



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR
DE *AT2G41800* DURANTE EL DESARROLLO DE
Arabidopsis thaliana, UN MIEMBRO DE LA
FAMILIA DUF642 ESPECÍFICA DE
ESPERMATÓFITAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ALEXIS SALAZAR IRIBE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN

MEXICO, DF.

MAYO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



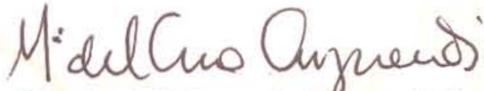
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de marzo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **SALAZAR IRIBE ALEXIS** con número de cuenta **509015079** con la tesis titulada **"EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE AT2G41800 DURANTE EL DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana*, UN MIEMBRO DE LA FAMILIA DUF642 ESPECÍFICA DE ESPERMATÓFITAS"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN**.

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DRA. ADRIANA GARAY ARROYO
Secretario: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
Suplente: DR. LUIS CÁRDENAS TORRES
Suplente: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de abril de 2011.


Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Agradezco a la honorable institución que representa la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas en ésta importante etapa de mi vida mediante el Posgrado de Ciencias Biológicas. Agradezco al CONACyT por el apoyo económico que me brindó durante 2 años.

La realización de ésta tesis contó con el apoyo financiero del proyecto PAPIIT (UNAM) IN228108 y del proyecto CONACyT 60304.

Agradezco a los miembros del Jurado:

Dr. Luis Felipe Jiménez
Dra. Berenice Ponce de León
Dra. Adriana Garay Arroyo
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Dr. Luis Cardenas Torres

Agradecimientos

A la M. en C. Teresa de Jesus Olivera Flores encargada del laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Química por su eficiente apoyo en el montaje de los experimentos relacionados con la inducción de callo, pero sobre todo por su amabilidad y simpatía. En verdad, nunca había conocido personas tan atentas y amables con un “novato” en un laboratorio como en ese.

A la M. en C. Karina Jiménez Durán por su valioso apoyo en la observación de las plántulas y callos mediante microscopia confocal en el Laboratorio de Microscopia en la Facultad de Química. Aquí era donde cruzabamos los dedos para encontrar cosas divertidas y consistentes con nuestras ideas.

A la Dra. Alma Orozco responsable del Laboratorio de Ecofisiología que es donde he realizado esta tesis, por su apoyo incondicional en todos los aspectos, a su amabilidad y consejos. Ah !! y por aquella carta que me dio para abogar por mi ante la PGR, mil gracias Dra. Alma!

A Esther Zúñiga por la gran ayuda desde el principio en el laboratorio, por los protocolos, los consejos, uno que otro llamado de atención (pero sólo al principio, según yo agarraba el rollo rápido jaja), muchas gracias esther.

A Laura por todas las horas de pláticas, chismes, chistes, burlas Por seguirme hablando a pesar de no aceptarla en la Facebook, ah por grafitearle sus recados también.

A Luz Elena por todo el apoyo y su amistad durante todo éste tiempo.

A Diana por hacerme reir tarareando el toque de bandera.

Por supuesto, a mi directora de tesis la Dra. Alicia Gamboa de Buen por el ENORME/GIGANTISIMO apoyo y esfuerzo realizado a lo largo de éste periodo, está por demás decir que sin su ayuda no hubiera llegado muy lejos. En verdad, dudo que muchas personas sean capaces de apoyar tanto a sus alumnos como lo hace usted, sólo me resta decirle Muchísimas Gracias Dra. Alicia!! Y como diría usted “nos costó sangre sudor y lagrimas pero lo logramos!”

Un sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la realización de ésta tesis.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	6
Summary	8
I. Introducción	10
1.1 Pared celular	10
1.1.2 Composición de la pared celular	10
1.1.3 Proteínas de pared celular	13
1.1.4 Vía secretora de proteínas de pared celular	14
1.2 Características de la familia DUF642 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1.3 Características de <i>At2g41800</i>	20
1.4 Raíz	23
1.5 Raíz lateral	25
1.6 Regulación hormonal durante la protrusión de la raíz lateral	26
1.7 Interacción planta-nemátodo	27
II. Antecedentes	30
III. Hipótesis	31
IV. Objetivos	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos	32
V. Métodos	33
5.1 Determinación de la expresión de <i>At2g41800</i> en el escapo floral y raíces por RT-PCR	33
5.2 Obtención de líneas transgénicas para determinar la expresión de <i>At2g41800</i> bajo su posible región promotora.	34
5.3 Obtención de las plantas transgénicas	35
5.4 Determinación de la expresión de <i>At2g41800</i> durante el desarrollo de la planta utilizando Microscopía Confocal.	35
5.5 Determinación de la expresión de <i>At2g41800</i> durante la inducción de callo a partir de tejido de raíz y cotiledón.	36
5.6 Infección de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el Nemátodo <i>Meloidogyne incognita</i>	36
5.7 Obtención de líneas transgénicas para determinar la localización	

subcelular de la proteína codificada por <i>At2g41800</i> .	36
VI. Resultados	38
6.1 Expresión de <i>At2g41800</i> en diferentes estadios de desarrollo	38
6.1.2 Expresión en raíces de diferentes edades	38
6.1.3 Expresión a lo largo de los nodos del escapo floral	38
6.2 Expresión de <i>At2g41800</i> durante el desarrollo utilizando plantas transgénicas	41
6.3 Efecto de Auxinas y Giberelinas sobre la expresión de <i>At2g41800</i>	43
6.4 Expresión de <i>At2g41800</i> durante la inducción y formación de callo a partir de raíz y cotiledón.	45
6.5 Expresión de <i>At2g41800</i> durante la infección por el Nemátodo <i>Meloidogyne incognita</i> .	47
6.6 Localización subcelular de <i>At2g41800</i>	50
VII. Discusión	52
VIII. Conclusiones	56
IX. Bibliografía citada	57
X. Anexo	66

Resumen

En las plantas, la pared celular es una estructura altamente compleja y dinámica que esta formada por carbohidratos de alto peso molecular y proteínas. La pared juega un papel determinante durante las diferentes etapas del ciclo de vida de éstas, durante el crecimiento y diferenciación celular así como en procesos de defensa contra condiciones ambientales adversas, organismos patógenos y/o herbívoros. La familia de proteínas de pared celular DUF642 es exclusiva de espermatofitas y está altamente conservada. La localización en la pared celular de los miembros de la familia ha sido descrita en diferentes tejidos celulares. En particular, la proteína codificada por el gen *At2g41800* ha sido únicamente descrita en proteomas de pared celular de células en suspensión. Todas las proteínas de esta familia presentan un péptido señal, sugiriendo su localización en membrana plasmática o pared celular. A pesar de que las proteínas DUF642 son muy abundantes y están presentes prácticamente en todos los tejidos vegetales, su función se desconoce. Su participación en la regulación de la estructura de la pared celular ha sido sugerida puesto que las dos proteínas DUF642 codificadas por los genes *At4g32460* y *At5g11420* interactúan *in vitro* con la Pectin metil esterasa AtPME3 (*At3g14310*). Asimismo, se ha descrito una posible regulación de la expresión de los genes de esta familia por las diferentes hormonas. En *Arabidopsis thaliana*, los genes *At2g41800* y *At4g32460* son regulados positivamente por auxinas y citocininas, hormonas utilizadas en la inducción de callo. El incremento en la expresión de *At2g41800* durante la formación de callo también ha sido detectado en transcriptomas. Recientemente se ha descrito que la formación del callo no es resultado de una reprogramación de las células a un estado no diferenciado sino que es un proceso de diferenciación a partir de un tipo celular que se encuentra en todos los tejidos denominado *pericycle like cells* en referencia a las similitudes con las células de periciclo de la raíz, tejido en el cual es más fácil estudiar este proceso. Este mecanismo es similar al que ocurre durante la formación de las raíces secundarias, proceso en el cual las auxinas juegan un papel fundamental. La reprogramación de las células del periciclo y las auxinas también participan en la formación de sitios de nutrición complejos resultado de la interacción de la planta con organismos tanto simbióticos como patógenos. En estos procesos también se induce la expresión de algunos genes de la familia DUF642. El estudio de la expresión y localización subcelular de *At2g41800* durante la formación de este tipo de estructuras será determinante para poder establecer la función de esta familia y su papel en la evolución de las espermatofitas.

En este trabajo se estudió la expresión del gen *At2g41800* durante el desarrollo de *A. thaliana* por microscopia confocal detectando la proteína verde fluorescente (GFP) ya que se clonó la posible región promotora de *At2g41800* en un vector pBIN que presenta este gen reportero. La expresión de *At2g41800* se estudió en diferentes líneas homocigotas durante el desarrollo de la planta, así como el efecto de diferentes hormonas y de la infección por nemátodos. Para los estudios de localización subcelular de *At2g41800* en la raíz, se utilizó una línea homocigota del gen completo incluyendo la posible región promotora, exones e intrones de *At2g41800*.

El gen *At2g41800* se expresa específicamente en flores en etapa 12 en la papila estigmática y en la región del septum del carpelo, regiones que presentan una gran concentración de auxinas. En la raíz, este gen se expresa principalmente en la zona meristemática de la raíz primaria y de la raíz lateral y en la base del primordio de la raíz lateral. La región clonada correspondiente a la posible región promotora contiene los elementos y la información suficiente para la expresión de *At2g41800* ya que los resultados concuerdan con los patrones espacio-temporales descritos en el GENEVESTIGATOR (<http://geneinvestigator.ethz.ch/>).

Las auxinas y las giberelinas promueven la expresión de *At2g41800* ya que se encontró una mayor intensidad de la GFP con los tratamientos de estas dos hormonas. Por otro lado, el patrón de expresión también se altera con estas dos hormonas ya que se encontró marca tanto en la zona meristemática como la de elongación de la raíz. El proceso de inducción de callo promovió una alta expresión de *At2g41800*, lo que sugiere un papel importante de *At2g41800* en el mantenimiento de los meristemos en la planta ya que el callo es resultado de un proceso de diferenciación y posterior proliferación de células presentes en el haz vascular. Las plantas transgénicas se infectaron con el nemátodo *Meloidogyne incognita*. A los dos días de la infección, la expresión de *At2g41800* se incrementó notablemente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos durante el desarrollo de la raíz ya que las agallas, estructuras de alimentación promovidas por el nemátodo, también presentan un proceso de alta proliferación celular y una alta concentración de auxinas.

La localización subcelular de *At2g41800* es diferencial dependiendo del tipo celular de la raíz; en la zona meristemática se observa intracelularmente, mientras en la zona de maduración se localiza en el citoplasma y en la pared celular. *At2g41800* codifica para una proteína que puede localizarse en compartimentos celulares diferentes de acuerdo al tipo celular lo que sugiere una función relacionada con mecanismos de señalización en los diferentes procesos regulados por las auxinas.

Abstract

In plants, cell wall is a complex and dynamic structure that is built by high molecular weight carbohydrates and proteins. Cell wall plays an important role during different stages of the life cycle such as, during cell growth and differentiation processes as well as protection against adverse environmental conditions, pathogens and/or herbivores. The family of cell wall proteins DUF642 is exclusive of spermatophytes and is highly conserved. The location in the cell wall of the family members has been described in different cell tissues. In particular, the protein encoded by the gene *At2g41800* was only described in cell wall proteomes of cell suspension cultures. All proteins of this family have a signal peptide. Although DUF642 proteins are abundant and are present in virtually all plant tissues, its function is unknown. Their participation in the regulation of cell wall structure has been suggested as the two DUF642 proteins encoded by *At4g32460* and *At5g11420* genes interact *in vitro* with AtPME3 Pectin methyl esterase (*At3g14310*). Moreover, a possible regulation of the expression of genes in this family by different hormones has been described. In *Arabidopsis thaliana*, *At2g41800* and *At4g32460* genes are positively regulated by auxins and cytokinins, hormones used in the induction of callus. The increased expression of *At2g41800* during callus formation has also been detected in transcriptome. Recently, this process has been described as a result of reprogramming of specific cell type called "pericycle like cells" present in the vascular bundles of all tissues of the plant. This mechanism is similar to what occurs during the formation of lateral roots, a process in which auxins plays a fundamental role. Reprogramming of the pericycle cells and auxin are also involved in the formation of complex nutrition sites result from the interaction of the plant with both symbiotic and pathogenic organisms. These processes also induce the expression of some genes of the DUF642 family. The study of the expression and subcellular localization of *At2g41800* during the formation of such structures will be crucial to establish the role of this family and its role in the evolution of seed plants.

In this work, the *At2g41800* gene expression during development of *A. thaliana* by confocal microscopy by detecting the green fluorescent protein (GFP) has been studied. The possible promoter region of *At2g41800* was cloned into a vector pBIN presenting this reporter gene. *At2g41800* expression was studied in different homozygotes lines during plant development. These plants were also used to study the effect of different hormones and nematode infection. For studies of subcellular localization of *At2g41800* in the root, we used a homozygous line of the complete gene including the possible promoter region, exons and introns of *At2g41800*. *At2g41800* is specifically expressed in flowers at stage 12 in the stigmatic papillae and in the region of the carpel septum, both with a high concentration of auxins. In root, this gene is expressed primarily in the meristematic zone of primary root and lateral root and base of lateral root primordia. The cloned possible promoter region contains elements and sufficient information for the expression of *At2g41800* and the results are consistent with the spatial-temporal patterns described in GENEVESTIGATOR. Auxins and gibberellins promoted the expression of *At2g41800*. A higher intensity of GFP was observed in these treatments. The expression pattern was also altered, since the mark was found in both the meristematic and the

elongation zones of the root. The callus induction process promoted high expression of *At2g41800*. Transgenic plants carrying the *At2g41800* promoter were infected with the nematode *Meloidogyne incognita*. Two days after infection, *At2g41800* expression increased substantially. These results are consistent with those obtained during root development since the generation of galls, feeding structures promoted by the nematode, is a process that requires high cell proliferation and a high concentration of auxins.

The subcellular localization of *At2g41800* is differential depending on the cell type of the root; in the meristematic zone is observed intracellularly, while in the maturation zone is located in the cytoplasm and cell wall. *At2g41800* encodes a protein that can be located in different cellular compartments according to cell type suggesting a function related to signaling mechanisms in different processes regulated by auxin.

I. Introducción

1.1 Pared Celular

La pared celular de las plantas es un compartimento dinámico cuya composición y estructura varían tanto durante el desarrollo como en respuesta a señales ambientales. Los dos procesos principales relacionados con los cambios en la estructura de la pared celular son la elongación, proceso que implica una amplia renovación del material que la constituye y la reestructuración que incluye engrosamiento de la misma. La elongación de los diferentes tejidos es un proceso que implica la renovación del material que constituye a la pared celular y que requiere de una síntesis y exportación de los componentes de la pared celular incluyendo polisacáridos y proteínas. El crecimiento por elongación celular ha sido descrito en escape floral, hojas, raíces, filamentos de estambres, silicuas, pétalos y sépalos. En particular, el crecimiento del tubo polínico y el de la radícula durante la germinación involucran tanto una nueva síntesis como una remodelación de la pared celular asociados al incremento en el volumen celular. La reestructuración de la pared celular está relacionada con una importante reorganización de los diferentes elementos y tiene lugar también a lo largo de todo el ciclo de la planta (Derbyshire et al, 2007). La remodelación de la pared celular ha sido descrita en anteras dehiscentes y en la maduración del polen, en la fecundación, en el proceso de maduración de las semillas, en las siliquis dehiscentes y en la germinación de las semillas. La modificación estructural de la pared celular está también involucrada en adhesión, un evento esencial en la comunicación célula-célula en plantas.

1.1.2 Composición de la Pared Celular

Las paredes celulares están compuestas de tres tipos de capas: la lámina media, la pared celular primaria y la pared celular secundaria. La lámina media se forma después de que ocurra la mitosis creando una separación entre las dos células hijas. La pared celular primaria es sintetizada a través del crecimiento y expansión celular, mientras que la pared celular secundaria se presenta una vez que el crecimiento celular ha cesado y no está presente en

todos los tipos celulares. En particular, las células del parénquima y del colénquima frecuentemente tienen únicamente una pared celular primaria (Salisbury, 1992).

Tabla 1. Componentes estructurales de la pared celular primaria en plantas

Componentes estructurales de la pared celular primaria		
CLASE	Monómero	Polímeros específicos
Celulosa 25%	Glucosa	(1→4)β-D-glucano
Pectinas 25%	Acido galacturónico	Homogalacturonano
	Ácido galacturónico y Ramnosa	Ramnogalacturonano I y II (RGI y RGII)
Hemicelulosa 35%	Xilosa glucosa	Xyloglucano
	Arabinosa	Xilano
	Manosa Fucosa Galactosa	Glucomanano
	Arabinosa Galactosa	Arabinoxilano
	Glucosa	(1→3) β-D-glucano (Calosa)
Proteínas estructurales 10%		HRGP (Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina), PRP (proteínas ricas en prolina), GRP (proteínas ricas en glicina).

La pared celular primaria está compuesta por aproximadamente 95% de polisacáridos y entre 5-15% de proteínas (CWP's). Dentro de los polisacáridos, aproximadamente el 25% corresponde a celulosa, 25% a hemicelulosa y 35% a pectinas. Las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa constituyen una red con proteínas estructurales que están embebidas en una matriz de pectinas. El porcentaje de proteínas estructurales varía de 1 a 8%, en peso seco según el tipo celular y estado de desarrollo (Tabla 1). Sin embargo, estas proporciones pueden variar dependiendo del tipo de planta. Por ejemplo, algunos pastos contienen de 60 a 70% de hemicelulosa, de 20 a 25% de celulosa y únicamente 10% de pectinas. La pared celular secundaria tiene un contenido de celulosa mayor (Salisbury, 1992).

La pared primaria contiene gran cantidad de agua. El agua está localizada mayormente en la matriz, lo que equivale a 75 a 80% en el volumen total. El estado hidratado de la matriz es muy importante para mantener las propiedades físicas de la pared; por ejemplo, la falta de agua hace a la pared más rígida y menos expandible (Ishrad et al, 2008).

