

00346  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES GENES  
DE LA COFIA DE RAÍZ DE *Zea mays*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA

MARIA DEL ROSARIO LUJÁN DÍAZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2003

A



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.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**OFICIO FCIE/DEP/0256/03**

**Asunto: Asignación de Sinodales**

**DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ**  
Presente.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) **BIOL. MARÍA DEL ROSARIO LUJAN DÍAZ**, quien desarrolló el trabajo de tesis titulado: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES GENES DE LA COFIA DE RAIZ DE Zea mays"

Asimismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 31 de marzo del año en curso, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias (Biología Celular).

<b>CARGO</b>	<b>GRADO,</b>	<b>NOMBRE COMPLETO</b>
PRESIDENTE	: DR.	GUILLERMO LAGUNA HERNÁNDEZ
VOCAL	: DRA.	ALICIA ENRIQUETA BRECHU FRANCO
SECRETARIO	: DRA.	GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ
SUPLENTE	: DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
SUPLENTE	: DRA.	GEORGINA PONCE ROMERO

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

**Atentamente,**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D. F., a 07 abril del 2003.

**JEFE DE LA DIVISIÓN**

*Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas*  
**DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Autorizo a la Dirección General de Informáticas de la UNAM a difundir en formato electrónico cualquier contenido de mi trabajo académico.  
NOMBRE: María del Rosario Lujan Díaz  
FECHA: 20 Oct 2003  
FIRMA: ROSARIO LUJAN DÍAZ

DCR/VASR/cigs

B

**Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Gladys I. Cassab López  
en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Cuernavaca Morelos.  
Financiada por los proyectos IN 208999 DeGAPA y 25186N CONACYT.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

9

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres Refugio Luján y Asunción Díaz**

Por que con su apoyo y comprensión fué posible la realización del presente trabajo. Gracias.

**A mi esposo Enrique Pineda**

Por su amor y paciencia durante todos los años compartidos. Te amo.

**A mi sobrino Jorge David**

A quien deseo que siga adelante proponiéndose metas e ideales. Te quiero.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

D

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Gladys I. Cassab López**

Por que me dio la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio y por su apoyo y enseñanza durante todos estos años.

**A la Dra. Georgina Ponce**

Por su asesoría durante el desarrollo de mi trabajo y por enseñarme tantas cosas.

**A todos los compañeros y amigos en el laboratorio**

Por haberme brindado su amistad y por todos los momentos compartidos.

**A la UNAM**

Por todo.



E

## ÍNDICE

<b>I. - RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>II. - INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
II.1. Organización general de las plantas	
II.2. La Raíz	
II.3. Estructura de la raíz	
• Cofia	
• Meristemo apical (región de división celular)	
• Zona de elongación	
• Zona de maduración	
II.4. Cofia	
• Funciones	
• Tropismos	
<b>III. - ANTECEDENTES</b>	<b>27</b>
III.I. Aislamiento de genes específicos de la cofia	
III.II. Análisis de las secuencias de las clonas C109, C123 y C106 de cofia	
III.III. Localización de los RNAs mensajeros de las clonas ZmC109, ZmC123, ZmC106 y ZmC103 en la cofia.	
<b>IV. - OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>V. - HIPÓTESIS</b>	<b>34</b>

TRABAJA CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>VI. - MATERIALES Y METODOS</b>	<b>35</b>
VI.I. Cepas bacterianas, vectores (plásmidos y bacteriofagos), marcadores de peso molecular para DNA, oligonucleótidos, soluciones amortiguadoras, medios de cultivo y antibióticos.	<b>35</b>
VI.II. Aislamiento de DNA	<b>40</b>
• Purificación de plásmidos en <i>Escherichia coli</i>	
VI.III. Digestión de DNA con enzimas de restricción	<b>41</b>
VI.IV. Electroforesis de DNA	<b>41</b>
VI.V. Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	<b>42</b>
• Purificación con polvo de vidrio utilizando el kit "Geneclean"	
VI.VI. Subclonado de fragmentos de DNA con extremos cohesivos	<b>43</b>
• Preparación de los vectores de clonación	
• Preparación de los fragmentos de clonación	
• Ligación	
VI.VII. Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes para transformación con plasmidos y método de transformación	<b>44</b>
• Preparación de células competentes	
• Método de transformación	
VI.VIII. Preparación de sondas radiactivas de DNA	<b>45</b>
VI.IX. Tamizado de la genoteca genómica de maíz	<b>45</b>
• Titulación de la genoteca genómica	
• Transferencia de placas a filtros de membrana "nylon"	
• Hibridación	
• Amplificación y purificación de DNA de fago	
VI.X. Southern Blots	<b>48</b>
• Tratamiento del gel de agarosa	
• Transferencia del DNA al filtro de membrana "nylon"	

