
ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	I
LISTADO DE FIGURAS	III
Listado de Cuadros	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1. Generalidades de la fibrilarina	3
1.1. Estructura de la fibrilarina	5
1.2. Funciones de la fibrilarina	5
1.3. Interacción de fibrilarina en la infección viral	6
1.4. Fibrilarina como oncogén	7
2. Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	8
3.1. Vectores Binarios	10
3.2. Marcadores de selección	11
3.3. Genes Reporteros	12
3.4. Promotores	12

3.5. Vectores Binarios tipo Gateway.....	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
CAPÍTULO II.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4. Plántulas de <i>N. tabacum</i>	19
5. Diseño de iniciadores del gen <i>CcFib</i>	19
6. Extracción de RNA de <i>C. chinense</i>	20
7. Obtención del cDNA y amplificación de la secuencia de <i>CcFib</i>	20
8. Clonación de <i>CcFib</i> en pJET1.2/blunt®	21
9. Clonación de <i>CcFib</i> en pDONR™221 mediante la reacción BP	22
10. Clonación de pDONR™221: <i>CcFib</i> en pK7RWG2 mediante la reacción LR	25
11. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pK7RWG2:: <i>CcFib</i>	27
12. Transformación de <i>N. tabacum</i> por agroinfiltración	27
12.1. Preparación del cultivo de <i>A. tumefaciens</i> EHA105.....	27
12.2. Preparación de los explantes de <i>Nicotiana tabacum</i> en medio de precultivo	28
12.3. Infiltración y cocultivo	28
12.4. Lavados y selección.....	28
12.5. Enraizamiento y germinación	28

13. Análisis de plantas transformadas.....	29
13.1. Determinación de la integración del transgen <i>CcFib</i> en <i>N. tabacum</i> mediante PCR.....	29
13.2. Inmunolocalización de la proteína CcFib-GFP.....	29
CAPÍTULO III.....	31
RESULTADOS	31
14. Germinación y crecimiento de plantas de <i>N. tabacum</i> silvestre	31
15. Amplificación de la secuencia de <i>CcFib</i> Y clonación en pJET1.2/blunt®.....	32
16. Clonación de <i>CcFib</i> en PDONR 221	34
17. Clonación de <i>ccfib</i> en PK7RWG2.....	36
18. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> cepa EHA105 con el vector binario pK7RWG2:: <i>CcFib</i>	37
19. Transformación de <i>Nicotiana tabacum</i> por agroinfiltración.....	38
19.1. Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> en medio YEP.....	39
19.2. Infiltración y cocultivo.....	39
19.3. Lavados y selección.....	40
19.4. Enraizamiento	45
19.5. Aclimatación y cultivo en tierra	47
19.6. Floración y recolección de semillas de la progenie F0	48
19.7. Validación de plantas transgénicas por PCR.....	49
19.8. Eficiencia de la transformación.....	50
19.9. Fenotipificación	51
19.10. Microscopía de plantas transgénicas	55

CAPÍTULO IV	57
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS.....	61
ANEXOS	69
Anexo I. Extracción de RNA (TRIzol® Reagent)	69
Anexo II. RT PCR (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen).....	70
Anexo III. Células Competentes (DH5 α)	71
Anexo IV. Método de extracción de plásmido	72
Anexo V. Reacción BP, Invitrogen.....	73
Anexo VI. Reacción LR, Invitrogen	74
Anexo VII. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por congelamiento/descongelamiento (Clemente, 2006)	75
Anexo VIII. Transformación de <i>Nicotiana tabacum</i> por agroinfiltración (Clemente, 2006).76	
Anexo IX. Resultado de secuenciación de pDONR::CcFib	78
Anexo X. Resultado de secuenciación de pK7RW	79
Anexo XI Protocolo de extracción de DNA genómico	80

RESUMEN

El nucléolo es el dominio más grande del núcleo. La principal función del nucléolo es ser el sitio donde se realiza la biogénesis de subunidades ribosomales, además de la biogénesis de RNA pequeños nucleares y nucleolares (snRNA y snoRNA, respectivamente), disfunciones nucleolares como cáncer, silenciamiento génico, progresión del ciclo celular, senescencia, progresión de la infección viral y diversas estrategias de respuesta a estrés. El proceso de la síntesis ribosomal ocurre en distintas regiones del nucléolo denominados centro fibrilar (CF), componente denso fibrilar (CFD) y componente granular (CG). La transcripción del rDNA acontece entre la región DF y CFD. El procesamiento y modificación de los transcritos de pre-rRNA ocurre en el CFD bajo la acción de ribonucleoproteínas, entre ellas, fibrilarina. Fibrilarina es una proteína con actividad de metiltransferasa que cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina al grupo hidroxilo de la ribosa blanca. Adicional a su actividad de metilación, se determinó que la fibrilarina 2 de *Arabidopsis thaliana* (AtFib2) presenta actividad de ribonucleasa. La fibrilarina está involucrada en diferentes procesos celulares, por ejemplo en células cancerígenas de próstata y seno presenta niveles anormales en su expresión, así como interactuar con proteínas virales de influenza A y VIH y umbravirus. La doble actividad de fibrilarina y procesos celulares en que esta inmiscuida, hace pertinente su estudio. En este proyecto se generaron diferentes líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que sobreexpresan fibrilarina de *Capsicum chinense* utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transformación. Las plantas mutantes fueron corroboradas por diferentes técnicas moleculares como PCR, e inmunolocalización por microscopía. El análisis del fenotipo de cada línea transgénica sugiere que no hay un cambio notable contra plantas silvestres de *Nicotiana tabacum*. Sin embargo, es preciso realizar estudios sobre las plantas mutantes donde la actividad o funciones de fibrilarina sean acentuadas o inhibidas.