Celulosa

La celulosa es un polímero de glucosa de cadena lineal que presenta enlaces (1—4) β -D-glucosa y corresponde al polisacárido más abundante ampliamente distribuido en la pared de plantas, algas y bacterias (Popper y Tuohy, 2010). Las microfibrillas de celulosa, fuertemente empaquetadas, son estructuras rígidas que contribuyen a dar fortaleza y forma a la pared celular. Debido a la disposición paralela de las moléculas de celulosa, las microfibrillas se comportan como cristales, y presentan una gran resistencia a la tensión. Como resultado, la celulosa es muy fuerte y estable para resistir a la degradación (Taiz y Zeiger, 2008).

Hemicelulosa

Las diferentes hemicelulosas son polisacáridos flexibles formados por diferentes hexosas que tienen la característica de unirse a la superficie de la celulosa (Tabla 1). Estas macromoléculas están ampliamente distribuidas en la pared celular de organismos fotosintéticos (Popper y Tuohy, 2010). Estos polímeros pueden formar un lazo que une las microfibrillas de celulosa a una red cohesiva, o pueden actuar como una capa resbaladiza para prevenir contacto directo entre las microfibrillas. Algunas hemicelulosas están relacionadas con los procesos de recubrimiento de tejidos dañados (Taiz y Zeiger, 2008).

Pectinas

Las pectinas son una familia de polisacáridos complejos compuesta por ácido galacturónico y ramnosa (Tabla 1). En particular, el RGII presenta una estructura muy conservada y específica de plantas vasculares (Popper y Tuohy, 2010)

Las pectinas forman la fase del gel altamente hidratada en la cual la red de celulosa y hemicelulosa están embebidas. Las pectinas actúan como un relleno hidrofílico que previene la agregación y el colapso de la red de celulosa. Son capaces de determinar la porosidad de la pared celular para dejar pasar macromoléculas; este polisacárido complejo es secretado en la

forma metil-esterificada y subsecuentemente el grupo metilo es removido por las enzimas que presentan una actividad de pectin metil esterasas (Taiz y Zeiger, 2008). La remoción del grupo metilo de la pectina es diferencial por lo que las moléculas de pectina pueden presentar diferentes propiedades estructurales y funcionales durante las diferentes etapas del desarrollo vegetal. Los niveles de esterificación de las pectinas están relacionados tanto con procesos de desarrollo como con procesos de resistencia a patógenos (Peaucelle et al., 2008; Wietholter et al., 2003).

1.1.3 Proteínas de Pared Celular

La composición de la pared celular continuamente es modificada por la acción de enzimas durante el crecimiento y el desarrollo y en respuesta a condiciones ambientales dando lugar a una reestructuración continua de la misma (Cassab, 1998). Las proteínas con actividad enzimática y sus moduladores de actividad están presentes diferencialmente en los diferentes tipos celulares. Los análisis proteómicos de la pared celular se han realizado en diferentes especies de plantas tanto monocotiledóneas como eudicotiledóneas incluyendo *Zea mays* (Álvarez et al, 2006), *Medicago sativa* (Watson et al, 2004), *Cicer arietinum* (Bhushan et al, 2006), *Arabidopsis thaliana* (Jamet et al, 2008) y *Vitis vitivinifera* (Wellmer et al, 2004). Por otro lado, estos análisis también se han llevado a cabo en diferentes tejidos de *A. thaliana* como cultivos en suspensión (Robertson et al, 2009; Chivasa et al, 2002; Borderies et al, 2003; Borner et al, 2003; Bayer et al, 2003), hipocotilos etiolados (Feiz et al, 2006; Irshad et al, 2008; Charmont et al, 2005), meristemos (Mimic et al, 2007), tallos y hojas de roseta (Boudart et al, 2005). Aproximadamente 400 proteínas diferentes se han identificado en los proteomas de pared celular, de las cuales solo el 20% han sido previamente relacionadas con la pared celular. Estas proteínas se han clasificado en ocho categorías con base a su posible función bioquímica (Tabla 2). Las diferencias importantes entre la proporción de las categorías según el tejido de origen de la pared celular son independientes de los métodos de extracción y separación utilizados. Estos análisis apoyan la hipótesis que indica que la composición de la pared celular y, por lo tanto, su estructura están fuertemente reguladas durante el desarrollo (Jamet et al, 2006). La mayor proporción de proteínas relacionadas con la modulación de carbohidratos ha sido detectada en los tejidos vegetativos mientras que la

relación más alta de proteínas de función desconocida (Domain Unknown Function families, DUF) se detectó en los proteomas de células en suspensión (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de proteínas de pared celular.

Clasificación de proteínas de pared celular	
Clase	Ejemplo
Proteínas que actúan sobre polisacáridos (22-35%)	Glicosil hidrolasas, glicosil transferasas, carbohidrato esterasas, carbohidrato liasas y expansinas
Óxido reductasas (7-16%)	Peroxidasas, oxidasas multicopper, enzima puente-berberina (S)-reticulina:oxígeno oxido-reductasa, germinas.
Proteasas (7-24%)	Cisteina proteasa, serina carboxipeptidasa y aspártico proteasa.
Proteínas con dominio de interacción (7-23%)	Proteínas LRR (leucine rich-repeat), proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs), lectinas e inhibidoras de proteasas.
Proteínas involucradas en señalización (0-3%)	Proteínas cinasas receptoras de LRR
Proteínas relacionadas con metabolismo de lípidos (0-10%)	Lipasas
Proteínas estructurales (0-1.8%)	Extensinas-LRR
Proteínas de función desconocida (5-30%)	DUF26, DUF231, DUF246, DUF248, DUF288, DUF642, DUF1005 y DUF1680.

1.1.4 Vía secretora de proteínas de pared celular

El sistema endomembranal está compuesto de muchos organelos, donde cada uno debe mantener una composición única de membranas y de proteínas transportadoras (Bassham et al, 2003). El tráfico fluye en dos principales vías a través del sistema secretorio: vía secretora y

endocítica. La vía secretora representa la mayor ruta biosintética que inicia con proteínas sintetizadas de novo que han sido dirigidas a la membrana del retículo endoplasmático, luego fluye al aparato de Golgi, y subsecuentemente a la membrana plasmática y/o a la pared celular. De forma contraria, la ruta endocítica representa un flujo contrario de material endocitado de la membrana plasmática a la matriz extracelular, el cual viaja por medio de endosomas a las vacuolas (Bassham et al, 2003).

La vía de secreción de proteínas en eucariontes involucra una región N-terminal llamada Péptido Señal o secuencia líder, la cual dirige la proteína nascente al retículo endoplasmático (ER), el resto de la proteína es cotradicionalmente translocado a través del complejo Sec61 hacia el lumen del ER (Rapoport, 2007). La proteína sintetizada pasa a través de un sistema endomembranal, o vía secretora, que comprende el aparato de Golgi y la red trans-Golgi, donde es empaquetada en vesículas que migran y se fusionan con la membrana plasmática deformándola y dejando pasar los productos hasta la pared celular (Figura 1). La vía principal de secreción en plantas para proteínas localizadas en la pared celular es la ruta clásica ER-Golgi (Rose y Lee, 2009). La secreción puede ser rápida y activada por estrés externo (Keller et al, 2008). Por otro lado, las proteínas pueden ser retenidas en el ER o en Golgi tal como ha sido descrito para las pectin metil esterasas (Foresti y Denecke, 2008). La secreción polarizada o espacialmente regulada provee otro punto de complejidad al sistema secretor en general. Las proteínas localizadas en la membrana plasmática, tales como las de la familia de transportadoras de auxinas, PIN, pueden mostrar un tráfico polar hacia caras específicas de la célula (Zársky et al, 2009).

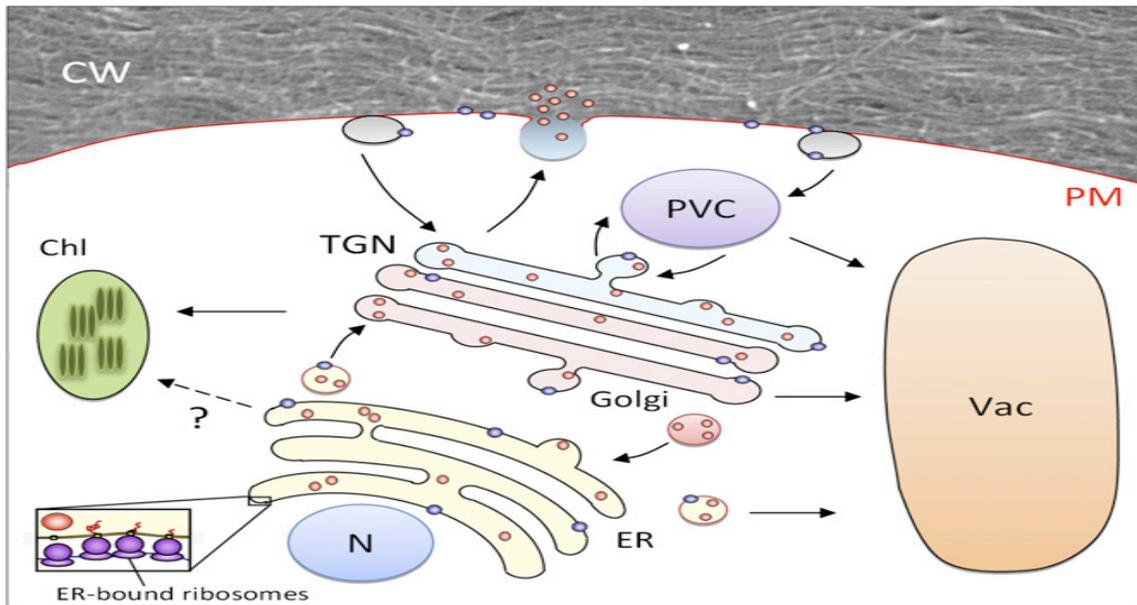


Figura 1. Diagrama esquemático de la vía de secreción clásica de plantas. Proteínas solubles y ancladas a membrana se muestran en color rojo y azul, respectivamente. N, núcleo; Chl, cloroplasto; TGN, red trans-Golgi; PVC, compartimentos prevacuolares; PM, membrana plasmática; CW, pared celular, Vac, vacuola. Imagen de Foresti y Denecke (2008).

Muchas características del sistema secretorio de plantas parecen ser diferentes a los anteriormente descritos en la literatura y algunos aspectos son aún incomprensibles, tal como la identidad del mecanismo de transporte que puede llevar proteínas secretadas desde Golgi, la red trans-Golgi, o compartimentos prevacuolares a la membrana plasmática (Foresti y Denecke, 2008).

1.2 Características de la familia DUF642 en *Arabidopsis thaliana*

DUF642 representa la familia de proteínas más importante de función desconocida detectada en proteomas de pared celular debido a que es la única detectada en todos los proteomas de pared celular de diferentes tejidos y plantas reportadas hasta la fecha. Es una familia altamente conservada y es específica de Espermatófitas (gimnospermas y angiospermas, Figura 2). Por lo tanto, esta familia de proteínas podría estar involucrada en alguna ó algunas de las características funcionales particulares de las espermatófitas. Los miembros de esta familia de las diferentes plantas se agrupan en 3 clados; A, B y C. (Vázquez-Lobo et al., 2011 enviado).

El clado A agrupa a las proteínas descritas en los proteomas de pared celular y presenta dos subclados A1 y A2. En los clados B y C se agrupan las proteínas que presentan un posible sitio de modificación postraduccionaL GPI según los análisis *in silico*. Solo en los proteomas de membrana de *A. thaliana* y de *Oryza sativa* han sido descritas proteínas DUF642 que se agrupan en los clados B o C (Natera et al, 2008; Borner et al, 2003). El clado C es exclusivo de dicotiledóneas y el subclado A2 está mayoritariamente representado en dicotiledóneas donde presenta una duplicación (Vázquez-Lobo et al, 2011, enviado). La arquitectura de las proteínas DUF642 descrita en las diferentes plantas incluye un péptido señal, un dominio único no catalítico altamente conservado con una función aún no asignada que comparte similitud con el dominio de unión a galactosa, y, en algunos casos, un sitio de reconocimiento para GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol). Se ha sugerido que la interacción con otras moléculas incluyendo proteínas es indispensable para llevar a cabo la función de proteínas que carecen de un dominio catalítico por lo que la función de las proteínas de la familia DUF642 puede estar relacionada con la interacción con algún polisacárido y/o enzimas de la pared celular (Hewesi et al, 2008).

En *A. thaliana*, se han reportado 10 genes pertenecientes a la familia DUF642 agrupados en tres clados que prácticamente se expresan en todos sus tejidos. El clado A incluye los genes *At4g32460*, *At5g11420*, *At5g25460*, *At1g80240* (subclado A1), *At3g08030*, *At2g41800* y *At2g41810* (subclado A2). Las proteínas de membrana *At1g29980* y *At1g34510* se agrupan en el clado B y *At5g14510* es la única de clado C. Las proteínas codificadas por *At5g11420* y *At4g32460*, pertenecientes al subclado A1, han sido descritas en la pared celular de hipocótilos y tallos e interaccionan *in vitro* con la Pectin Metil Esterasa 3 (ATPME3) y con la proteína FLOR1 de la familia de las Proteínas Ricas en Leucinas (Leucine Rich Repeat, LRR), descritas en proteomas de pared celular de tejido vegetativo (Zúñiga-Sánchez, 2007). La ATPME3 ha sido descrita como la proteína receptora de una proteína de unión a celulosa secretada por el nemátodo *Heterodera schachtii* (Hewesi et al., 2008) mientras que en tabaco se ha descrito que la homóloga de ATPME3 es la proteína receptora de la proteína del virus del mosaico de tabaco (TMV MP) (Chen et al., 2000; Dorokhov et al., 1999). *At4g32460* se expresa en el tejido vascular de los diferentes órganos principalmente en células asociadas al floema tal como ha sido descrito para la ATPME3 (Zúñiga-Sánchez comunicación personal).

A pesar de que las proteínas de la familia DUF642 se han detectado exhaustivamente en proteomas de pared celular, se han descrito dos formas de mRNA para los genes *At4g32460* (clado A1), *At3g08030* (clado A2) y *At1g29980* (clado B). Esta estrategia molecular puede generar proteínas con o sin péptido señal como consecuencia de un mecanismo que reconoce un primer exón alternativo (AFE, Alternative First Exon, Chen et al., 2007). Esto sugiere que las proteínas de la familia DUF642, que podrían estar involucradas en procesos fundamentales del desarrollo de las plantas, posiblemente actúen en diferentes compartimentos subcelulares. Aunque no existen estudios relacionados con la familia DUF642, se han detectado cambios en la expresión de algunos de sus genes en diferentes circunstancias. La infección por patógenos, el ataque de herbívoros y el estrés abiótico promueven una expresión diferencial de algunos de los genes DUF642. Los genes *At3g08030* y *At1g29980* son regulados positivamente en *A. thaliana* infectadas por organismos que promueven el desarrollo de órganos vetedero como *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus fascians* y por nemátodos (Lee et al., 2009; Depuydt et al, 2009, Barcala et al., 2010). Los patógenos, principalmente bacterias y hongos que inducen necrosis regulan negativamente la expresión de los diferentes genes de esta familia (Ndimba et al, 2003; Hu et al, 2008). En general, los diferentes tipos de estrés abiótico regulan negativamente la expresión de los genes de la familia DUF642.



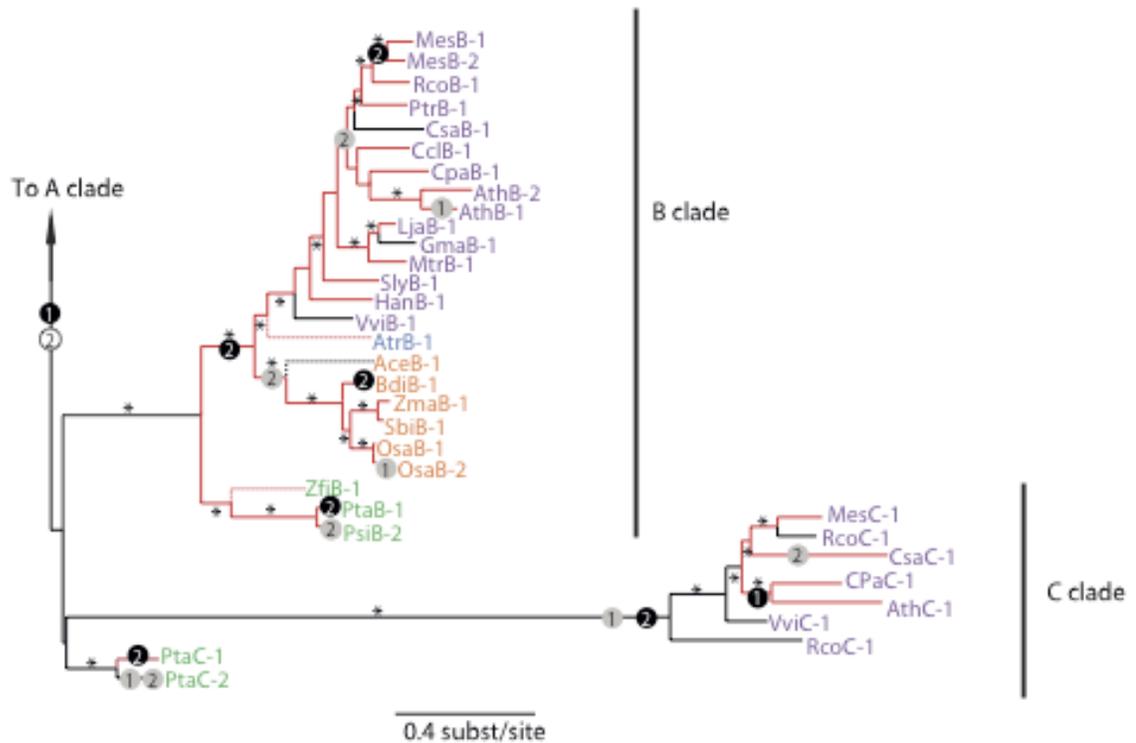


Figura 2. Filogenia de los genes DUF642. Genes en color verde corresponden a gimnospermas, en naranja a monocotiledóneas, en púrpura se muestran las eudicotiledóneas o dicotiledóneas y en azul están señaladas las angiospermas basales. Con asterisco rojo se señala la localización de *At2g41800* en el subclado A2 (Vázquez-Lobo et al, 2011 enviado).