TRABAJO CON FOLLA DE ORIGEN
--------------------------------

• Fijación del filtro de membrana "nylon" con luz ultravioleta	
VI.XI. Preparación de DNA de cadena sencilla	50
VI.XII. Secuenciación de DNA.	51
• Desnaturalización y alineamiento del templado y el primer	
• Reacción de marcaje	
• Reacción de terminación	
VI.XIII. Análisis comparativo de las secuencias.	53
<b>VII. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
VII.I. Tamizado de un banco genómico de maíz	54
VII.II. Análisis del patrón de restricción de las clonas genómicas obtenidas	61
VII.III. Análisis por Southern blot de las clonas genómicas	63
VII.IV. Obtención de la secuencia completa de las clonas genómicas	66
VII.V. Análisis comparativo de las secuencias completas de las clonas genómicas	72
<b>VIII. - CONCLUSIONES</b>	<b>76</b>
<b>IX. - BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>78</b>
<b>X. - ANEXO I</b>	<b>89</b>

TRABAJOS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **I. - RESUMEN**

Las raíces de las plantas vasculares tienen en su ápice un grupo de células conocido como la cofia. Las funciones que se han atribuido a la cofia son: proteger al meristemo apical de la raíz, percibir estímulos ambientales y permitir el paso de la raíz a través del suelo, pero poco se conoce de los genes que pueden estar involucrados. Para entender las funciones de la cofia a nivel molecular fueron identificados varios genes a partir de una genoteca de cDNA específica de cofia y DNA genómico de maíz. Se aislaron tres de estos genes, de los cuales dos son específicos de cofia y el tercero se expresa además en la epidermis. Las secuencias de estos genes codifican para proteínas de la pared celular, que es una estructura que contiene proteínas y polisacáridos necesarios para el desarrollo de las plantas, por lo cual la caracterización de proteínas específicas de la cofia es una estrategia importante para entender las funciones de este tejido.

El objetivo del presente trabajo es caracterizar molecularmente a nuevos genes de la cofia a partir de tres clonas específicas de cDNA denominadas C103, C109 y T101T. La secuencia completa de estas clonas, se obtuvo después de tamizar un banco genómico de maíz (1,380,000 pfu), del cual se obtuvieron varias clonas positivas. La caracterización de los insertos contenidos en estas clonas se llevó a cabo mediante el análisis del patrón de restricción y un análisis tipo Southern. Los fragmentos clonados fueron secuenciados en su totalidad. El análisis de las secuencias mostró que la clona C109 codifica para un gen de maíz llamado ZmRCP2 cuya función no se conoce. La clona C103 es homólogo a la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa, cuya función en plantas es la producción de UDP-D-galactosa utilizada en la

TIPICO CON  
FALLA DE ORIGEN

biosíntesis de polímeros de la pared celular, también se requiere durante el metabolismo de ciertos polisacáridos tales como los galactomananos, que se encuentran típicamente como la principal reserva de energía en el endosperma de algunas semillas leguminosas. Por último, la clona T101T no tiene homología con ningún gen reportado, de tal manera que no se conoce su función y se sugiere que se trata de un nuevo gen de maíz.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **II. - INTRODUCCIÓN**

### **II.1. Organización general de las plantas**

Las plantas tienen dos sistemas importantes, uno aéreo: el caulinar y otro subterráneo: el radicular. La porción aérea, incluye órganos tales como las hojas, brotes, flores, y frutos. La porción radicular incluye aquellas partes de la planta que se encuentran por debajo del nivel del suelo, tales como raíces, tubérculos, bulbos y rizomas.

El cuerpo de la planta se origina de la semilla que contiene células embrionarias que darán origen a todos los tejidos de la nueva planta después del proceso de germinación. El embrión de la planta presenta una raíz o radícula y un tallo con uno o dos cotiledones u hojas germinales. En el extremo del tallo y de la raíz se encuentran los tejidos meristemáticos que se encargan de la proliferación celular seguido por la diferenciación y crecimiento de estas células. Los órganos de los vegetales se componen de tejidos o grupos de células que realizan actividades específicas.

Las plantas están constituidas por diferentes tipos de tejidos: meristemas y tejidos adultos. El meristemo podría definirse como la región donde ocurre la mitosis, un tipo de división celular por la cual de una célula inicial se forman dos células hijas, con las mismas características y número cromosómico que la original. Los tejidos adultos tienen tres tipos básicos: el tejido fundamental que constituye el tejido de sostén de la planta, está formado por parénquima, colénquima y esclerénquima. El tejido epidérmico, cubre las superficies externas de plantas y es el encargado de la protección del cuerpo de la planta, respiración, pasaje de la luz, etc, y el tejido vascular que está compuesto por dos tejidos conductores: el xilema y el floema encargados del transporte de nutrientes, agua, hormonas y minerales dentro de la planta.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **II.2. La Raíz**

