN	19
2.2.5. Diseño de oligonucleótidos	20
2.2.6. Síntesis de ADN complementario (Reacción de la Reversa Transcriptasa)	20
2.2.7. Amplificación de ADNc por PCR	21
2.2.8. Electroforesis en Gel de Agarosa	21

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Cultivo de Tejido Vegetal para la Producción de Callos y Células en Suspensión	22
3.1.1. Siembra de cariópsides en medio semisólido.	22
3.1.2. Inducción de callos a partir de hipocótilos	24
3.1.3. Recuperación de callos y células en suspensión	24
3.2. Metodología de Extracción de ARN	25
3.3. Diseño de Oligonucleótidos	27
3.4. Reacciones de RT – PCR	28
3.5. Conclusiones	30
3.5.1. Perspectivas	30
Referencias Bibliográficas	31
Anexos	35
Anexo A: Alineamiento de la secuencia de la ARN polimerasa II y la ARN polimerasa IV para el diseño de oligonucleótidos.	35
Anexo B: Método de extracción de RNA Herrera 2000.	39
Glosario	40

INTRODUCCIÓN

Los organismos viven en condiciones ambientales dinámicas, para adecuarse a estas variaciones necesitan responder rápidamente a estos cambios ambientales y así poder sobrevivir. Por lo que manejan una gran diversidad de estrategias metabólicas, coordinando miles de reacciones enzimáticas simultáneas, las cuales están sujetas a mecanismos de control muy poderosos, precisos e independientemente ajustados, que controlan el funcionamiento de un sistema compuesto por miles de partes individuales, existiendo así diversos mecanismos de regulación genética. El principal mecanismo de regulación genética esta dado por el proceso de transcripción. Proceso en el cual una sección de la información del ADN es copiado a una molécula de ARN. Este se realiza por medio de las ARN polimerasas (Balbásca P., 2002).

En organismos **eucariotes**, existen tres ARN polimerasas que transcriben el genoma de ADN a ARN. Cada polimerasa tiene propiedades diferentes en función de su localización en el núcleo, de los genes que transcriben, y de la cantidad y tipo de subunidades que las conforman. La ARN polimerasa I transcribe los genes ribosomales del ARN (rARN) del nucleolo; La ARN polimerasa II transcribe la inmensa mayoría de genes (Archambault and Friesen, 1993) y la ARN polimerasa III transcribe los genes que codifican ARNs estructurales que incluyen ARN_t y 5S ARN_r (Schramm and Hernandez 2002).

En estudios recientes se descubrió en *Arabidopsis thaliana* una cuarta clase de ARN polimerasa además de las ARN Polimerasas I, II, y III. Esta cuarta ARN polimerasa está situada dentro del núcleo y participa en la producción de los siRNAs, que generan un silenciamiento de genes y están involucrados en la metilación de

novo de elementos repetitivos que están sujetos a la formación de la heterocromatina facultativa (Onodera *et al.*, 2005).

Partiendo de esta premisa y con ayuda del cultivo de tejido vegetal como una herramienta para la obtención de células, en este trabajo se analizó la posible expresión transcripcional de la ARN polimerasa IV en arroz (*Oryza sativa*), siendo este un cereal de gran importancia económica a nivel mundial, además de poseer el genoma más pequeño y conocido, en comparación con los demás cereales (Coto, 2006).