Características de *At2g41800*

Dentro del árbol filogenético de la familia DUF642, el gen *At2g41800* se encuentra en el subclado A2 (Figura 2, asterisco rojo) (Vázquez-Lobo et al., 2011 enviado). La proteína *At2g41800* ha sido identificada exclusivamente en todos los proteomas de pared celular en los que se han utilizado células en suspensión, células que carecen de pared celular secundaria y presentan plasmodesmos primarios poco selectivos. Según estudios transcriptómicos, la expresión de *At2g41800* es regulada positivamente por las auxinas, giberelinas y citocininas y

regulada negativamente por los brasinosteroides (Goda et al, 2004). Por otro lado, el gen *At2g41800* ha sido detectado en células de la papila estigmática (Tung et al, 2005).

Datos proporcionados por GENEVESTIGATOR basados en estudios transcriptómicos recabados de diversas bases de datos indican que la expresión de *At2g41800* es mayor en flores, la región más joven del tallo y raíces. En flor, la mayor intensidad se detecta en la papila estigmática de la flor en el estadio 12 (Figura 3). En raíces de siete días post-germinación, el mayor índice de expresión se encuentra en la zona meristemática particularmente en las células epidérmicas y del cortex y en la zona de diferenciación donde las raíces laterales emergen (Figura 4).

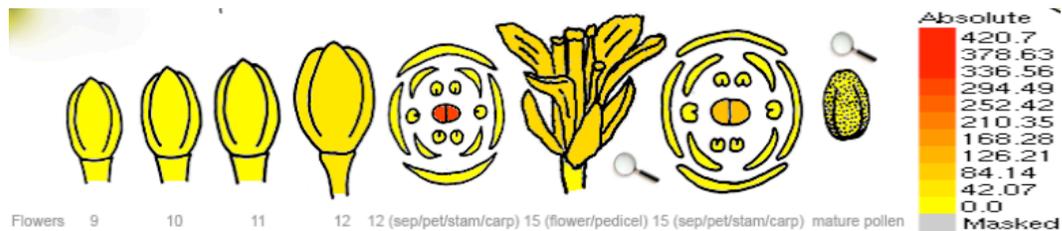


Figura 3. Patrón de expresión de *At2g41800* a lo largo del desarrollo de la flor en base a estudios transcripcionales proporcionados por GENEVESTIGATOR. La escala de expresión está representada desde el color amarillo, siendo ésta la escala de menor o nula expresión, hasta el rojo que indica la mayor expresión. (Brady et al, 2007).

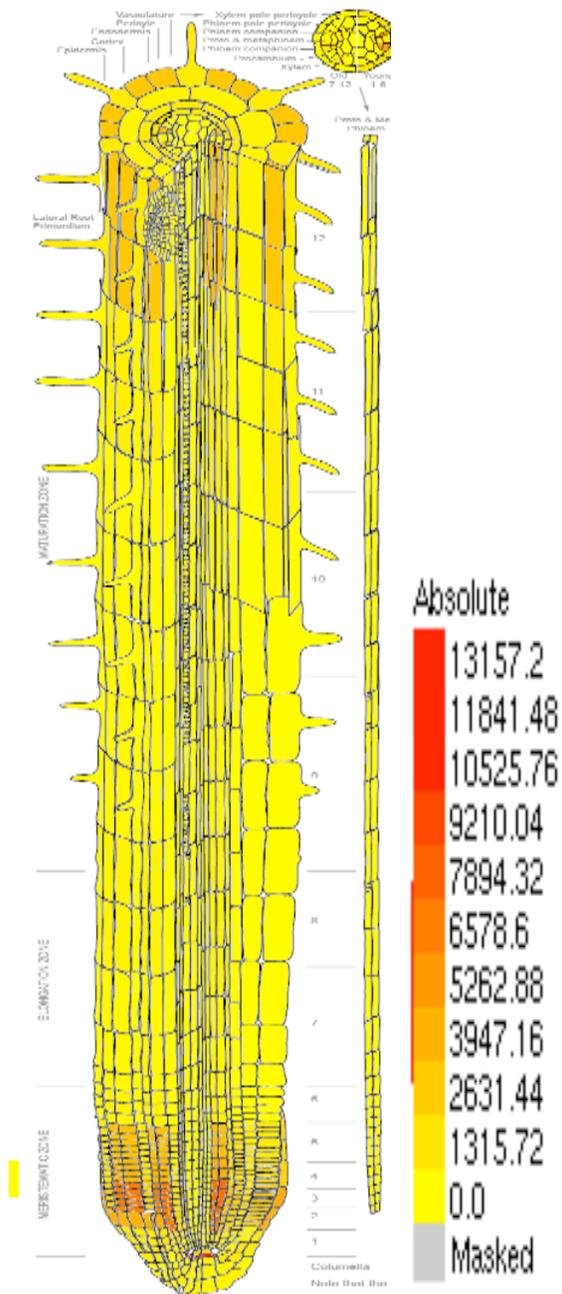


Figura 4. Datos de la expresión de *At2g41800* en raíz de plántulas de 7 días post-germinación en base a estudios transcripcionales proporcionados por GENEVESTIGATOR. La escala de expresión está representada desde el color amarillo, siendo ésta la escala de menor o nula expresión, hasta el rojo que indica la mayor expresión. (Brady et al, 2007).

En transcriptomas de callo se ha detectado una importante expresión de *At2g41800* y es uno de los veinte principales genes que son regulados negativamente durante el proceso de reprogramación de la raíz a partir de callo (Che et al, 2006). Recientemente se ha descrito que la formación del callo no es resultado de una reprogramación de las células a un estado no diferenciado sino que es un proceso de diferenciación a partir de un tipo celular que se encuentra en todos los tejidos denominado *pericycle like cells* en referencia a las similitudes con las células de periciclo de la raíz, tejido en el cual es más fácil estudiar este proceso (Sugimoto et al, 2010). Recientemente se ha descrito que las estructuras que se desarrollan en la raíz durante la infección por nemátodos también se derivan de este tipo celular (Grunewald et al., 2009).

1.5 RAIZ

Las raíces son responsables de la absorción de nutrientes y agua, además de proveer soporte físico a la planta. El estudio de la raíz en *A. thaliana* ha sido de vital importancia debido a la simplicidad en su estructura y al amplio conocimiento molecular y fisiológico en esta planta modelo.

La raíz está constituida por tres distintas zonas; la zona meristemática que mide unos 250µm, la zona de elongación con 250µm y la zona de diferenciación, en la cual las células maduran (Dolan et al., 1993). En el meristemo de la raíz se pueden encontrar 11 tipos celulares distintos acomodados en un cilindro concéntrico alrededor de un eje radial (Iyer-Pascuzzi et al., 2009) (Figura 5). Un pequeño número de células meristemáticas en la punta de la raíz son las encargadas de generar todos los tipos celulares tras una serie de divisiones seguidas por la diferenciación celular y la regulación de la expansión de las células (Scheres et al., 2002). Las células del meristemo de la raíz rodean a un pequeño grupo de células llamadas Centro Quiescente (QC) (Figura 5). El centro quiescente mantiene las células meristemáticas: si el centro quiescente es eliminado, ya sea por ablación con láser o por mutación, las células meristemáticas se diferencian y se detiene el crecimiento de la raíz (Van der Berg et al., 1997; Sabatini et al 2003).

Desde la perspectiva de desarrollo, la raíz de *A. thaliana* es un perfecto ejemplo de simplicidad. La simetría radial de la raíz combinada con la falta de movimiento celular significa que las células clonalmente relacionadas frecuentemente se encuentran en filas celulares. Las células que componen estas filas celulares presentan una importante comunicación intercelular por la presencia de un gran número de plasmodesmos en las paredes celulares transversales (Burch-Smith et al., 2010). Las células de la epidermis y de la cofia lateral son formadas por un mismo tipo de células iniciales. La porción central de la cofia, la columela, tiene su propio grupo de células iniciales. El cortex y la endodermis, son generadas por división de las células iniciales del cortex/endodermis. Finalmente, el tejido vascular y el periciclo tienen sus propias células iniciales. En contacto con todas las células iniciales están las células del centro quiescente (Scheres et al, 2002; Figura 5).

La división de las células iniciales puede ser tanto anticlinal (ortogonal al eje de crecimiento) resultando en una sola fila de células como periclinal (paralelo al eje de crecimiento) resultando en dos o más capas celulares. Las iniciales de la columela generalmente se dividen únicamente anticlinalmente y su progenie produce una rápida expansión y luego se diferencian, produciendo amiloplastos que contienen almidón, el cual juega un papel en el gravitropismo de la planta. Los otros tres tipos de iniciales generalmente se dividen tanto anticlinal como periclinalmente, resultando en linajes celulares que adquieren distintas identidades (Dolan et al., 1993).

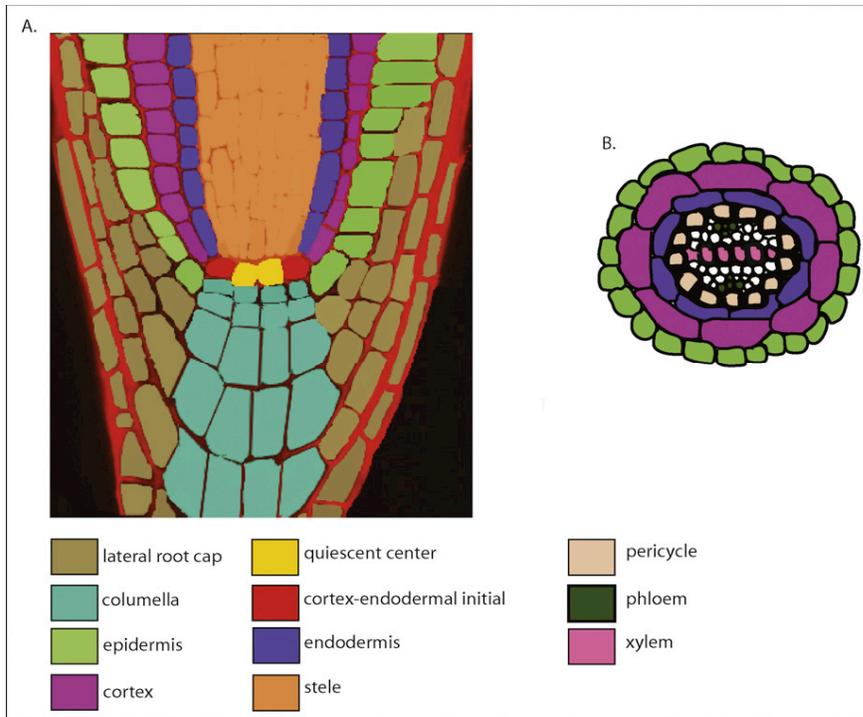


Figura 5. Diagrama de los tipos celulares en el meristemo de la raíz de *A. thaliana* (Iyer-Pascuzzi, 2009). En A se muestra un corte longitudinal mientras que en B se muestra un corte transversal. Los diferentes tipos celulares están marcados en diferentes colores.

1.6 Raíz Lateral

Las raíces laterales se desarrollan en la zona de diferenciación a partir de un grupo de células del periciclo situadas en la periferia de haz vascular (Fahn 1990; Malamy y Benfey 1997). En *A. thaliana*, las raíces laterales se inician en las células opuestas a los polos del xilema formando dos filas por crecimiento acropetal a lo largo del eje de la raíz principal (Casimiro et al., 2003; De Smet et al, 2007). Dos distintos estadios del desarrollo de la raíz lateral han sido identificados en *A. thaliana*; la formación de un primordio seguido por la formación del meristemo que dará lugar la raíz lateral (Laskowski et al, 2006). La formación del primordio comienza cuando las células del periciclo descritas como fundadoras se dividen transversalmente y de manera asimétricas dando lugar a dos células pequeñas y dos células largas (Dubrovsky et al, 2000; Pulka y Nakielski, 2010). Las células hijas pequeñas se dividen periclinalmente para dar lugar a las capas celulares internas y externas del primordio (Pulka y Nakielski, 2010). La expansión del primordio es resultado de divisiones subsecuentes orientadas tanto anticlinal como periclinalmente y finalmente una pequeña protrusión se

desarrolla penetrando los tejidos de la raíz parental (Malamy y Benfey, 1997). Cuando el primordio es de 3-5 células de ancho, el segundo estadio se inicia y el meristemo autónomo se forma (Laskowski et al, 2006). El número de células rápidamente se incrementa y el primordio presenta de 8-10 capas celulares y emerge desde la superficie de la raíz parental (Pulka y Nakielski, 2010). En este estadio, ya es posible observar una estructura celular muy organizada (Malamy y Benfey, 1997). El proceso completo de la formación de la raíz lateral es inducido y posteriormente controlado por la acumulación de auxinas que induce divisiones asimétricas de las células fundadoras (Casimiro et al, 2001; De Smet et al, 2007; Dubrovsky et al, 2008; Laskowski et al, 2006).

Como en otros órganos de las plantas, el ápice de la raíz crece simplásticamente pues el crecimiento coordinado de las células requiere de un contacto mutuo entre las paredes contiguas (Romberger et al, 1993; Pulka y Nakielski, 2010).

1.7 Regulación hormonal durante la protrusión de la raíz lateral

Recientemente se han hecho considerables avances describiendo el papel de la auxina durante la formación de la raíz lateral en *Arabidopsis* (Fukaki et al, 2007; Péret et al, 2009). La importancia de la acumulación de auxinas para la iniciación de la raíz lateral ha sido estudiada exhaustivamente puesto que es el primer evento visible (Benková et al, 2003). Sin embargo, las auxinas también se requieren para la pre y post iniciación de eventos incluyendo la protrusión (Péret et al, 2009).

En plántulas jóvenes con más de 4 días post-germinación, las auxinas son sintetizadas principalmente en la zona aérea y transportada a la raíz de dos formas de igual importancia: transporte mediado por el floema y transporte polar. A los siete días, el transporte por floema se convierte en la vía dominante (Ljung et al, 2005). Esta fuente aérea de auxinas es requerida para promover la protrusión de la raíz lateral (Bhalerao et al, 2002). De hecho, la remoción de las hojas y cotiledones bloquea la protrusión de la raíz lateral por lo que depende exclusivamente de las auxinas derivadas de la parte aérea (Bhalerao et al, 2002; Swarup et al, 2008). Las raíces laterales adquieren la habilidad de sintetizar auxina únicamente después de

que emergen por lo que se considera poco probable que esta última fuente de auxinas juegue un papel en este proceso (Ljung et al, 2005; Péret et al, 2009). Las auxinas modifican el destino celular y activan la división celular durante su iniciación (Boerjan et al, 1995; Laskowski et al, 2006).

El perfil de expresión de raíces tratadas con auxinas revela un incremento en la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con la remodelación de la pared celular como pectato liasas, pectin metil esterasas, expansinas, y β -xilosidasa posiblemente relacionadas con cambios en la estructura de la pared celular en la región circundante al primordio de la raíz lateral ha sido reportada. Estas enzimas de las células de la endodermis, cortex y epidermis pueden facilitar la separación celular durante la protrusión de la raíz lateral (González-Carranza et al, 2007; Ogawa et al, 2009; Neuteboom et al, 1999; Swarup et al, 2008), Sin embargo, la masiva producción de enzimas de remodelaje en la pared celular en sitios del emergimiento de la raíz lateral no afecta la integridad del primordio (Péret et al, 2009). Esto podría ser explicado por una diferencia en la composición de la pared celular entre el primordio de la raíz lateral y la raíz parental. La pectina en la raíz lateral en desarrollo está altamente metilada mientras que las células que rodean a la raíz parental han sido desmetiladas debido a la acción de las pectin metil esterasas (Laskowski et al, 2006).

1.8 Interacción Planta-Nemátodo

Los nemátodos son organismos cosmopolitas y están entre los patógenos de plantas que mayor daño causan a nivel mundial (Trudgill and Blok, 2001). Estos patógenos biotróficos obligados han desarrollado estrategias para infectar miles de especies de plantas de una manera similar, probablemente manipulando elementos fundamentales del desarrollo celular de la planta (Caillaud et al, 2008).

Durante la interacción entre los nemátodos de plantas y sus hospederos ocurren complejos cambios morfológicos y fisiológicos en el tejido de la planta infectada, resultando en el establecimiento de un sitio de alimentación para el nemátodo. Después de localizar a su hospedero, el nemátodo penetra la raíz hasta llegar al tejido vascular. Las proteínas secretoras

del nemátodo alteran el plan de desarrollo de las células de la raíz, resultando en el establecimiento de sitios especializados de nutrición (NFS) (Grunewald et al, 2008). El nemátodo depende estrictamente de estos sitios para alimentarse durante todo su ciclo de vida (Vanholme et al, 2004). En particular, *Meloidogyne incognita* ha desarrollado una eficiente estrategia para parasitar plantas cuyo NFS consiste en una serie de células gigantes. Durante una interacción compatible, el estadio infectivo Juvenil 2 (J2; 400 µm de largo y 15 µm de ancho) penetra por la cofia, se mueven a través del ápice de la raíz y se introducen al cilindro vascular. Cada J2 induce la reprogramación de cinco a siete células vasculares a células gigantes multinucleadas. Estas “células gigantes” funcionan como reservorios especializados, alimentando al nemátodo hasta su reproducción. Las células gigantes se expanden por crecimiento isotrópico mientras que las células del periciclo y del cortex se dividen y se elongan para formar la agalla. En *A. thaliana*, observaciones citológicas han mostrado que a los 7 días post-inoculación, las células gigantes son multinucleadas y presentan un citoplasma denso; una semana después, la síntesis de DNA decrece considerablemente, pero las agallas y las células gigantes continúan expandiéndose (Caillaud et al, 2008, Grunewald et al., 2009).