La raíz es la porción inferior del eje de la planta, que se desarrolla normalmente bajo el suelo. Presenta formas variadas, relacionadas con sus funciones; actúa como anclaje de la planta, absorbe agua y minerales, permite la conducción del agua y los minerales a las partes aéreas de la planta, almacena reservas alimenticias y produce hormonas. Las raíces pueden además enfrentar cambios en el medio ambiente a lo largo de su crecimiento. En el suelo pueden encontrar variaciones en humedad, temperatura, composición química y niveles de compactación. Aunque estas variables ambientales pueden afectar severamente diversos procesos en las células meristemáticas, la raíz completa puede contender con ellas y sobrevivir; las raíces son por lo tanto fuertemente homeostáticas.

El desarrollo de la raíz inicia con la aparición de la radícula o raíz rudimentaria, en la punta de la radícula, en la zona media del meristemo apical, se encuentra una región llamada zona quiescente donde hay muy poca o ninguna división celular. Todas las células alrededor de esta zona se dividen formando más células que derivan hacia la punta de la raíz y llegarán a formar parte de la cofia. Las células producidas del otro lado del meristemo apical, que forman diferentes columnas, en algún momento dejan de dividirse y empiezan a elongarse; finalmente, dejan de crecer y maduran como células especializadas con funciones particulares. Estos eventos formarán los tejidos primarios de la raíz. El crecimiento de la raíz en el suelo se produce en la zona de elongación. En la zona de maduración, las células han alcanzado su tamaño máximo y se han diferenciado.

TEJIDOS CON  
FALLA DE ORIGEN

Podemos distinguir tres tipos de raíces de acuerdo a su origen: raíces primarias, raíces pivotantes derivadas de la radícula del embrión y raíces adventicias originadas de cualquier otra parte de la planta (tallo, peciolo, etc). En las dicotiledóneas y gimnospermas el sistema radicular es pivotante: consta de una raíz principal de la cual salen las raíces laterales. Las partes

maduras presentan crecimiento secundario y la absorción de agua se lleva a cabo por los extremos, a través de los pelos radicales. En las monocotiledóneas el sistema radicular es fasciculado, formado por un manojo de raíces adventicias originadas en la base del tallo, las que pueden ramificarse pero nunca tienen crecimiento secundario.

Existen grandes variaciones en cuanto al tipo de raíz: raíces fibrosas, en las que numerosas raíces secundarias se originan de la raíz principal como sucede en muchas plantas herbáceas perennes y especialmente en las gramíneas; raíces pivotantes, donde la raíz primaria crece y rápidamente produce ramas laterales, constituyendo el sistema radical principal de la planta; raíces adventicias, donde las raíces brotan de cualquier región de la planta. La utilidad de estas raíces adventicias es variada, absorben el agua y compuestos minerales y proporciona el sostén de la planta en el suelo. En maíz nacen raíces adventicias de varios nudos por encima del nivel del suelo; raíces axonoformas, tienen el eje preponderante, con raíces secundarias poco desarrolladas, como la del pino; raíces ramificadas, cuando la raíz principal se ramifica en primaria, éstas a su vez, vuelven a dividirse en secundarias, y así sucesivamente, como la del perejil; raíces fasciculadas, formadas por un haz de raíces, todas más o menos del mismo calibre como las del ajo, raíces tuberiformes, tienen forma de tubérculo, como la dalia; raíces aéreas, que viven en contacto con el aire, apoyándose sobre otros vegetales o piedras, pertenecen a plantas epífitas y no son parásitas porque se nutren por sí solas, ejemplos: orquídeas, clavel del aire; raíces acuáticas, que viven sumergidas en el agua, pero sin fijarse en el fondo, por lo general son muy reducidas porque desempeñan únicamente la fijación del vegetal, ya que la absorción la realiza por toda la superficie, ejemplos: repollito del agua.

TRABAJO CON  
E. \_\_\_\_\_ A DE ORIGEN

### II.3. Estructura de la raíz

La anatomía interna de las raíces se observa examinando un corte longitudinal y transversal de una raíz.

En el corte longitudinal, se distinguen las zonas especializadas de desarrollo en las raíces: la cofia, el meristemo apical, la zona de células de elongación y la zona de maduración (Figura 1).

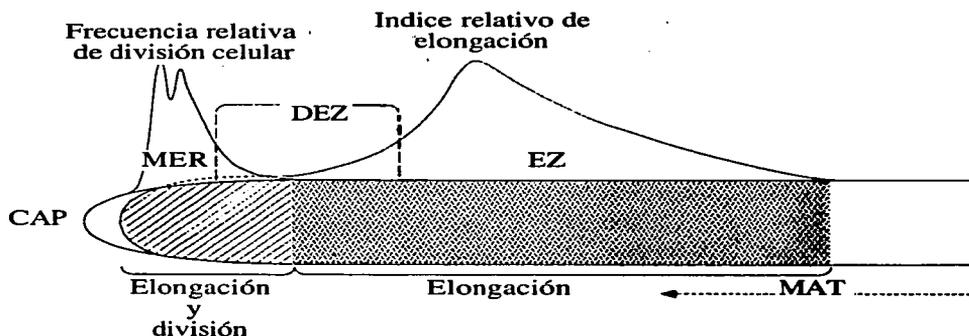


Figura 1. Corte longitudinal de una raíz de maíz mostrando sus zonas especializadas. CAP, cofia, MER, meristemo apical, DEZ, zona de elongación distal, EZ, zona de elongación, MAT, zona de maduración (Ishikawa y Evans, 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- **La cofia**

Las raíces de todas las plantas vasculares tienen en la punta un tejido distinto conocido como la cofia. La cofia percibe y procesa varios estímulos ambientales tales como la gravedad, luz, humedad, obstáculos, iones, temperatura, etc., cambiando la dirección del crecimiento de la raíz en relación con el estímulo. Se han podido diferenciar dos tipos básicos de construcción raíz-cofia. En raíces con tipo de construcción abierta, como en muchas dicotiledóneas, no existe una distinción morfológica entre la raíz y la cofia. Por el contrario, en raíces de construcción cerrada, como en pastos, existe una separación morfológica distintiva. De esta manera cuando se examinó una raíz con tipo de construcción cerrada, tal diferencia nos permite determinar con seguridad, el fin del meristemo radical y el inicio de la cofia (Barlow, 1975).

- **Meristemo apical (región de división celular)**

El crecimiento y diferenciación de la raíz están controlados por la actividad del meristemo apical que da lugar a todos los tejidos de la raíz. El meristemo está localizado sobre la periferia de una región inactiva conocida como el centro quiescente y en maíz, se producen diariamente entre 10,000 y 20,000 células nuevas. Las células del meristemo se dividen de tal manera que las células hijas interiores permanecen meristemáticas y las células hijas exteriores después de varias divisiones se diferencian para dar lugar a los diversos tejidos de la raíz (Feldman, 1994).

- **Zona de elongación**

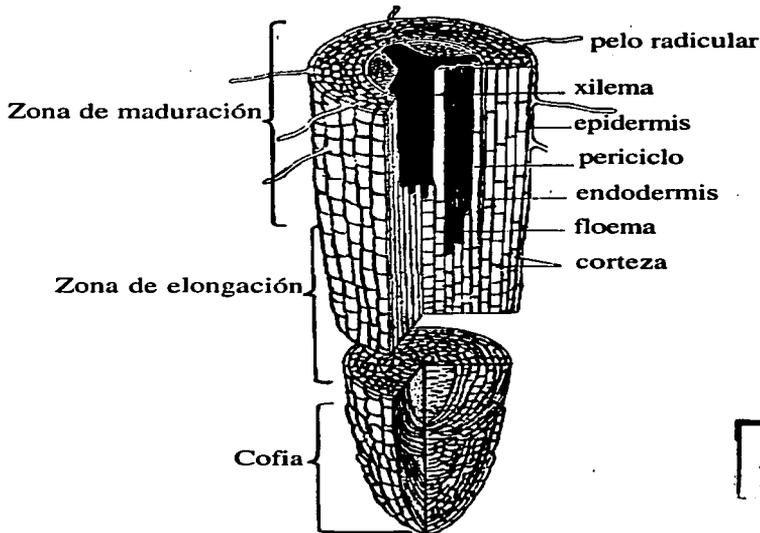
La región de elongación tiene entre 1-10 milímetros de longitud y se caracteriza por el crecimiento longitudinal de las células. En esta región también tienen lugar un número relativamente pequeño de divisiones celulares y el principio de la diferenciación de células de diversos tipos. La región de elongación se fusiona, en un extremo con el meristemo apical y en el otro, con la región de maduración.

ENCUENTRO CON  
FALLA DE ORIGEN

- **Zona de maduración**

La región de maduración, usualmente tiene de uno a varios centímetros de longitud. En este lugar las células han alcanzado esencialmente su tamaño completo y gradualmente van teniendo su forma madura, así como su función (Cronquist, 1984).

En el corte transversal (en la zona de maduración), se distinguen los siguientes tejidos: epidermis, corteza, periciclo, xilema y floema (Figura 2).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 2.** Corte transversal de una raíz en su zona de maduración (Curtis, 1988).