De manera similar a lo que ocurre en la iniciación de los primordios de raíces laterales, se ha demostrado la participación de las auxinas en la formación de NSF (Grunewald et al, 2009). Tanto los nódulos como las agallas presentan altos niveles de auxinas (Thimann, 1936; Balasubramanian y Rangaswami, 1962). Se ha demostrado que en nódulos indeterminados de especies como *Trifolium repens* y *Medicago trunculata* hay un incremento en la concentración de auxinas (observado mediante GH3 o DR5 fusionados a β-glucoronidasa), el cual se presenta en el periciclo de las células corticales internas y en las primeras divisiones celulares en el primordio del nódulo (Mathesius et al., 1998a; Huo et al., 2006; van Noorden et al., 2007).

En los sitios de infección de nemátodos se ha determinado un incremento en la concentración de auxinas mientras que las mutantes de genes involucrados en la vía de señalización de auxinas presentan menos sensibilidad a la infección por nemátodos (Hutangura et al, 1999; Karczmarek et al., 2004 y Grunewald et al., 2008). Esto sugiere que el cambio en el programa de desarrollo inducido por el nemátodo es dependiente de auxinas. Se ha propuesto que los

nemátodos alteran la red de distribución de auxinas durante la formación del NFS modulando el transporte de auxinas a través de cambios en la expresión y localización de los diferentes transportadores PIN (Grunewald et al., 2009).

La transformación de las células de la raíz en estructuras de alimentación con una morfología y función muy singular requiere de enormes cambios en la expresión génica de las células de la raíz infectadas (De Almeida Engler et al., 2005). La identificación de los genes de plantas que responden a nemátodos es uno de los mayores retos y se han llevado a cabo estudios transcriptómicos en las agallas. La expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a la pared celular se incrementa notablemente en los primeros días del desarrollo de esta estructura esta el gen *Atlg29980*, perteneciente a la familia DUF642 (Barcalá et al., 2010).

II. Antecedentes

La mayoría de los genes DUF642 se expresan en todos los tejidos de la planta. Estudios de las plantas transgénicas que expresan GFP bajo la región promotora de *At4g32460* demostraron que se expresa en tipos celulares específicos relacionados con el tejido vascular explicando su presencia en todos los tejidos de la planta. En particular, el gen *At2g41800* se detectó por RT-PCR principalmente en raíces, flores e inflorescencia, tejidos que presentan una región meristemática y su proteína sólo ha sido detectada en proteomas de pared celular de células en suspensión, células en constante división. En el tejido de inflorescencia, el mRNA presentó el primer intrón tal como ha sido descrito para otros genes de esta familia, que sugiere como producto final una proteína sin péptido señal con una posible localización intracelular. La posible secuencia completa de *At2g41800*, incluyendo la región río arriba entre este gen y el *At2g41810* y los intrones, es de 2,200 pb por lo que se considera factible iniciar los estudios relacionados con la edición alternativa en los miembros DUF642 con este gen. En este trabajo se determinará si la región de 890 pb río arriba del ATG del *At2g41800* es suficiente para obtener los patrones de expresión descritos en el GENEVESTIGATOR y la respuesta adecuada a diferentes hormonas. La comprobación de que esta región contiene la información suficiente para obtener el patrón de expresión espacio-temporal correspondiente a *At2g41800* nos permitirá llevar a cabo estudios de localización subcelular *in planta* utilizando la proteína quimérica *At2g41800*-GFP bajo esta región.

III. Hipótesis

At2g41800 se expresa principalmente en regiones meristemáticas y la localización subcelular de *At2g41800* es tejido-específica.

IV. Objetivo

4.1 Objetivo General

Determinar el patrón de expresión del gen *At2g41800* y la localización subcelular de la proteína en diferentes tejidos y estados de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

4.2 Objetivos Particulares:

- 1) Determinar la expresión diferencial de *At2g41800* mediante RT-PCR en raíces y escapo floral de diferentes edades de *A. thaliana*
- 2) Determinar la expresión de *At2g41800* en respuesta a diferentes tratamientos hormonales de raíces y cotiledones de plántulas de *A. thaliana* utilizando plantas transgénicas que presentan la proteína GFP bajo la posible región promotora del gen.
- 3) Determinar la expresión de *At2g41800* durante el desarrollo de *A. thaliana* utilizando plantas transgénicas que presentan la proteína GFP bajo la posible región promotora del gen.
- 4) Determinar la localización subcelular de la proteína *At2g41800* en raíz utilizando plantas transgénicas que presentan la proteína quimérica *At2g41800*-GFP bajo la región promotora de *At2g41800*.

V. Métodos

5.1 Determinación de la expresión de *At2g41800* en el escapo floral y raíces por RT-PCR

Plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia se crecieron en condiciones de luz continua y/o fotoperíodo largo (16 h luz y 8 h oscuridad). Las plantas utilizadas para obtener escapo floral, fueron crecidas en macetas dentro de una cámara de crecimiento Conviron a una temperatura promedio de 20°C. La extracción de RNA (Anexo I) de escapo floral se realizó a partir de plantas de 40-45 días y la expresión de *At2g41800* se determinó en 7 internodos (Figura 6).

Las plántulas requeridas para la obtención de raíces fueron crecidas en medio MS (pH 5.7), con previa estratificación de 3 días a la siembra. La extracción de RNA de raíz se realizó en plántulas de diferentes edades post-germinación: 5 días, 7 días y 10 días. Para ambos casos, el tejido colectado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C en un ultracongelador REVCO para su uso posterior.

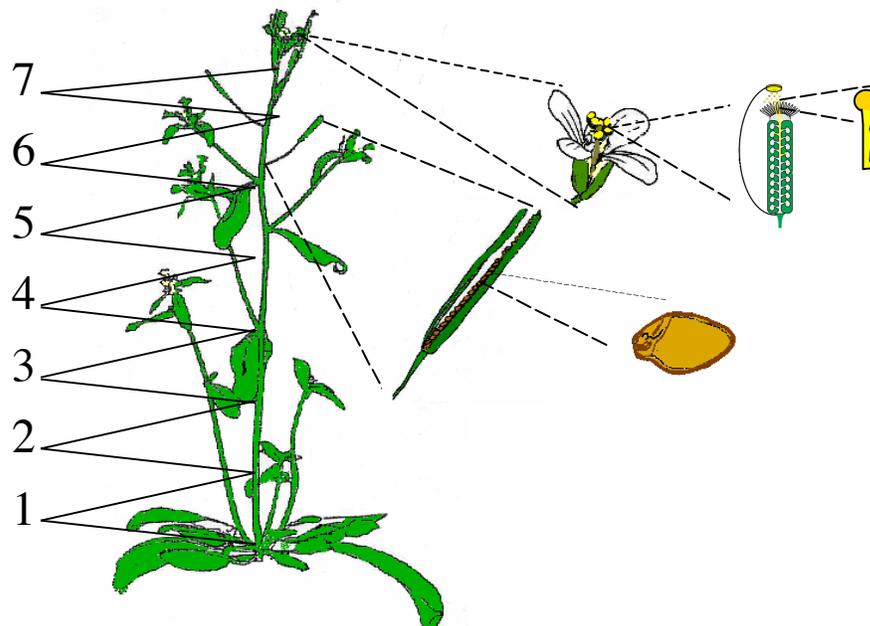


Figura 6. Representación de los siete internodos en los que se dividió el escapo floral de *Arabidopsis thaliana*. Los números indican cada uno de los nodos, siendo el “1” el nodo más basal y el número “7” el más cercano al meristemo de inflorescencia.

El cDNA se sintetizó utilizando RNA tanto de los diferentes nodos del escapo floral como de las raíces, oligo dT (Invitrogen) y la enzima SuperScript II reversotranscriptasa (INVITROGEN) (Síntesis de cDNA, Anexo I). Una vez sintetizado el cDNA se realizaron reacciones de PCR para cada uno de los casos, utilizando un par de oligos (F41800se1 y R41800se1, Anexo II), específicos para *At2g41800*, el cual supone un tamaño de 1,113 pares de bases.

5.2 Obtención de líneas transgénicas para determinar la expresión de *At2g41800* bajo su posible región promotora.

Los oligonucleótidos para amplificar la posible región promotora del gen *At2g41800* se diseñaron a partir de la secuencia río arriba del sitio de inicio de la traducción, estos oligonucleótidos incluyen un sitio HindIII (PROM800F) en el oligo sentido y con un sitio BamHI (PROM800R) en el oligo antisentido (Anexo I).

A partir de DNA genómico (Anexo II) de hojas de roseta maduras se amplificó una secuencia de 890 pb, que corresponde a la mayor parte de la región intergénica (Figura 7) de la posible región promotora.

```
ttaaacaagaacaataactacgtagattgcgaggaaaagaaccaaaaagttgattatgtttt
gcttacatataaactcagtgaatgcaattagatgaacacagacgattagctaggtttcgcat
tgtaatttataaattcatgttggtgcttgcatctactctaaaatttgatgaattcagcgccag
ttaataaatattatgctccatagattggcttttttcgccactttggtgagtgcaacttttcc
gatagtaattttatcaaaaagaaaagaaaaggcacaacaattcctttattttgtaattaaag
ggaaaaattggctagacgacaattcatttaacatgttgagattttttttgatcgcgacgac
ggttgacttgagttcatttaatgtcttgattatatttttcacagcagcatcgctcgtgata
tgtttgatcacaccatgcacatgtaggattcgtgcttggaaggttcgttgcatatttttca
gcgctgatagctcactgcacacaaagtcacaaagcacaagacacgtatttttaattattctt
ttggtaaagtgtaaattagtaattttccatcgtttaatacaaaaaccgaagtaacatgacagac
agtgagtcatacattgaggctcgtaagggtgaggcttttaacgtggttcgagtttcccttcgta
tacttctacacggaaactttctctcataaacaatttttttgccgacaatttagttttgttggt
gtatatttccaaaaatgtacatgctgctgcttccctctttgtttcttatttataatatctcatg
tcaagtgataactgataagtataaaacctctatatatagcccacaaggctcctcattgatata
ggcgaactaattaagaactttaaaAtg ...
```

Figura 7. Secuencia de la posible región promotora del gen *At2g41800*. En rojo se muestran las bases diseñadas como oligonucleótidos sentido y antisentido. En azul está marcado el sitio de inicio de la traducción del gen.

El producto de PCR de 890 pb se clonó en el vector pGEMT-easy la clona idéntica se utilizó para subclonar éste fragmento en el vector de expresión pBIN.

5.3 Obtención de plantas transgénicas.

Se comprobó la presencia del promotor en el vector pBIN tanto por medio de la amplificación por PCR con el oligo sentido del promotor y antisentido de la GFP (PROMF y GFPR, ambos en Anexo II) como por el análisis de restricción, utilizando las enzimas BamHI y HindIII. Este vector con la región promotora unida a la proteína reportera GFP en el vector pBIN, se utilizó para transformar *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación (Anexo I). Para transformar *Arabidopsis thaliana*, se utilizó el método “Floral Dip” (Anexo I) en plantas silvestres ecotipo Columbia de una edad de 42 días cuando las plantas mostraban una mayor cantidad de botones florales.

Las plantas se seleccionaron en medio MS con kanamicina (50 mg/mL), y se transplantaron las plantas resistentes al antibiótico a una maceta cuando éstas presentaban más de dos hojas verdaderas. En las plantas de la primera generación (T1), se determinó la expresión de la GFP mediante oligos específicos para esta proteína reportera utilizando los oligos GFPF y GFPR (Anexo II), así como también empleando la combinación del oligo sentido del promotor (PROM800F) y el antisentido de la GFP (GFPR). En un segundo proceso de selección con kanamicina, se obtuvieron tres líneas homocigotas.

5.4 Determinación de la expresión de *At2g41800* durante el desarrollo de la planta utilizando Microscopía Confocal.

Se utilizaron los objetivos desde 10X a 40X de un microscopio confocal Olympus FV100 para observar los diferentes tejidos. Para la detección de la proteína verde fluorescente (GFP) se empleó una longitud de excitación de 485-545 nanómetros. En algunas muestras se utilizó Ioduro de Propidio para teñir la pared celular (50mg/ml).

Se utilizó como control una línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* en cada uno de los procesos, para tomar los parámetros adecuados de GFP para evitar la autofluorescencia del tejido.

5.5 Determinación de la expresión de *At2g41800* durante la inducción de callo a partir de tejido de raíz y cotiledón.

La inducción de callo se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Che et al., (2002). Las raíces y cotiledones fueron colectados de plántulas crecidas en medio MS de una edad de 8 días post-germinación. Los explantes de raíz y cotiledón fueron transferidos al medio de inducción de callo (CIM): medio Gamborg's B-5 (Gamborg et al., 1968), con 20g/l de glucosa, 0.5 g/l de MES, 2.2 μ M de 2-4-D, 0.2 μ M de kinetina y 3.3 g/l de gelan. El pH fue ajustado a 5.7 usando KOH 1M. Los explantes de cotiledón y de raíz fueron incubados en el medio CIM durante diferentes periodos de tiempo. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles.

5.6 Infección de las plantas de *A. thaliana* con el Nemátodo *Meloidogyne incognita*.

Plantas transgénicas que expresan el gen reportero GFP bajo la región promotora de *At2g41800* fueron crecidas en medio Murashige-Skoog (MS) al 0.5X durante siete días, para posteriormente ser infectadas por una cantidad aproximada de 250 J2 (nematodos en estadio juvenil 2) por planta. Los estudios de microscopía confocal se realizaron a las 48 horas de la infección.

5.7 Obtención de líneas transgénicas del gen completo para determinar la localización subcelular de la proteína codificada por *At2g41800*.

Para la amplificación del gen completo se utilizó como oligo sentido el utilizado en el promotor PROM800F (Anexo II), el cual incluye un sitio HindIII y como oligo antisentido se empleó SP41800LSR (Anexo II) el cual se sitúa al final del último exón del gen y que incluye un sitio de corte BamHI. Se amplificó una secuencia de 2,222 pb (Figura 2) del gen

incluyendo la posible región promotora, exones e intrones. La extracción de DNA genómico se realizó a partir de hojas de roseta maduras (ANEXO I).

cgtagattg**cg****gagaaaagaacc**aaaaagttgattatgtttgcttacatataaactcagtgaatgcaattagatgaacacagac
gattagctaggttcgctcattgtaattataaattcatgttggtgcttgcactactctaaaattgatgaattcagcgccagttataaat
attatgctccatagattggctttttcgcccactttggtagtgcaactttccgatagtaattttatcaaaaagaaaagaaaaggcac
aacaattcctttattttgtaattaaagggaaaaattggctagacgacaattcatttaacatgttgagatttttttgcacgatcgacg
gttgacttgagttcatttaagtcttgattatttttcacagcagcatcgctcgtgatatgttgaatcacaccatgcacatgttagg
attcgtgcttggaggttcggttcacatattttcagegtctgatagctcactgcacacaaagtcacaaagcacaagacacgtattttaa
ttattcctttgtaaagtgtaaattagtaattttccatcgttaatacaaaaccgaagtaacatgacagacagtgagtcatacattgagg
ctcgtgaaggtcggtcttaacgtggttcgagtttcccttcgtatactctacacggaaactttctctataaacaattttttgcccaca
attagttttgtgtgtatattttcaaaaatgtacatgctgctgcttccctttgtttctatttataatctcatgcaagtataactgata
agtataaaacctcctatatatagcccacaaggtcctcattgatatagggcaactaattaataag**actt**aaa**ATGTCCTCTC**
TATCACTCTCTTAGCATTTTCTCCTCCTATCTCTCTGCCATGGCTCTTACAGT
CTTCAACCACGTCGAGTTCCTCATCTAGACGgtaagacaat**caacatgaagttataatattcatttcta**
tatcaattaattgataa**actaatt**aaacatgacggtgtaataattcatggtttccatatctatag**GGATTCTCCCAAATG**
GAAACTTCGAGATAACCCCTCTCAAATCAAACATGAAGGGTTCGACAAATAAT
CGGGGCTAACTCTCTTCCCTCATTGGGAAATCGCCGGGCACGTGGAGCTAGTCT
CCGGTGGACCTCAGCCTGGAGGATTCTATTTCCCGTTCCACGTGGAGTCCAC
GCGGTTAGACTCGGAACTTGGGCACCATCTCTCAGAACGTGAGGGTGAAGA
GTGGTTTGGTCTACTCTCTAACGTTTCGGAGCTACGAGGACTTGTGCTCAGGAT
GAGAACATCAAAGTCTCTGTGCCTGGTCAGGCCAATGAGCTTCCGCTCCAGA
CCGTCTTTAGCTCCGACGGTGGAGACACTTACGCTTGGGCTTTCAAGGCAACT
TCTGATGTGGTTAAGGTCACTTTCCATAACCCGGTGTTC AAGAAGACCGCA
CGTGTGGACCTCTCTTAGATGTTGTCGCAATCAAGGAGATTCTTCTCTCCGG
TATACCAGAGgtaaatcaattaacatataccggttagttaaataatattttgagctttgagctttgatccttataactttag
ctatgtgtttatgcttagcctgtaacattgtttgttctcttag**GAAACTTGGTGAAAAATGGAGGATTTCGA**
GATCGGTCCACATGTTTTCGCTAATTTCTCAACCGGAATCTTGATTCCAGCAA
GAATCCAAGACTTCATCTCTCTTCCGGGATGGATCGTTCGAATCCCTTAAA
CCAGTGAAGTATATCGATAGACGTCATTTCAAAGTTCCTTATGGACAAGGGG
CCGTCGAGCTAGTTGCCGGAAGAGAAAGCGCAATAGCTCAGATCATCCGAAC
CATCGCTGGTAAAGCCTATATGCTCTCATTTCGCGGTTGGTGTATGCACAAAACG
GTTGCCACGGGTCGATGATGGTGGAAGCGTTCGCAGGAAGAGAACCGTTTAA
GCTTTCTTTTATGTCAGAAGGTAAAGGAGCGTTCAAAACAGGGCATTTTAGGT
TTGTTGCTGATTTCGGATCGAACGAGGCTAACGTTTTATAGTGCGTTTTATCAT
ACAAAGCTTCATGACTTCGGCCATCTTTGTGGGCTGTTCTTGATAGCGTTGT
TGTTACCCTGGCCCGTTAA

Figura 8. Secuencia del gen *At2g41800* que incluye la posible región reguladora y la codificante. En negrita se muestra la posible región promotora la cual al inicio muestra el oligo sentido (color café) que se utilizó para amplificar la secuencia. En naranja se muestran los tres exones del gen y en azul los intrones. Al final del tercer exón está señalado el oligo antisentido en color café. En color rojo se

muestran dos motivos: **actta** es un elemento cis de respuesta auxinas y **tgtctc** es un motivo de reconocimiento para el factor de transcripción ARF.