La epidermis, representa la totalidad de la superficie de la raíz joven, además, absorbe agua y sales del suelo y protege a los tejidos internos; las

células epidérmicas se caracterizan por poseer delicadas emergencias tubulares conocidas como pelos radicales. En seguida, se encuentra la corteza, esta región se encuentra formada por células de parénquima de forma algo irregular, con muchos espacios intercelulares; la capa más interna de células de la corteza es la endodermis, tejido superficial que envuelve la región central de la raíz. En seguida de la endodermis se encuentra otra capa de células llamada periciclo; por división celular, el periciclo da origen a las raíces laterales, que forman su salida a través de la corteza y la epidermis. En el interior del periciclo, se encuentran los tejidos vasculares; el xilema, transporta el agua a través de la planta y está formada por fibras y elementos de vasos, y el floema distribuye el alimento producido en las hojas hacia la raíz y otras partes de la planta. En los tejidos vasculares del cilindro central, el xilema está formando por cordones alternados con el floema; en dicotiledóneas hay 4 ó 5 cordones o polos xilemáticos denominándose raíces tetrarcas o pentarcas; se denominan poliarcas cuando los polos son numerosos, lo cual ocurre en las monocotiledóneas. El límite entre el cilindro central y el córtex presenta dos estratos celulares: el externo es la endodermis (regula la entrada de sales disueltas en el agua) y el interno es el periciclo (encargado de originar las raíces laterales y los meristemas secundarios en las raíces de dicotiledóneas).

TRABAJO CON  
LA DE ORIGEN

#### II.4. Cofia

La cofia de la raíz (Figura 3 y 4A) percibe y procesa muchos estímulos del medio ambiente, su estructura consiste en un grupo pequeño de células especializadas organizadas en filas (Figura 5). El número de células que conforman una cofia en crecimiento activo generalmente se mantiene constante; sin embargo, las células son continuamente renovadas y a lo largo del tiempo cambian su posición desde la capa más interna, adyacente al meristemo, hasta que se encuentra en la capa periférica, después de lo cual son liberadas y forman parte del mucílago. Las células periféricas liberadas al suelo permanecen vivas hasta por un mes, y su función aún no está definida, existe una hipótesis que sugiere que estas células son capaces de mantener una comunicación intracelular con las células iniciales después de haber sido liberadas para inducir la división de nuevas células. (Zhang *et al.*, 1995., Brigham *et al.*, 1998). Además, en la rizosfera parece desempeñar un papel en la regulación de poblaciones de microorganismos que rodean a la raíz (Hawes y Lin, 1990., Hawes *et al.*, 2000).

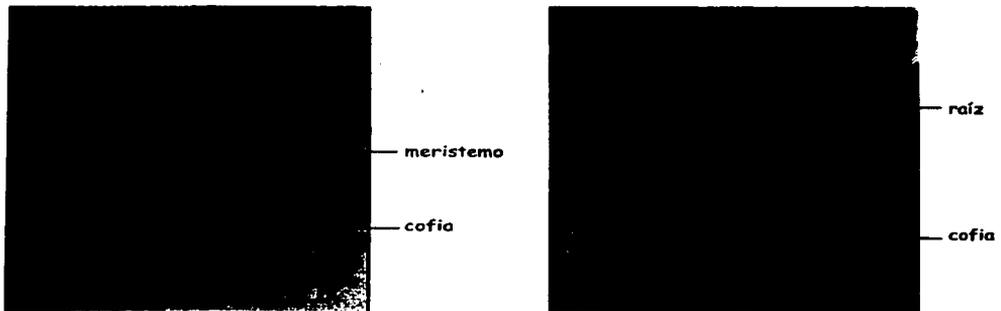


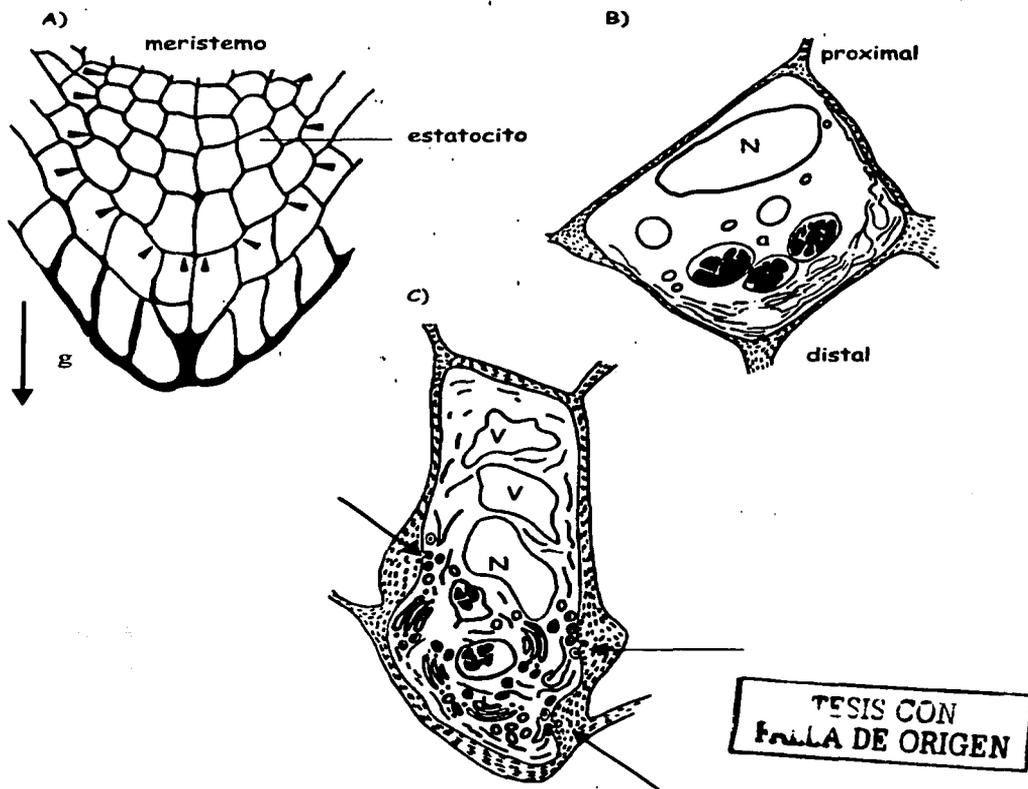
Figura 3. La cofia está formada por células distintas a las del resto de la raíz. El meristemo apical se localiza en la parte superior donde inicia la cofia (Barlow, 1975).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En maíz, las células de la cofia provienen de una región meristemática conocida como el caliptrógeno; en esta región se encuentran las células con la mayor tasa de división mitótica de toda la planta. Una vez diferenciadas se pueden observar los estatocitos (células que perciben la gravedad), en las cuales resalta la posición del núcleo en la parte proximal y amiloplastos y retículo endoplásmico en la posición distal. (Figura 4B).

Posteriormente, en la capa periférica se localizan los dictiosomas (Figura 4C), que se encargan de la secreción del mucílago. Estos se encuentran en la parte distal produciendo vesículas llenas de mucílago que al fusionarse con la membrana plasmática liberan su contenido (Sievers y Hensel 1991). Por último las células de la periferia son liberadas debido a que sus paredes celulares son degradadas; en este estado pasan a formar parte del mucílago. Los productos de la secreción del mucílago difieren en varias especies estudiadas, pero sus componentes esenciales son polisacáridos y proteínas (Rougier, 1981). Los azúcares más abundantes son glucosa, galactosa y arabinosa, y en menor cantidad de ácido urónico y fucosa que constituye el 20% y 30% del mucílago de maíz, siendo menor su concentración en otras plantas (Chaboud, 1983). El mucílago participa en varios procesos fisiológicos de la raíz y aunque no se sabe con exactitud, se le atribuyen varias funciones como el mantenimiento del contacto planta-suelo, prevención contra la desecación de la raíz, protección contra agentes patógenos, estabilización de agregados de partículas del suelo y la acumulación selectiva de iones contra aluminio (Oades, 1978., Bengough *et al.*, 1997).

TESIS CON  
FOLIA DE ORIGEN



**Figura 4.** A) *Cofia*. Cada célula (estatocito) es generada por divisiones meristemáticas. La flecha denota la dirección de la gravedad. B) Estatocito. El núcleo (N) se encuentra en la porción proximal y el retículo endoplásmico (RE) en la porción distal. Los amiloplastos (a: almidón) se ubican sobre el retículo endoplásmico (Sievers y Hensel, 1991). C) Los dictiosomas (d) producen vesículas llenas de mucílago que se liberan al fusionarse con la membrana plasmática. La secreción es marcada por las flechas. N, núcleo; V, vacuolas; a, amiloplastos (Sievers y Hensel, 1991).