VI. Resultados

6.1 Expresión de *At2g41800* en diferentes estadios de desarrollo.

La expresión de *At2g41800* ha sido detectada por RT-PCR en los diferentes tejidos de *Arabidopsis* (Zúñiga-Sánchez, 2007). Sin embargo la proteína *At2g41800* ha sido determinada exclusivamente en los proteomas de pared celular de células en suspensión (Chivasa et al, 2002; Borderies et al, 2002; Slabas et al, 2004 y Bayer et al, 2006). Estos datos sugieren que la expresión de *At2g41800* podría ser específica de zonas de proliferación de los diferentes tejidos por lo que se consideró importante determinar su expresión en tejidos con diferentes estados de desarrollo.

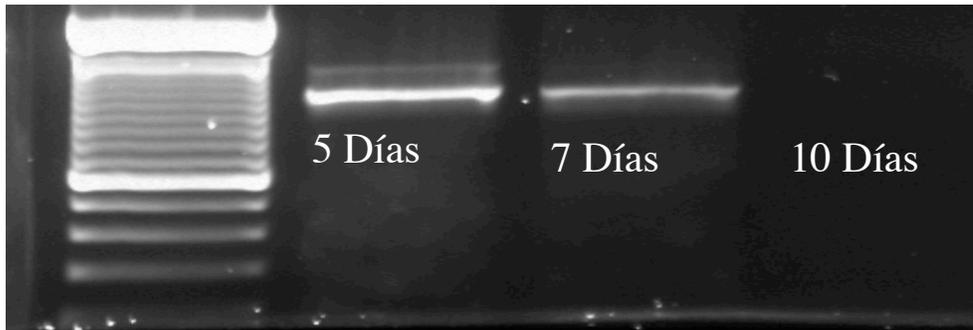
6.1.2 Expresión en raíces de diferentes edades

La expresión de *At2g41800* en raíces de diferentes edades se muestra en la (Figura 9). Como se puede ver en la figura 9, el gen se expresa de una manera notable en las más jóvenes. A pesar de que el RT-PCR no es cuantitativo, se observa una banda de mayor intensidad de la raíz más joven respecto a las raíces de 7 y 10 días.

6.1.3 Expresión a lo largo de los nodos del escapo floral.

La expresión de *At2g41800* presenta un patrón diferencial a lo largo del escapo floral; en los internodos más basales que corresponden al tejido maduro no se observó expresión, en la parte intermedia del escapo floral se observó un poco y finalmente en el internodo más cercano al meristemo de inflorescencia (internodo 7) la expresión fue muy fuerte (Figura 10). Como en el caso de la raíz, la banda de mayor intensidad se observó en el tejido más joven.

A



B

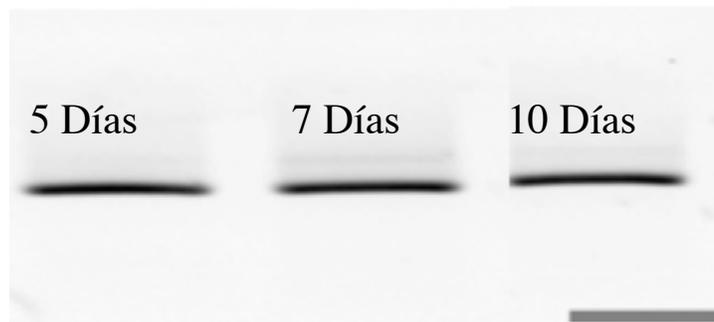


Figura 9. Expresión de *At2g41800* en raíces de 5, 7 y 10 días post-germinación. Las plantas se crecieron en placas verticales con MS. (A) RT-PCR de *At2g41800* (B) RT-PCR de tubulina (control).

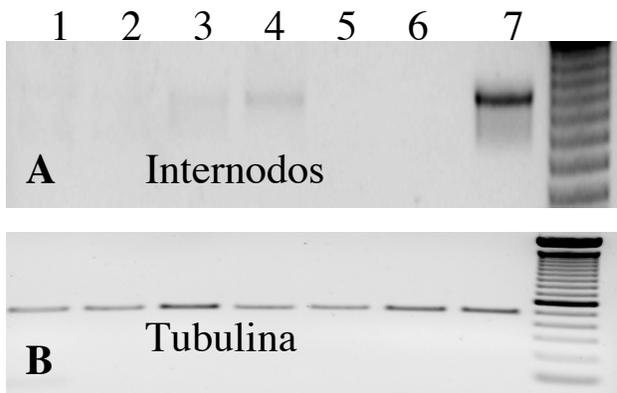


Figura 10. Expresión de *At2g41800* en los internodos del escapo floral de plantas de 40 días. El 1 corresponde al internodo de la región basal, mientras que el resto de los carriles corresponden a los internodos 2-7, siendo el 7 más cercano a la inflorescencia. (A) RT-PCR de *At2g41800* (B) RT-PCR de tubulina (control).

6.2 Expresión de *At2g41800* durante el desarrollo utilizando plantas transgénicas

Los resultados relacionados con la expresión diferencial tanto en raíz como en el escapo floral sugieren una localización específica de la expresión de *At2g41800* en zonas meristemáticas; para determinar la localización de *At2g41800* en regiones específicas de los diferentes tejidos de la planta, se obtuvieron plantas transgénicas que expresan GFP bajo la posible región promotora de *At2g41800*.

La expresión por RT-PCR de la GFP se comprobó en ocho líneas independientes. La Figura 11 muestra una banda de 700 pb que corresponde a GFP. Las líneas 1, 4 y 7 presentaron la banda de mayor intensidad por lo que se escogieron para los análisis de microscopía confocal. Las diferentes líneas se seleccionaron hasta obtener la planta homocigota.

El patrón de expresión espacio-temporal de *At2g41800* en las raíces y flores se muestra en la Figura 4. En raíces, la expresión de *At2g41800* se localizó en diferentes tipos celulares de la zona meristemática de raíces entre los cuatro y los siete días post-germinación (Figura 12 A;B). Por otro lado, también se observó expresión tanto en las células epidérmicas que circundan al primordio de la raíz lateral, así como en la zona meristemática de las raíces laterales de plantas de siete días (Figura 12 C;D).

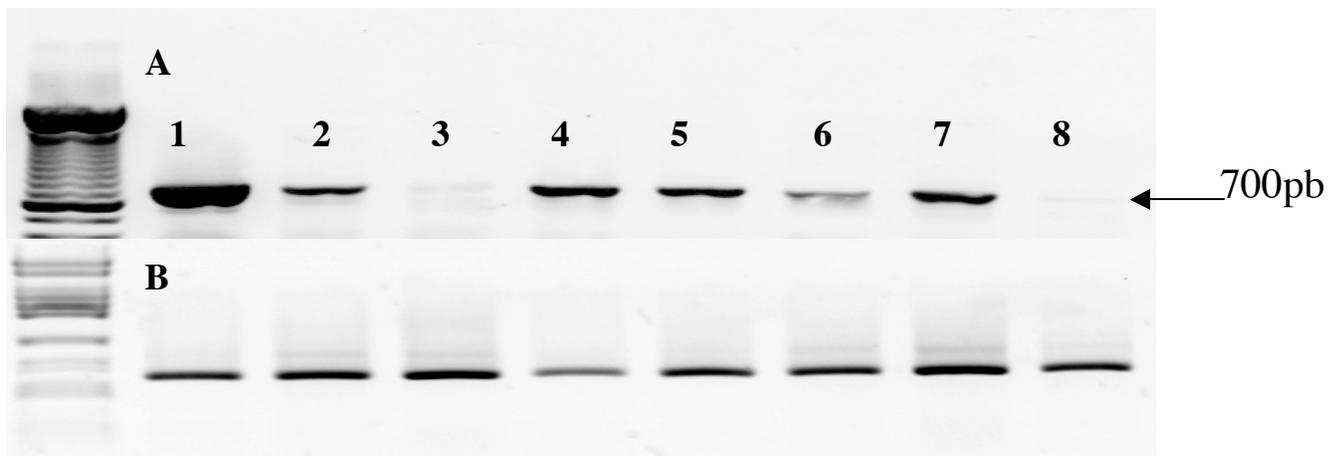


Figura 11. RT-PCR de la expresión de GFP en plantas transgénicas a partir de hojas de roseta. (A) Banda de 700 pares de bases correspondiente al tamaño de la GFP. (B) RT-PCR de Tubulina (Control).

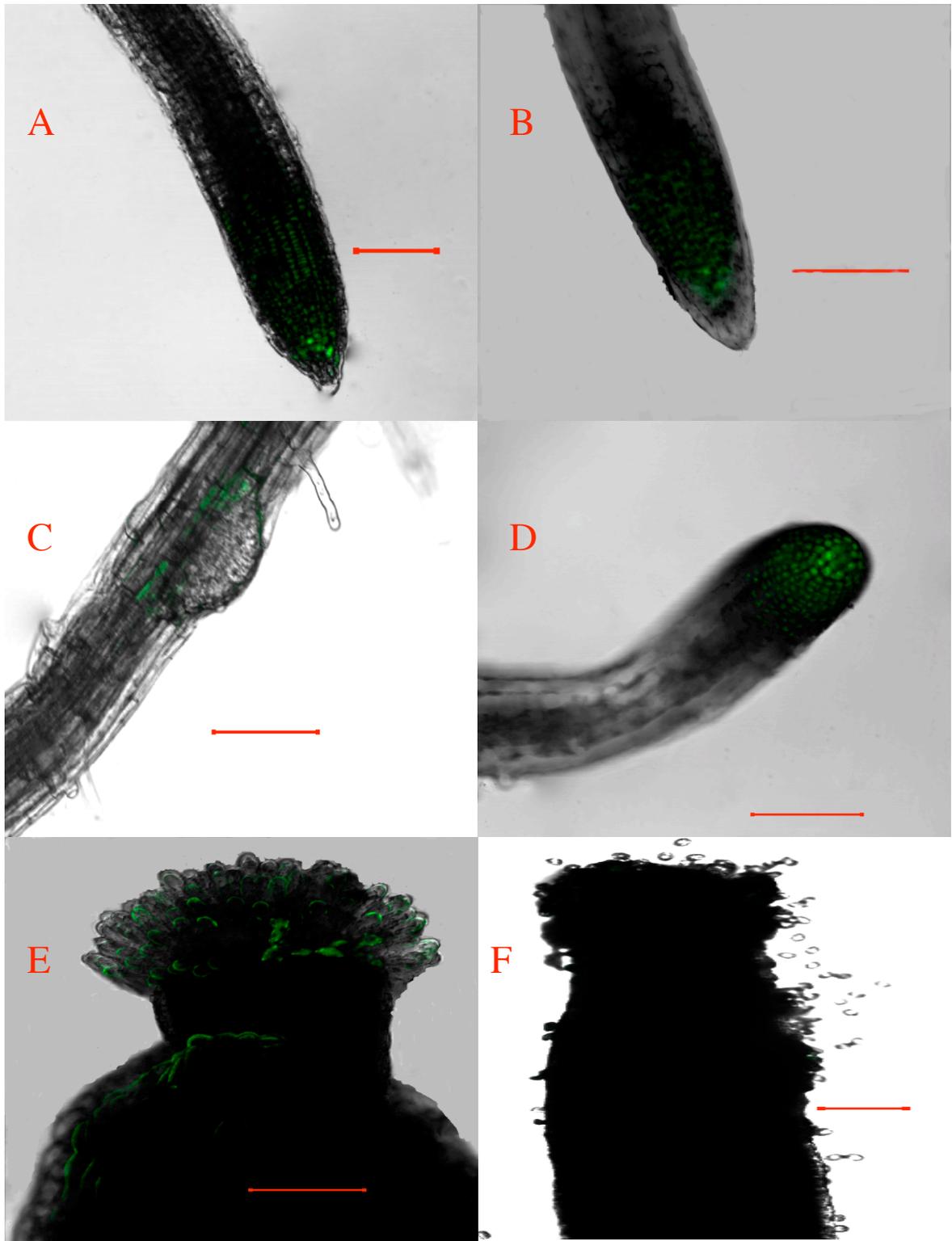


Figura 12. Expresión de *At2g41800* durante desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. (A) Raíz primaria de cuatro días post-germinación. (B) Raíz primaria de 7 días post germinación. (C) Primordio de raíz lateral en una plántula de 7 días post-germinación. (D) Raíz lateral de una plántula de 7 días post-germinación. (E) Flor de estadio 12. (F) Control de flor de estadio 12. La barra color rojo representa el tamaño de 100 micras.

En flores, la expresión se presenta únicamente en el estadio 12 que corresponde a la última etapa de botón, específicamente en las células de la papila estigmática y en el septum donde están fusionados los dos carpelos (Figura 12 E).

De acuerdo a la base de datos GENEVESTIGATOR, el patrón descrito para *At2g41800* es muy similar al que nosotros hemos obtenido incluyendo la expresión específica en las células estigmáticas del carpelo únicamente en flores de estadio 12. En la raíz, este gen se expresa principalmente en las células correspondientes a la zona meristemática (Winter et al, 2007) tal como se muestra en la figura 12 A y B. Estos resultados sugieren que la región utilizada contiene la información suficiente y corresponde a la región promotora de *At2g41800*.

6.2.1 Efecto de Auxinas y Giberelinas sobre la expresión de *At2g41800*

At2g41800 es uno de los genes cuya expresión aumenta considerablemente en raíces expuestas a medios ricos en auxinas y giberelinas. Las plántulas transgénicas de las tres líneas de 7 días post-germinación fueron crecidas en medio MS y se transfirieron a un medio MS con auxinas (IAA) o giberelinas (Ac. Giberélico) a una concentración de 2 μ M de manera independiente (Figura 13). La expresión *At2g41800* se incrementa notablemente y presenta un cambio en el patrón de expresión; la señal se detectó en la zona meristemática y en la zona de diferenciación tanto para las raíces expuestas a auxinas durante 2 días (13B) o 5 min (13C) y para las raíces expuestas a giberelinas durante 2 días (13D). La inducción de una fuerte expresión de este gen desde los 5 minutos de exposición a auxinas indica que es un gen involucrado en la respuesta rápida a auxinas y sugiere su participación en procesos de comunicación celular (Tanaka et al, 2006).

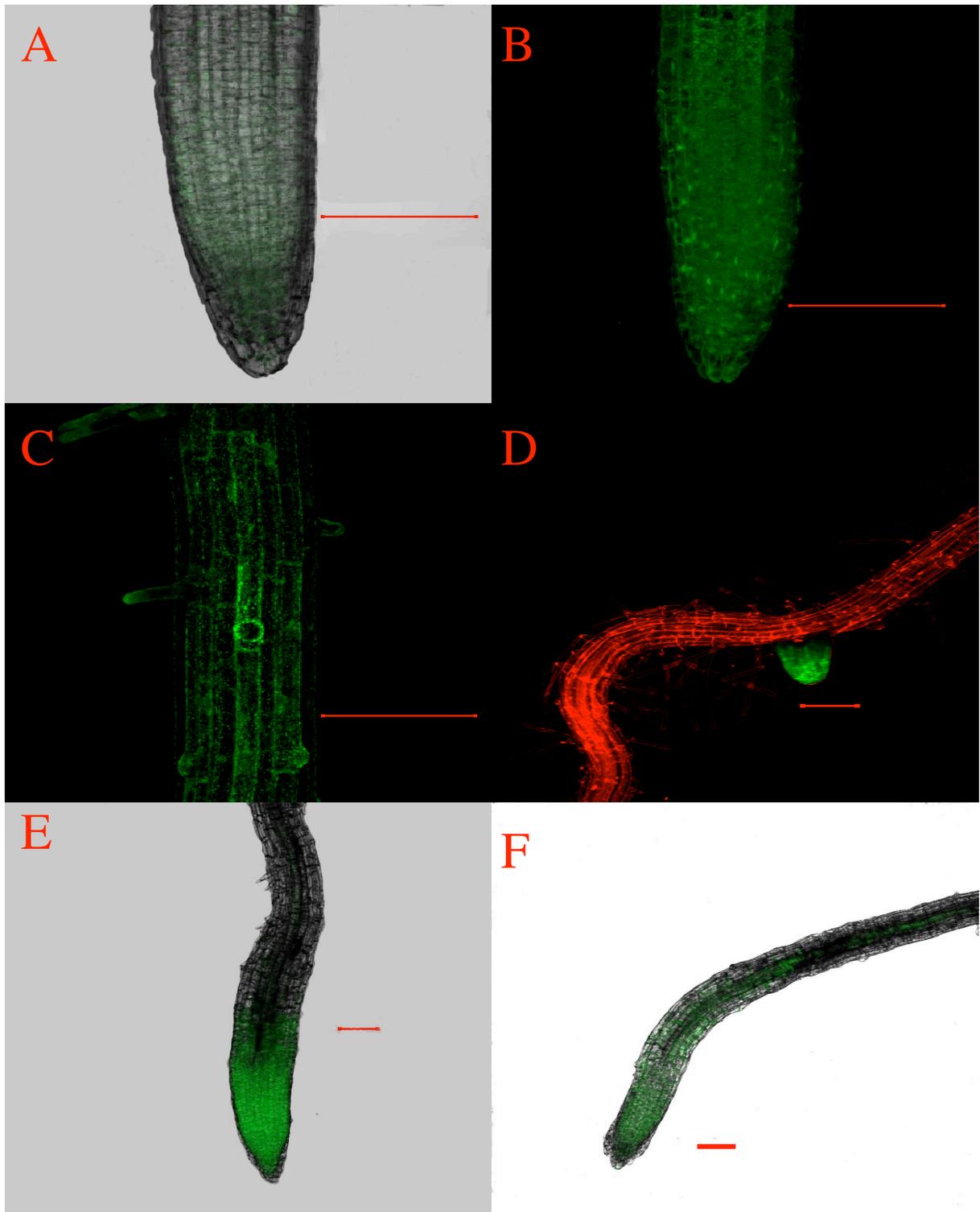


Figura 13. Inducción de *At2g41800* por auxinas y giberelinas. A) Control de plántula de 7 días sin exposición a auxinas. (B y C) Plántulas de 7 días expuestas por 5 minutos a auxinas. (D y E) Plántulas de 7 días expuestas 48 horas a auxinas. (F) Plántula de siete días expuesta 24 horas a giberelinas. La

barra color rojo representa 100 el tamaño de micras. En el Anexo III se muestra el control negativo para la figura en C.

6.2.2 Expresión de *At2g41800* durante la inducción y formación de callo a partir de raíz y cotiledón.

La expresión de este gen durante la inducción y formación de callo de raíz y cotiledón utilizando el medio CIM (callus induction medium) se determinó ya que la participación de las auxinas en el proceso de inducción de callo es muy relevante y la información relacionada con el transcriptoma de callo de raíz de *Arabidopsis thaliana* reveló que *At2g41800* es uno de los genes que presenta una mayor expresión (Figura 14; Che et al., 2006).

Las plántulas crecidas durante 7 días post-germinación de las tres diferentes líneas transgénicas fueron transferidas al medio CIM. A los 4 días se observó una fuerte expresión de *At2g41800* en las células epidérmicas de las zonas de engrosamiento donde el callo está en reciente formación tanto de raíz como de cotiledón (Figura 14A). Las raíces expuestas al medio CIM por periodos de 14, 18 y 22 días que presentan proliferación celular y el callo está prácticamente formado se obtuvo una expresión aún más notable, (Figura 14B,C y D). La inducción de la expresión de *At2g41800* durante la formación del callo también se observó en cotiledones (Figura 15 A y B). Es importante remarcar la expresión de *At2g41800* en cotiledón durante el desarrollo no se había logrado observar.

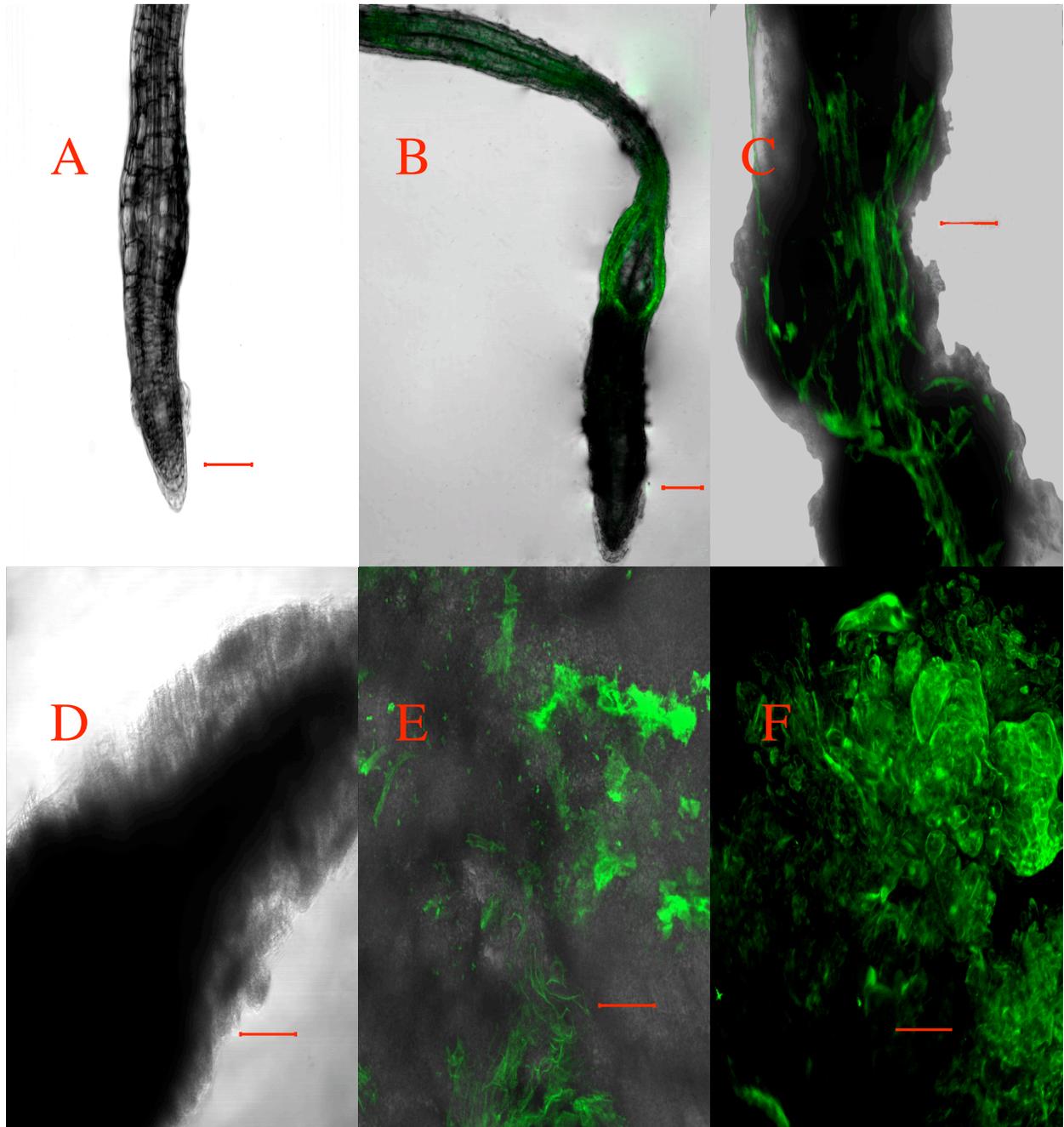


Figura 14. Expresión de *At2g41800* durante la inducción y formación de callo de raíz. (A Y D) Controles silvestres de raíces de 4 y 18 días expuestas al medio CIM. (B) Expresión en raíz expuesta 4 días en el medio CIM. (C) Raíz expuesta 14 días en el medio CIM. (E) Callo de 18 días. (F) Callo de 22 días.

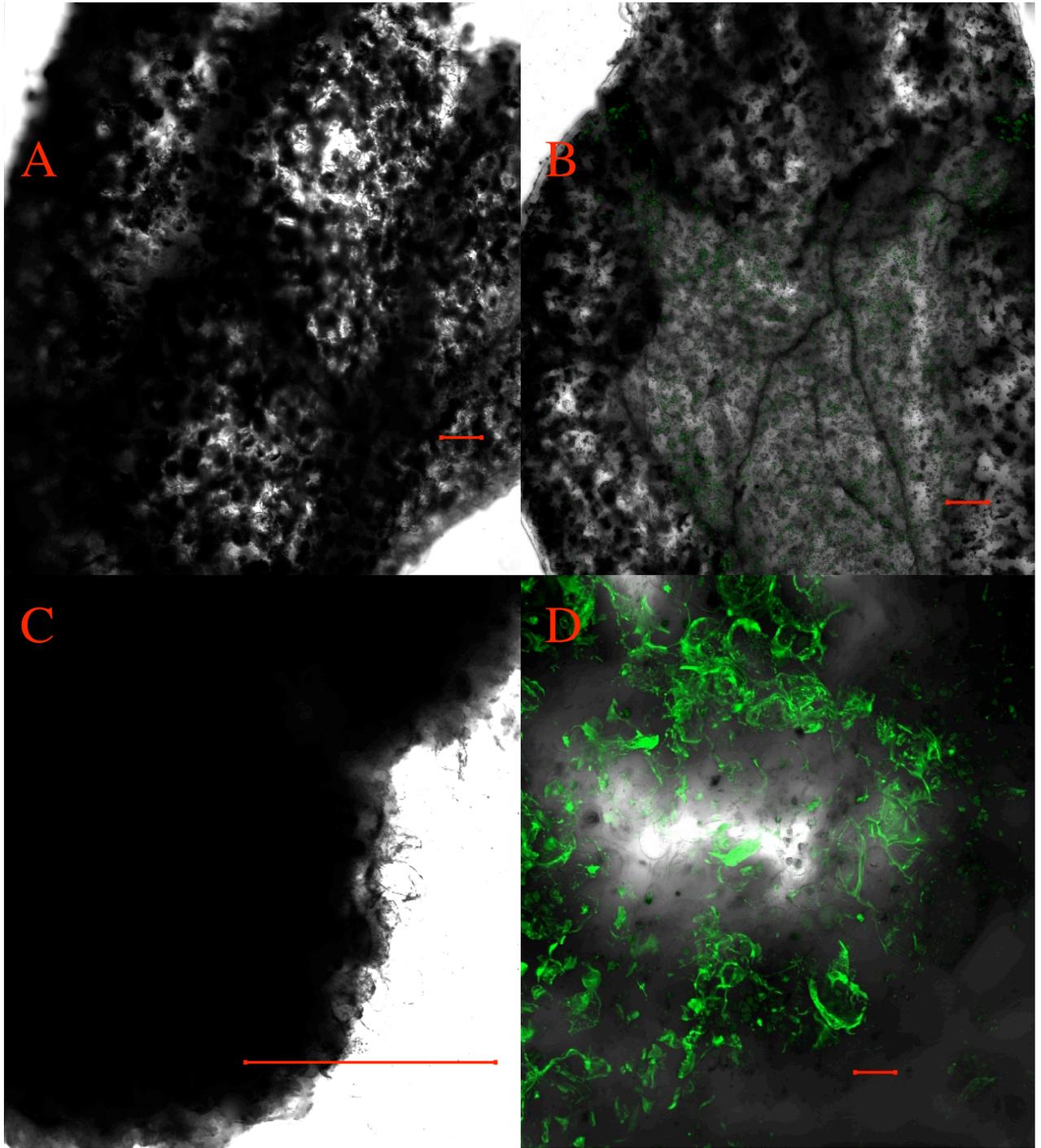


Figura 15. Expresión de *At2g41800* durante la inducción de callo en cotiledón. (A y C) Controles wt de callo. (B y D) Cotiledones expuestos en el medio CIM durante 4 y 14 días, respectivamente. La barra color rojo representa 100 micras.

6.2.3 Expresión de *At2g41800* durante la infección por el Nemátodo *Meloidogyne incognita*

Las auxinas participan también en el proceso de formación de estructuras reservorias de tipo secundario durante la infección por nemátodos (Grunewald et al, 2009). Se ha descrito que *Meloidogyne incognita* promueve la expresión de GUS bajo el promotor DR5 sugiriendo un incremento en la concentración de auxinas. Un incremento en la expresión de *At2g41800* se detectó en las plantas transgénicas de 9 días crecidas en placas con 48 horas de infección por Juveniles en etapa 2 (J2) de *M. incognita* (Figura 16). La expresión de *At2g41800* se incrementó considerablemente (Figura 16, C) y el patrón de expresión se modificó, expresándose incluso en los pelos radiculares (Figura 16, E). Como control del proceso de infección se utilizaron plantas que expresan GFP bajo el promotor DR5 donde la expresión fue incrementada en las mismas condiciones utilizadas para *At2g41800*.

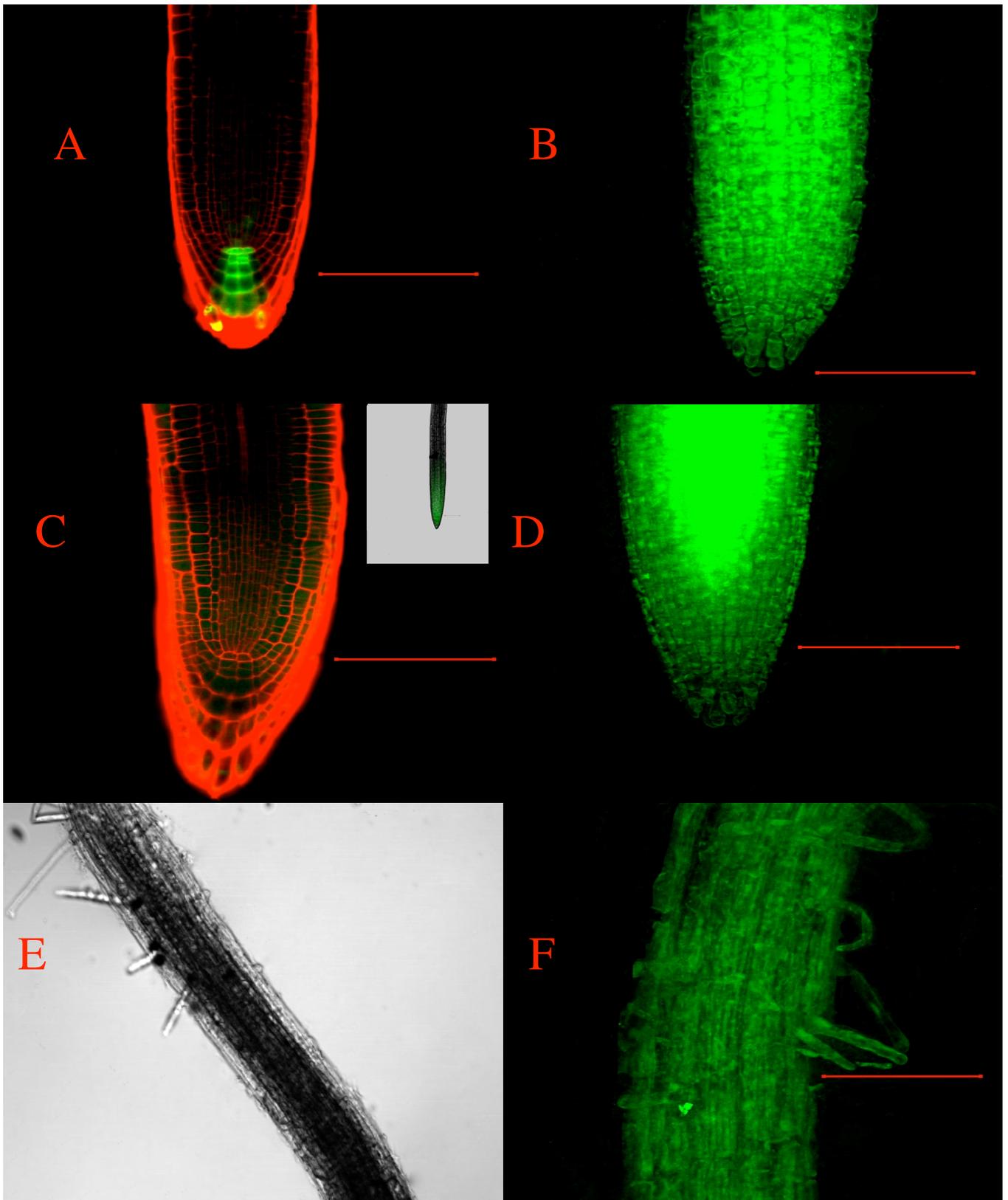


Figura 16. Inducción de *At2g41800* por la infección del Nemátodo *Meloidogyne incognita*. (A) Control, DR5 sin infección. (B) Marcador de auxinas DR5 con infección de *M. Incognita*. (C y E)

Controles de plantas transgénicas sin infección. (D y F) Plantas transgénicas infectadas. La barra color rojo representa 100 micras.

6.3 Localización subcelular de At2g41800

Las proteínas de la familia DUF642 presentan un péptido señal y un dominio DUF642 posiblemente de unión a carbohidratos. En particular At2g41800 ha sido detectada en proteomas de pared celular de células en suspensión. Estudios preliminares en el laboratorio sugieren que podrían traducirse dos tipos de proteínas At2g41800 con y sin péptido señal por lo que consideramos necesario llevar a cabo estudios de localización subcelular en la planta completa.

En este trabajo, solo se realizaron estudios de localización subcelular de At2g41800 en la raíz. La localización subcelular en la raíz varía dependiendo de la zona (Figura 17). En la zona meristemática se localiza intracelularmente (Figura 17A), mientras en la zona de elongación, que presenta un daño, se observa localizada tanto en la pared celular como intracelularmente (Figura 17B). Puesto que en la zona de elongación la proteína se localiza principalmente en las paredes transversales y por lo tanto presenta una localización polar, la señal de GFP intracelular podría estar asociada a la vía secretora. La posible localización de At2g41800-GFP en algún elemento de la vía secretora también puede explicar la presencia de GFP en marcas discretas dentro de las células meristemáticas de la raíz. Contrario a lo que sucede en animales, la vía secretora en plantas ha sido poco estudiada y las interrogantes a resolver son cada vez mayores. Las proteínas de pared celular presentan una secuencia corta llamada péptido señal que indica que la proteína que debe ser secretada a pared celular. Sin embargo, existen algunos casos donde proteínas de pared son retenidas en los compartimentos del aparato de Golgi posiblemente hasta que las células perciben la señal para su secreción (Wolf et al, 2009).