### CÉLULAS DE LA COFIA Y SUS FUNCIONES -

1.- División celular



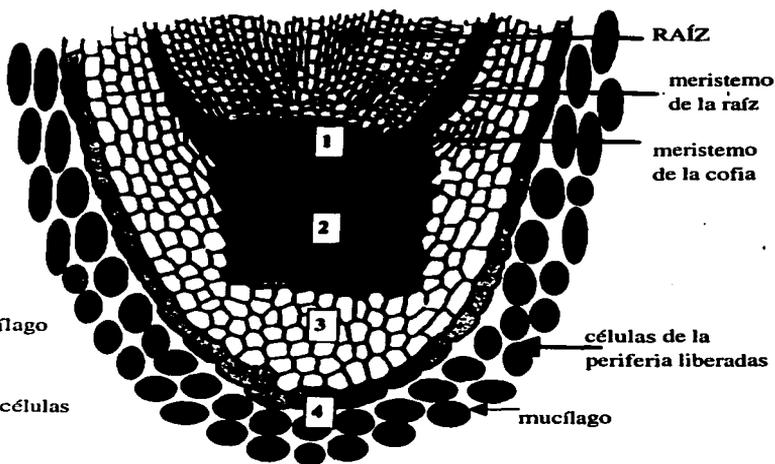
2.- Estatocitos



3.- Secreción de mucílago



4.- Separación de las células de la periferia



**Figura 5.** Estructura y desarrollo de la cofia (Barlow, 1975). La división celular ocurre en el meristemo de la cofia, las células renovadas se desplazan hacia la periferia de la cofia, después son liberadas y forman parte del mucílago. La región de la columela consta de células ricas en amiloplastos denominadas estatocitos. El tiempo requerido para renovar completamente la cofia es desde 1 a 7 días, dependiendo de las condiciones del crecimiento (Barlow, 1978; Clowes 1976, 1980).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las cofias, especialmente de maíz, producen abundante mucílago que puede disminuir o aumentar en respuesta al cambio de humedad (Guinel y McCully, 1986). Sin embargo, al remover el mucílago de las raíces de maíz no afecta a los estímulos hidrotropico y gravitropico, (Takahashi *et al.*, 1991). Se hipotetiza que tanto la producción de mucílago como el fenómeno del hidrotropismo son una de las tantas características específicas de la cofia que están asociadas con las adaptaciones de las plantas a diversos ambientes en el suelo.

#### • **Funciones**

Las funciones que se han atribuido a la cofia son: 1) proteger al meristemo apical de la raíz, 2) percibir estímulos ambientales, y 3) permitir el paso de la raíz en crecimiento a través del suelo. Las dos primeras funciones se observan en la cofia de todas las plantas, sean éstas terrestres, aéreas, o acuáticas. En cuanto a la última función, Haberlandt (1914), señaló que el mucílago secretado por las células periféricas de la cofia, funciona como lubricante facilitando el paso de la raíz a través del suelo. Darwin (1880), describió otras funciones de la cofia como son la sensibilidad a la gravedad (gravitropismo), a los gradientes de humedad (hidrotropismo), a la luz (fototropismo), al tacto (tigmotropismo) y a la temperatura (termotropismo).

#### • **Tropismos**

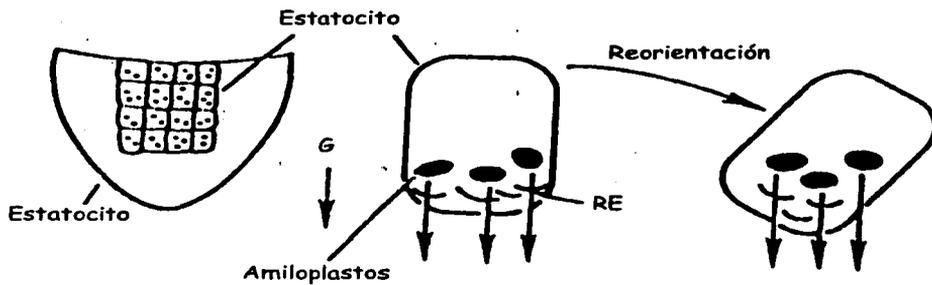
Las plantas carecen de órganos de los sentidos pero son sensibles a diferentes estímulos del medio y reaccionan fundamentalmente mediante movimientos de crecimiento o tropismos. Si crecen hacia el estímulo el tropismo es positivo, si crecen en contra del estímulo el tropismo es negativo. Las respuestas a los diferentes tropismos varían continuamente por las diferencias que existen en el medio ambiente, como son: gradientes de humedad, distribución de nutrientes, calor, luz y oxígeno, entre otros. Según el tipo de estímulo, se pueden diferenciar distintos tipos de tropismos que a continuación se mencionan.

## **Gravitropismo**

Es un tipo de respuesta que corresponde a los movimientos de los órganos de una planta inducidos y orientados por la acción de la gravedad. En una planta, el tallo y la raíz son afectados por este estímulo. El tallo crece en sentido opuesto a la fuerza de gravedad, por lo tanto presenta un gravitropismo negativo. Por el contrario, la raíz crece penetrando la tierra, en lo que constituye un gravitropismo positivo. Este tipo de respuesta asegura la función que tiene la raíz que es absorber el agua y las sales minerales, y además permite fijar y dar firmeza a la planta. Actualmente, varios autores describen tres fases en el fenómeno de gravitropismo: la percepción del estímulo (sensor de la gravedad), transducción de la señal (flujo de información) y la respuesta de la raíz (curvatura) (Feldman, 1985).