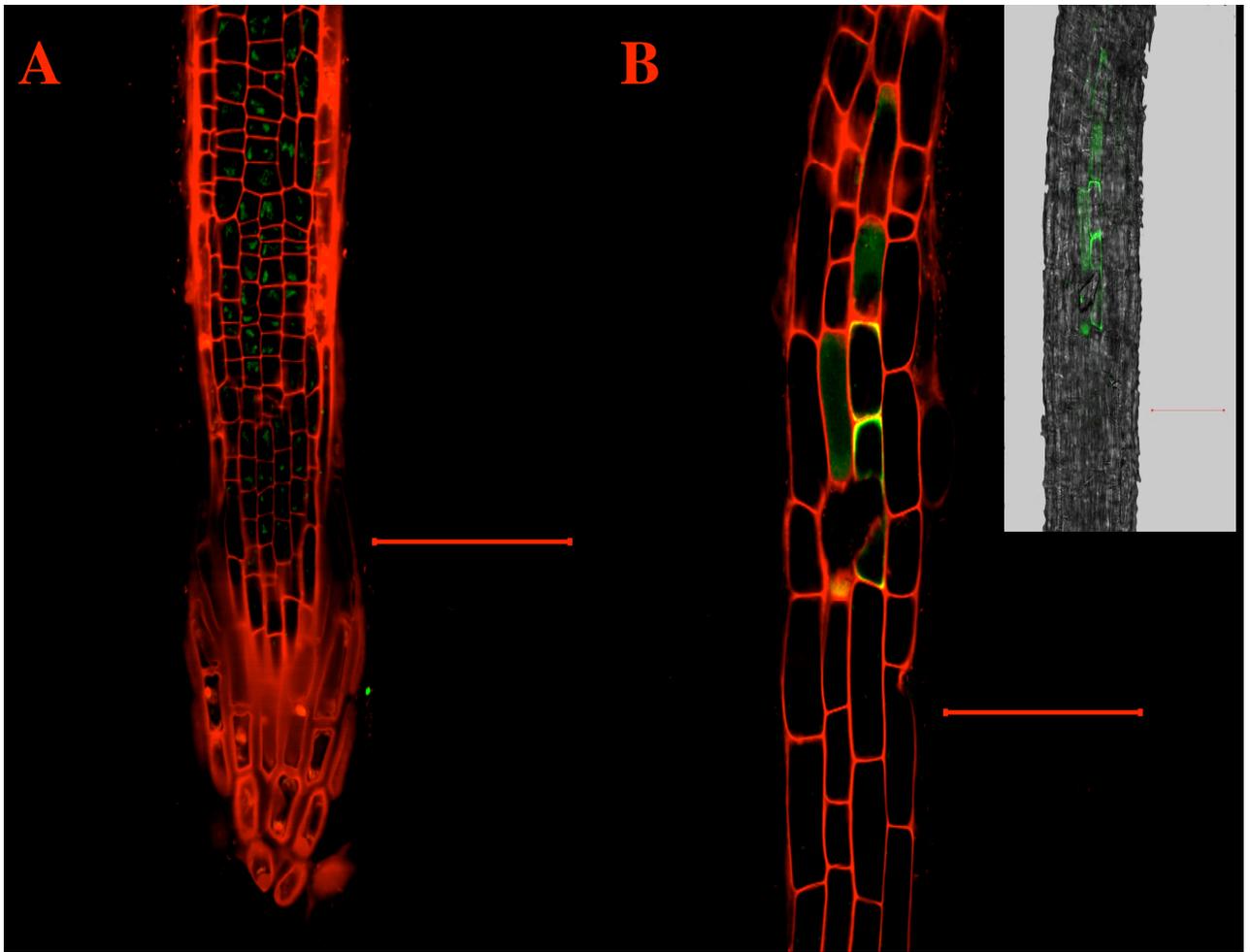


Figura 17 Localización subcelular de *At2g41800* en raíz. (A) Localización subcelular de *At2g41800* en la zona meristemática y de transición de la raíz. (B) Localización subcelular de *At2g41800* en la zona de elongación de la raíz. La barra color rojo representa 100 de micras.

VII. Discusión

La familia de proteínas DUF642 es específica de plantas y presenta una serie de características que sugieren su participación en importantes procesos del desarrollo vegetal y durante la interacción planta-ambiente. Las proteínas que integran esta familia están altamente conservadas en el reino vegetal y presentan un único dominio no catalítico, sin similitud con algún dominio descrito, que posiblemente está involucrado en procesos de interacción proteína-proteína. En particular, la función del gen *At2g41800* puede ser interesante puesto que los estudios filogenéticos indican que sólo está presente en dicotiledóneas y la proteína es muy abundante específicamente en los proteomas de pared celular de células en suspensión.

En el atlas de *A. thaliana* GENEVESTIGATOR (<http://geneinvestigator.ethz.ch/>) se encuentran los patrones de expresión espacio-temporales de la mayoría de los genes. Los resultados de éste trabajo coinciden con el patrón espacio-temporal descrito en este atlas sugiriendo que la región de 890 pb río arriba del ATG tiene la información suficiente y necesaria para la expresión correcta del gen *At2g41800*. La GFP bajo esta región promotora se detectó en la raíz principalmente en la región meristemática y en la región de transición con la región de elongación en células epidérmicas y del cortex de las raíces primarias y las laterales. No se detectó expresión en la zona correspondiente al tejido vascular tal como ha sido descrito en los microarreglos de raíz (Brady et al., 2007). La expresión de *At2g41800* sólo se observó en la papila estigmática de flores en estadio 12; ningún otro órgano floral presentó señal durante el desarrollo floral tal como se ha descrito (Winter et al., 2007).

La expresión de *At2g41800* principalmente en la región meristemática de la raíz fue constante y específica a lo largo del desarrollo de *A. thaliana* en la raíz primaria y en las raíces laterales, lo cual sugiere un papel particular de *At2g41800* en el mantenimiento de la región meristemática. Por otro lado, en el primordio de la raíz lateral, la expresión de *At2g41800* se detectó en células epidérmicas en la región de la maduración y que rodean a la formación del primordio. Análisis transcriptómicos han sugerido una regulación de la expresión de *At2g41800* por diferentes hormonas (Goda et al, 2004). Un cambio en el patrón y en la

intensidad de la expresión de GFP en las raíces de las plantas transgénicas fue inducido por su exposición a ácido giberélico (GA) y ácido indol acético (IAA). El efecto de IAA fue detectado desde un tiempo corto de exposición (Figura 13) indicando que *At2g41800* es un gen de respuesta temprana a auxinas por lo que su función podría estar relacionada con los procesos de comunicación o señalización celular (Taiz y Zeiger, 2008).

Tal como sucede en la raíz, las auxinas participan en los procesos de desarrollo de los órganos florales; específicamente, en la papila estigmática se ha descrito que la concentración de auxinas se incrementa en las células de la papila de flores de estadio 12 que están completamente turgentes y listas para recibir el polen (Aloni et al, 2006). Las auxinas y giberelinas también regulan la expresión de genes relacionados con la remodelación de la pared celular que participan en el desarrollo en estadios específicos de la flor por lo que la expresión específica de *At2g41800* en la papila estigmática puede ser determinada por la alta concentración de auxina en este tejido (Goda et al., 2004; Sánchez-Rodríguez et al, 2010). La papila estigmática y las células localizadas en los tejidos meristemáticos comparten una serie de características; son células con pared celular primaria, se comunican por medio de plasmodesmas primarios con las células aledañas y están en constante expansión, por consiguiente su pared celular sufre múltiples y constantes modificaciones (Edlund et al, 2004). Por otro lado, tanto la papila estigmática como las células meristemáticas presentan una alta demanda energética (Roeder y Yanofsky, 2006).

La proteína codificada por *At2g41800* sólo ha sido reportada en proteomas de células en suspensión (Chivasa et al, 2002; Borderies et al, 2002; Slabas et al, 2004 y Bayer et al, 2006). La fuerte expresión de *At2g41800* en el callo y durante el proceso de inducción del mismo a partir de raíces y cotiledones de las plantas transgénicas explican este hecho. Durante la inducción del callo de raíces de plantas transgénicas se observó un incremento importante en la expresión de *At2g41800* en las células epidérmicas que rodean a la estructura formada por las células en división tal como se observó en el primordio de la raíz lateral. Sugimoto et al, 2010 han descrito que la formación del callo es un proceso de diferenciación a partir del tipo celular que se encuentra en el haz vascular de todos los tejidos denominado “*pericycle like cells*” en referencia a las similitudes con las células del periciclo de la raíz. En general, los

genes involucrados en este proceso están también presentes en la formación de raíces laterales (Sugimoto et al, 2010). El desarrollo de estas dos estructuras, que surgen a partir de las divisiones de células del periciclo, es dependiente de altas concentraciones de auxina. Estas estructuras presentan constantes y complejas modificaciones en su pared celular y una alta demanda de nutrientes, características que comparten con las células de la papila estigmática.

La participación de las auxinas en la formación de tejidos vertedero inducida por patógenos ha sido ampliamente descrita (Grunewald et al, 2009). Una fuerte inducción de la expresión de *At2g41800* a los dos días de la infección por *M. incognita* se detectó en la zona meristemática de las raíces primarias de las plantas transgénicas. La eficiencia del sistema de infección utilizado se corroboró utilizando plantas transgénicas DR5::GFP que demostró un incremento en la concentración de auxina tal como ha sido descrito (Grunewald et al, 2008). La inducción de la expresión de *At2g41800* por la interacción con el nemátodo sugiere que la infección por *M. incognita* podría manipular el plan de desarrollo involucrado en la formación de raíces laterales tal como ha sido descrito para la formación del callo ya que la infección por este nemátodo da lugar a la formación de una estructura denominada agalla que es resultado de un proceso de reprogramación de células del haz vascular (Grunewald et al, 2009). Puesto que las agallas constituyen el sitio de alimentación del nemátodo, la importante inducción de la expresión de *At2g41800* en la fase inicial de la infección del nemátodo indica que este gen está involucrado en el plan de desarrollo de estructuras donde las células presentan un fuerte gasto de energía y por consiguiente una fuerte demanda de nutrientes.

La proteína *At2g41800* se ha detectado en proteomas de pared celular y presenta un péptido señal que la dirige al retículo endoplásmico. En las células meristemáticas de la raíz, la proteína quimérica 41800-GFP se detectó en cúmulos irregulares y heterogéneos dentro de las células epidérmicas que podrían corresponder a los compartimentos del aparato de Golgi. En este caso, la proteína presente en este tipo celular si podría tener el péptido señal. Recientemente se ha demostrado que algunas proteínas de pared celular se retienen en los diferentes compartimentos involucrados en la vía secretora sugiriendo que este proceso es un punto importante de regulación de la función de la proteína a secretar (Rose y Lee, 2010). En las células de la región de elongación, la marca se detectó claramente en la pared celular pero

se detectó difusa en el interior de la célula. En estas células, la señal en la pared celular se detecta principalmente en la pared transversal de manera discontinua. Aunque es necesario llevar a cabo estudios de microscopía electrónica, estos resultados sugieren una posible localización de *At2g41800* en los plasmodesmos que se ha descrito están altamente concentrados en las paredes transversales de las células epidérmicas (Burch-Smith et al, 2011). La detección de la proteína en el interior de algunas células de esta región sugiere que la proteína se encuentra en tránsito en los elementos del sistema secretor hacia la pared celular pero no es posible descartar que la proteína carezca de péptido señal como resultado del transcrito que contiene el primer intrón relacionado con el mecanismo del reconocimiento de un primer exón alternativo (Chen et al., 2007).

La localización subcelular diferencial de *At2g41800* según la región de la raíz sugiere que esta proteína puede estar involucrada en los procesos de comunicación entre células, La importante expresión de *At2g41800* en las células de callo y la localización de *At2g41800* principalmente en la pared celular transversal de las células de la epidermis que han sido dañadas sugiere la participación de esta proteína en eventos relacionados con la regeneración. El estudio de la localización subcelular de *At2g41800*, utilizando microscopía confocal y electrónica, en las papilas estigmáticas y durante la inducción de callo y la infección por nemátodos, procesos que también involucran una separación de las células epidérmicas, permitirá determinar si la función de esta proteína esta relacionada con eventos de remodelación de la pared y/o comunicación celular.

VIII. CONCLUSIONES

- La región de 890 pb utilizada contiene la información suficiente para presentar el patrón espacio temporal descrito para *At2g41800* por lo que corresponde a la posible región promotora.
- El gen *At2g41800* se expresa principalmente en las regiones meristemáticas de las raíces primarias y laterales a lo largo del desarrollo y en la papila estigmática de flores en estado 12.
- Las hormonas IAA y GA inducen y alteran el patrón de la expresión del gen *At2g41800* a lo largo del desarrollo de la raíz.
- La inducción de la alta expresión de *At2g41800* durante la formación de callo explica la detección de la proteína *At2g41800* en los proteomas de pared celular de células en suspensión.
- El nemátodo formador de agallas *Meloidogyne incognita* induce fuertemente la expresión de *At2g41800*.
- La localización subcelular de *At2g41800* se presenta de manera diferencial dependiendo del tipo celular de la raíz; en la zona meristemática y de transición se observa intracelularmente, mientras que en la zona de elongación se localiza en la pared celular y/o en la membrana plasmática e intracelularmente.

IX. Bibliografía

1. Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich C (2006) Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* 223: 315–328.
2. Alvarez S, Goodger JO, March EL, Chen S, Asirvatham VS, Schachtman DP (2006) Characterization of the maize xylem sap proteome. *J. Proteome Res.* 5: 963-972.
3. Balasubramanian M, Rangaswami G (1962) Presence of indole compounds in nematode galls. *Nature* 194: 774–775.
4. Barcalá M, García A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, García-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C (2010) Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant J.* 1: 698-712.
5. Bassham D, Brandizzi F, Otegui M and Sanderfoot A (2008). The Secretory System of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* doi: 10.1199/tab.0116
6. Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule A (2006) *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* 6: 301-311.
7. Bhalerao RP, Eklö FJ, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G. (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29: 325–332.
8. Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591–602.
9. Bhushan D, Pandey A, Chattopadhyay A, Choudhary MK, Chakraborty S, Datta A, Chakraborty N (2006) Extracellular matrix proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) illustrates pathway abundance, novel protein functions and evolutionary perspect. *J. Proteome Res.* 5: 1711-1720.
10. Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M. Inzé D (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405–1419.
11. Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Jauneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A, Pont-Lexica R (2003) Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421-3432.

12. Borner GH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol* 132: 568-577.
13. Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT, Pont-Lezica R (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.
14. Brady SM, Orlando DA, Lee JY, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*. 318: 801-806.
15. Burch-Smith TM, Stonebloom S, Xu M, Zambryski P (2011) Plasmodesmata during development: re-examination of the importance of primary, secondary, and branched plasmodesmata structure versus function. *Protoplasma* 248: 61-74.
16. Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, de Almeida Engler J, Abad P, Rosso MN, Favery B (2008) Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J Plant Physiol*. 165: 104-113.
17. Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.
18. Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci*. 8: 165-171.
19. Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol.* 49: 281-309.
20. Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R, Canut H (2005) Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochem*. 66: 453-461
21. Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol*. 141: 620-637.
22. Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa AK, Citovsky V (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 19: 913-920.
23. Chen WH, Lu G, Lu C, Zeng C, Hu S (2007) Systematic analysis of alternative first exons in plant genomes. *BMC Plant Biol*. 7: 5.

24. Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu XL, Knox JP, Bolwell P, Slabas AR (2002) Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Proteomics* 23: 1754-1765.
25. de Almeida Engler J, Favery B, Engler G, Abad P (2005) Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 112–117.
26. De Smet I, Tetsumura T, De Rybell B, Frei dit Frey N, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett MJ, Beeckman T (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134: 681-690.
27. Depuydt S, Trenkamp S, Fernie AR, Elftieh S, Renou JP, Vuyylsteke M, Holsters M, Vereecke D (2009) An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians*. *Plant Physiol.* 149: 1366-1386.
28. Derbyshire P, McCann MC, Roberts K (2007) Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol.* 7: 31.
29. Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
30. Dorokhov YL, Mäkinen K, Frolova OY (1999) A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* 461: 223-228.
31. Dubrovsky JG, Doerner PW, Colon-Carmona A, Rost TL (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1648-1657.
32. Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *PNAS USA* 105: 8790-8794.
33. Edlund AF, Swanson R, Preuss D (2004) Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: 84–97.
34. Fahn A (1990) *Plant anatomy*, 4th edn. Pergamon Press, Oxford.
35. Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica RF, Canut H, Jamet E (2006) Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Meth.* 2: 10-16.
36. Foresti O, Denecke J (2008). Intermediate organelles of the plant secretory pathway:

- identity and function. *Traffic* 9: 1599–1612.
37. Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 256: 111-137.
 38. Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1555–1573.
 39. González-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA (2007) Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 58: 3719–3730.
 40. Grunewald W, van Noorden G, Van Isterdael G, Beeckman T, Gheysen G, Mathesius U (2009) Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *Plant Cell* 21: 2553–2562.
 41. Grunewald W, Karimi M, Wiczorek K, Van de Cappelle E, Wischnitzki E, Grundler F, Inzé D, Beeckman T, Gheysen G (2008). A role for *AtWRKY23* in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. *Plant Physiol.* 148: 358-368.
 42. Hewezi T, Howe P, Maier TR, Hussey RS, Mitchum MG, Davis EL, Baum TJ (2008) Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with *Arabidopsis* pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism. *Plant Cell* 20: 3080-3093.
 43. Hu J, Barlet X, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by soilborne phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoSone* 3:e2589.
 44. Hutangura P, Mathesius U, Jones MGK, Rolfe BG (1999) Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 221–231.
 45. Huo X, Schnabel E, Hughes K, Frugoli J (2006) RNAi phenotypes and the localization of a protein:GUS fusion imply a role for *Medicago truncatula* PIN genes in nodulation. *J. Plant Growth Regul.* 25: 156–165.
 46. Iyer-Pascuzzi A, Simpson J, Herrera-Estrella L, Benfey PN (2009) Functional genomics of root growth and development in *Arabidopsis*. *Curr. Op. Plant Biol.* 12:165–171.
 47. Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R, Jamet E (2008) A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* 8: 1.

48. Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11: 33-39.
49. Jamet E, Albenne C, Boudart G, Irshad M, Canut H, Pont-Lezica R (2008) Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics*, 8, 893-898.
50. Karczmarek A, Overmars H, Helder J, Goverse A (2004) Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Mol. Plant Pathol.* 5: 343-346.
51. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132: 818-831.
52. Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R (2006) Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol.* 47: 788-792.
53. Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Hove CA, Hogeweg P, Marée AF, Scheres B (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol* 6: e307.
54. Lee CW, Efetova M, Engelmann JC, Kramell R, Wasternack C, Ludwig-Muller J, Hedrich R, Deeken R (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 2948-2962.
55. Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
56. Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
57. Mathesius U, Schlaman HR, Spaink HP, Of Sautter C, Rolfe BG, Djordjevic MA (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14: 23-34.
58. Minic Z, Jamet E, Négroni L, der Garabedian A, Zvyv M, Jouanin L (2007) A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. *J. Exp. Bot.* 38: 2503-2512.
59. Natera SHA, Ford KL, Cassin AM, Patterson JH, Newbiggin EJ, Bacic A (2008) Analysis of the *Oryza sativa* plasma membrane proteome using combined protein and peptide fractionation approaches in conjunction with mass spectrometry. *J. Prot. Res.* 7:1159-1187.

60. Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, Simon WJ, Slabas AR (2003) Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitor. *Proteomics* 3: 1047-1059.
61. Neuteboom LW, Veth-Tello LM, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. (1999) A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res.* 6: 13–19.
62. Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM (2009) ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 216–233.
63. Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Höfte H, Laufs P, Pelloux J, Mouille G (2008) *Arabidopsis* phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr. Biol.* 18: 1943-1948.
64. Péret B, de Rybel B, Casimiro I, Bénéková I, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14: 399–408.
65. Popper ZA, Tuohy MG (2010) Beyond the green: Understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. *Plant Physiol.* 153: 373-383.
66. Rapoport TA. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450: 663–669.
67. Robertson D, Mitchell GP, Gilroy JS, Gerrish C, Bolwell GP, Slabas AR (1997) Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J. Biol. Chem.* 272: 15841-15848.
68. Roeder A, Yanofsky M (2006) Fruit Development in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book doi: 10.1199/tab.0075.
69. Rose JK, Lee SJ (2010) Straying off the highway: Trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. *Plant Physiol.* 153: 433–436.
70. Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463–472.
71. Salisbury F, y Ross C (1992). *Fisiología Vegetal*. Ed. Granica (México).
72. Sánchez-Rodríguez C, Rubio-Somoza I, Sibout R, Persson S. (2010). Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci.* May;15(5):291-301.

73. Scheres B, Benfey P, Dolan L (2002) Root Development. The Arabidopsis Book doi: 10.1199/tab.0101.
74. Slabas AR, Ndimba B, Simon WJ, Chivasa S (2004) Proteomic analysis of the *Arabidopsis* cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. *Biochem Soc Trans.* 32: 524-528.
75. Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Cell* 18: 463–471.
76. Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennett MJ (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 10: 946–954.
77. Szymanowska-Pu_ka J, Nakielski J (2010) The tensor-based model for growth and cell divisions of the root apex. II. Lateral root formation. *Planta* 232: 1207-1218.
78. Taiz L, Zeiger E (2008) *Plant Physiology*, Tercera Edición Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland Massachusetts. 311-328 p.
79. Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2738–2754.
80. Thimann KV (1936) On the physiology of the formation of nodules on legumes roots. *PNAS USA* 22: 511–514.
81. Trudgill DL, Blok VC. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 39: 53–77.
82. Tung CW, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB (2005) Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 138: 977–989.
83. Van den Berg C, Willemsen V, Hendriks C, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287-289.
84. Vanholme B, De Meutter J, Tytgat T, Van Montagu M, Coomans A, Gheysen G. (2004) Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332: 13–27.

85. van Noorden GE, Kerim T, Goffard N, Wiblin R, Pellerone FI, Rolfe BG, Mathesius U (2007) Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 144: 1115–113
86. Vázquez-Lobo A, Roujol D, Zúñiga-Sánchez E, Piñero D, Gamboa-deBuen A., Jamet E (2011) Phylogeny of the DUF642 multigene family: a highly conserved and specific spermatophyte family of cell wall proteins. *Sometido al Journal of Molecular Evolution*
87. Watson BS, Lei Z, Dixon RA, Summer LW (2004) Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochem.* 65: 1709-1720.
88. Wellmer F, Riechmann JL, Alves-Ferreira M, Meyerowitz EM (2004) Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* 16: 1314-1326.
89. Wiethölter N, Graessner B, Mierau M, Mort AJ, Moerschbacher BM (2003) Differences in the methyl ester distribution of homogalacturonans from near-isogenic wheat lines resistant and susceptible to the wheat stem rust fungus. *Mol Plant Microbe Interact.*16: 945-52.
90. Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2: e718.
91. Wolf S, Rausch T, Greiner S (2009) The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. *Plant J.* 58:361-375.
92. Zarsky V, Cvrckova F, Potocky M, Hala M (2009). Exocytosis and cell polarity in plants-exocyst and recycling domains. *New Phytol.* 183: 255–272.
93. Zúñiga Sánchez E (2007) Análisis de expresión de una familia de proteínas de función desconocida, DUF642, en *Arabidopsis thaliana* y su posible papel en las vías de transducción de señales durante el desarrollo”. Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

X. ANEXO

ANEXO I

Protocolo de transformación en *E. coli*

- Hielo
- Tubos con medio LB (6 mL)
- Placas con medio LB + antibiótico
- Baño seco a 42°C
- Agitador a 37°C a 200-250 rpm

> Sacar las células competentes (Top 10) de -70°C y ponerlas en hielo en presencia del mechero:

- Añadir 50µL de células competentes a cada tubo con 5µL de ligación. Mezclar suavemente por pipeteo.
- Incubar en hielo durante 20 minutos.
- Incubar las células a 42°C de 40 a 50 segundos y regresar al hielo inmediatamente.
- Añadir 950µL de medio LB líquido a cada tubo.
- Incubar 1 hora 30 minutos a 37°C en agitación.
- Preparar placas de medio LB con antibiótico, 20µL de X-GAL 50 mg/mL y 100µL de IPTG (0.1M) distribuyendo estos dos últimos con asa de vidrio.
- Centrifugar 10 min, a 6000 rpm.
- Retirar 800µL de sobrenadante. Resuspender el precipitado en los 100µL restantes y plaquear 50µL por caja de petri con un asa de vidrio.
- Incubar toda la noche a 37°C y después poner en el refrigerador.

Extracción de DNA genómico

- 20mL de Tris-Hcl 1M, pH 7.5
 - 5mL de NaCl 5M
 - 5mL de EDTA 0.5 M, pH 8
 - 5mL de SDS al 10%
 - 65mL de ddH₂O
-
- Cortar de 5 a 4 hojas de roseta de una planta y congelarla inmediatamente en nitrógeno líquido.
 - Triturar el tejido con palitos hasta obtener un polvo muy fino, sin descongelar

- en ningún momento el tejido.
- Agregar de 500 a 700µL de buffer de extracción de DNA, agitar manualmente y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar de 500 a 700µL de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico invirtiendo el tubo
- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M
- Agregar 350µL de isopropanol, mezclar por inversión y dejar 5 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad.
- Lavar el precipitado con 150µL de etanol al 70%.
- Centrifugar 5 minutos y quitar el etanol
- Disolver el precipitado en 20µL de agua estéril.

Extracción de RNA total con TRIZOL(GIBCO BRL)

- Moler al menos 100mg de tejido en N₂ líquido, homogenizar con 1mL de TRIZOL y mezclar
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 200µL de cloroformo y mezclar por inversión 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar la muestra a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Tomar la fase acuosa.
- Precipitar con 0.5 mL de isopropanol por ml deTRIZOL.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Decantar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1ml de EtOH al 75% por ml de TRIZOL por pipeteo.
- Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm a 4°C.
- Decantar el EtOH y dar un spin para eliminar la mayor cantidad posible de etanol sin tocar el precipitado.
- Resuspender en 25µL de ddH₂O.

Protocolo para la síntesis de CDNA (INVITROGEN)

- En un tubo eppendorf previamente esterilizado agregar:
 - 1µL de oligo dT
 - 1ng a 5µg de RNA
 - 1µL de dNTP's
- Aforar con agua estéril a 12µL
- Calentar la mezcla a 65°C durante 5 minutos y meter al hielo inmediatamente después de la incubación.
- Agregar 4µL de buffer "First strand",
2µL de 0.1M de DTT y

- 0.7 μ L de RNAase.
- Mezclar todo suavemente e incubar durante 2 minutos a 42°C
 - Agregar 1 μ L de retrotranscriptasa y mezclar mediante pipeteo
 - Incubar a 42°C durante 50 minutos
 - Inactivar la reacción calentándola a 70°C durante 15 minutos.

Lavado de semillas de *Arabidopsis thaliana*

- Colocar las semillas en un tubo eppendorf y agregar 1ml de agua estéril. Dejar embebiendo 10 minutos.
- Dar un spin y eliminar el agua
- Agregar 1ml de EtOH y agitar constantemente por 15 segundos.
- Dar spin y eliminar EtOH
- Agregar 1ml de la solución de lavado (10% cloro y 1% SDS) y agitar constantemente por 10 minutos.
- Dar spin y eliminar solución.
- Lavar 5 veces con agua estéril desionizada o hasta que no haya residuos de la solución de lavado.

Transformación por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens*

- Descongelar las células del hielo. Pre-enfriar la celda de electroporación.
- Mezclar 40 μ l del plásmido de interés y 50 μ l de células competentes.
- Depositar la mezcla en la celda de electroporación.
- Aplicar un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω \rightarrow /cm con κ = 4.7 ms.
- Agregar 1ml de medio LB inmediatamente después del pulso e incubar a 30°C por una hora.
- Plaquear la mezcla en cajas de LB con el antibiótico respectivo, incubar por 2 días a 30°C.

Transformación de *Arabidopsis thaliana* por *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el método “Floral Dip”.

- Inocular 5 ml de LB conteniendo 50 μ g/ml del antibiótico utilizado. En caso de Kanamicina, la concentración debe de ser 25 μ g/ml. Incubar por 1 o 2 días en agitación a 30°C.
- Pasar los 5 ml a 250 ml de LB (50 ó 25 μ g/ml de antibiótico), incubar toda la noche a 30°C en agitación.
- Verter en frascos para centrífuga de 250 ml, los frascos deben estar frios y en todo el procedimiento mantener las células en hielo.

- Centrifugar 15 minutos a 7500 RPM, a 4°C.
- Preparar medio de infiltración como se indica, la cantidad a utilizar es opcional.
- Disolver la pastilla de células en una pequeña cantidad del medio de infiltración, una vez disuelta ajustar al volumen final deseado. Utilizar una charolita pequeña que permita introducir los botones florales de la planta.
- Se prepara una charola para plantas con sanitas mojadas para ambientar una cámara húmeda.
- Las plantas se sumergen en el medio de infiltración por 15-20 segundos y se colocan sobre las sanitas húmedas en posición horizontal
- La charola se cubre con plástico lo más oscuro posible, se sella bien y se cubren con papel aluminio para mantener las lanttas en ambiente húmedo y oscuro. Mantener este tratamiento hasta el día siguiente.

Al día siguiente, sacar las plantas y colocarlas en posición vertical en la cámara de crecimiento.

Inducción de callo a partir de raíces de Arabidopsis thaliana

Sales de Gamborg (B5) 100% para 1 litro:

- Vitaminas R2
 - 500µg de 2,4-D
 - 50µg de kinetina
 - 20g de sacarosa
 - Medio MS pH 5.7
 - 3.3g de gellan
- Preparar cajas de petri.
 - Se utilizan raíces de una edad de 10 días posterior a la germinación.
 - Las raíces y cotiledones se colocan en el medio de inducción, manteniendo condiciones de esterilidad adecuadas.

ANEXO II

Tabla I. Oligos diseñados para la amplificación de la región codificante del gen At2g41800

Oligonucleótido sentido (F41800se1)	Oligonucleótido antisentido (R41800se1)	Tamaño del producto (pb)
5´ATGTCTCTCTATCACTCTCTT´3	3´TTAACGGGCCAGGGTAACA´5	1,113

Tabla II. Oligos diseñados para la amplificación de la región promotora de At2g41800

Oligonucleótido sentido (PROM800F)	Oligonucleótido antisentido (PROM800R)	Tamaño del producto (pb)
5´AAGCTTCGTAGATTGCGGAGAAAAGAACC´3	3´GGATCCTTTAAAGTCTTATTAATTAGTTCGCC´5	890

Tabla III. Oligos diseñados para la amplificación del gen completo At2g41800

Oligonucleótido sentido (PROM800F)	Oligonucleótido antisentido (SP41800LSR)	Tamaño del producto (pb)
5´AAGCTTCGTAGATTGCGGAGAAAAGAACC´3	3´CGCAACAACAATGGGACCGGCAATTCCTAGG´5	2,222

Tabla IV. Oligos diseñados para la amplificación de la proteína verde fluorescente (GFP)

Oligonucleótido sentido (GFPF)	Oligonucleótido antisentido (GFPR)	Tamaño del producto (pb)
5´GGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTGGAG´3	3´GAGCTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC´5	714

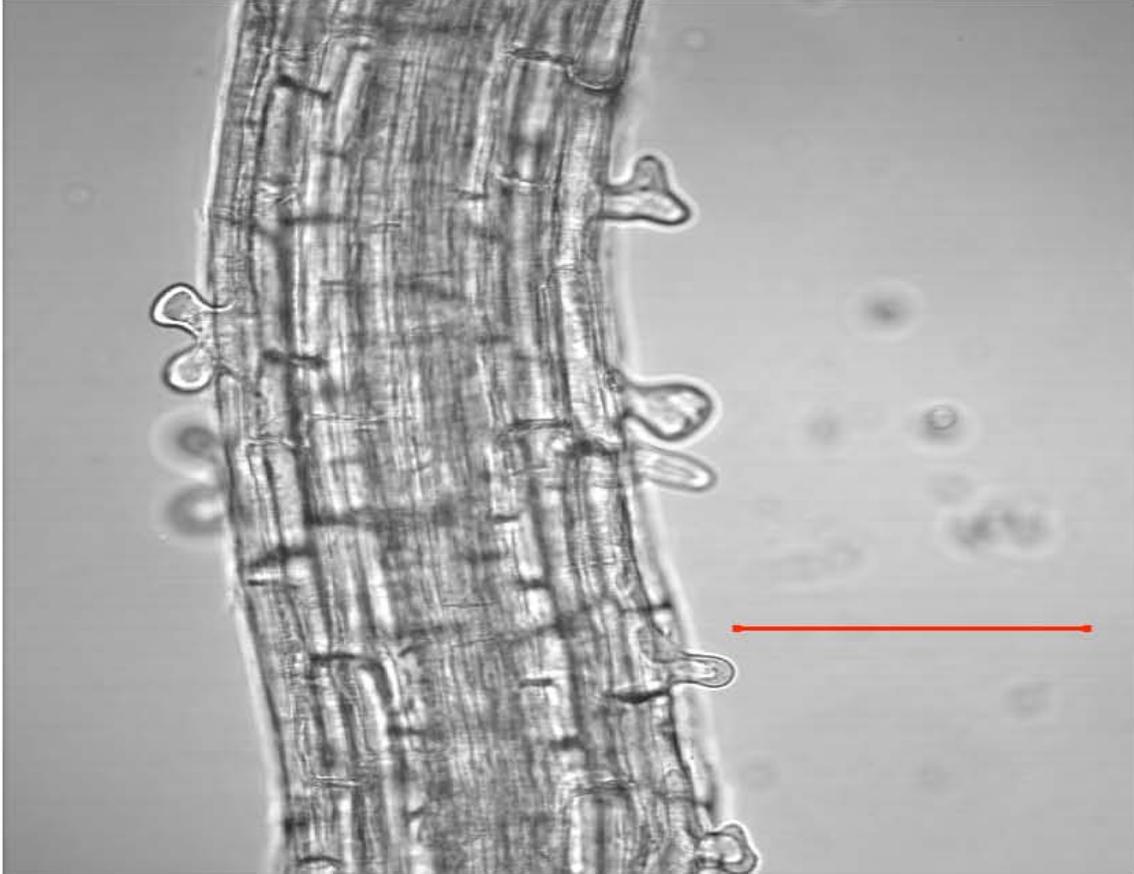
Tabla V. Oligos diseñados para la amplificación del gen At2g41800 con la inserción de T-DNA

Oligonucleótido sentido(MET41800)	Oligonucleótido antisentido(LBa1)	Tamaño del producto (pb)
(MET41800) 5´GGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTGGAG´3	(LBa1) 3´GAGCTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC´5 (FIN41800)	1500

Tabla VI. Condiciones de los programas utilizados para la amplificación de las construcciones

Construcción	Programa de PCR		
Región codificante de At2g41800	T inicial	94°C 5'	} 35 ciclos
	T de desnaturalización	94°C 30''	
	T de hibridación o "annealing"	60°C 30''	
	T de extensión	72°C 1' 30''	
	T final	72°C 5'	
	T de enfriamiento	4°C	
Promotor At2g41800	T inicial	94°C 5'	} 35 ciclos
	T de desnaturalización	94°C 30''	
	T de hibridación o "annealing"	64°C 30''	
	T de extensión	72°C 1' 30''	
	T final	72°C 5'	
	T de enfriamiento	4°C	
Gen Completo At2g41800	T inicial	94°C 5'	} 35 ciclos
	T de desnaturalización	94°C 30''	
	T de hibridación o "annealing"	64°C 30''	
	T de extensión	72°C 2' 30''	
	T final	72°C 5'	
	T de enfriamiento	4°C	
GFP	T inicial	94°C 5'	} 35 ciclos
	T de desnaturalización	94°C 30''	
	T de hibridación o "annealing"	65°C 30''	
	T de extensión	72°C 2' 30''	
	T final	72°C 5'	
	T de enfriamiento	4°C	
At2g41800 + T-DNA	T inicial	94°C 5'	} 35 ciclos
	T de desnaturalización	94°C 30''	
	T de hibridación o "annealing"	60°C 30''	
	T de extensión	72°C 2' 30''	
	T final	72°C 5'	
	T de enfriamiento	4°C	

ANEXO III



Control negativo de la figura 13C. Zona de maduración de una plántula wt columbia de 7 días post-germinación.