La percepción de la gravedad ocurre en la cofia (Darwin, 1880 y Juniper *et al.*, 1966), en la que probablemente participe en la sedimentación de los amiloplastos en los estatocitos (Wilkins, 1984), aunque existen discrepancias acerca de su mecanismo. Se cree que la porción de la cofia capaz de detectar la gravedad es la zona central, denominada columela; ésta consta de células ricas en amiloplastos densos, repletos de gránulos de almidón. En las raíces orientadas verticalmente, los amiloplastos se sitúan en el extremo inferior de las células de la columela, hacia el ápice radicular. Segundos después de que las raíces reciben el estímulo gravitropico, los amiloplastos de la columela abandonan su posición anterior y se sitúan a lo largo de lo que entonces es la nueva pared inferior de las células (Figura 6), este fenómeno de sedimentación parece desencadenar una serie de transducción de señales que curvan la raíz, como la activación de canales de calcio y muchos otros eventos que aún no han sido totalmente identificados (Legue *et al.*, 1997).

TEXTO CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 6.** Esquema de los estatocitos con la distribución propuesta en la cofia de amiloplastos y retículo endoplásmico (RE) en relación a la gravedad (G) (Feldman, 1985).

ESTADOCITO CON  
FONTO DE ORIGEN

En raíces que no responden a la gravedad, porque se les ha seccionado la cofia, la recuperación de la sensibilidad a la gravedad está directamente ligada a la formación y establecimiento de nuevos amiloplastos (Barlow y Grundwag, 1974). En 1989, Caspar y Pickard reportaron que una mutante de *Arabidopsis thaliana* que no almacena almidón fue capaz de responder al estímulo gravitópico, aunque con menos intensidad. Simultáneamente, Kiss *et al.* (1989) indicaron que aún los amiloplastos sin almidón podrían funcionar como estatolitos. La atribución que se le da a los estatocitos como sensores de la gravedad se refuerza con experimentos de ablación con rayo laser en los que se destruyen las células centrales de la columela en la raíz de *Arabidopsis* y se disminuye drásticamente la respuesta gravitópica (Blancaflor *et al.*, 1998). La ablación de las células de la periferia de la cofia y células del ápice no alteraron la curvatura de la raíz. La ablación de células más internas correspondientes a la columela causan una fuerte inhibición en el efecto de la curvatura de la raíz sin afectar la velocidad del crecimiento.

Existen varias teorías acerca de lo que pasa después de que los amiloplastos se sedimentan en un lugar diferente al original. Se cree que al obedecer la fuerza de gravedad, se desplazan hacia el nuevo lado inferior y son detenidos por una inmensa red de microfilamentos de actina conectados a una región del estatocito rica en microtúbulos, retículo endoplásmico y membranas de los elementos del citoesqueleto provocando la salida de iones de calcio. (Pickard, 1985., Volkman *et al.*, 1991). Evans *et al.* (1986) proponen que el calcio liberado activa el sistema de transporte del ácido indol acético (IAA) de una célula a otra hacia la porción inferior de la cofia. Sin embargo no existen evidencias sobre la interacción de los amiloplastos con los microfilamentos. Sobre las moléculas que intervienen en la transducción de la señal aún quedan muchas dudas; lo que sí se sabe es que el gravitropismo en raíces es eliminado al ser expuestas a elementos quelantes de calcio y/o algunos bloqueadores de canales de calcio.

TRABAJO CON  
FICHA DE ORIGEN

La transducción es la fase intermedia de la respuesta gravitrópica; involucra la comunicación de la dirección de la fuerza de gravedad en la cofia, desde el lugar donde se percibe hasta la región donde la raíz se curva. Se cree que el calcio es un segundo mensajero en la respuesta gravitrópica. Chandra *et al* (1982), demostraron mediante técnicas microscópicas que el calcio ( $Ca^{2+}$ ) se encuentra presente en los amiloplastos de las cofias de maíz, chícharo (*Pisum sativum*) y lechuga (*Lactuca sativa*). Posteriormente Evans y sus colaboradores (citados por Lee *et al.*, 1983, 1984) y Roux (1984), presentaron evidencias de que el calcio tiene un papel importante en la detección de la gravedad para curvar la raíz. Lee *et al.* (1983) demostraron que el calcio podía descender por el interior de la cofia. Aplicaron calcio radioactivo a las raíces del maíz, orientaron las raíces en vertical y horizontalmente y midieron el movimiento de los iones radioactivos. En las raíces orientadas verticalmente, los iones radiactivos de calcio mostraban una distribución uniforme. En las raíces horizontales, por el contrario, el calcio radioactivo se desplazó hacia el lado inferior de la raíz. Por otra parte, Evans *et al.* (1986) aplicaron EDTA (que se une al calcio y lo inmoviliza) a las cofias de raíces de maíz y observaron que las raíces tratadas siguieron creciendo normalmente, pero perdieron toda sensibilidad a la gravedad, mientras que al eliminar el EDTA y remplazarlo por calcio, la capacidad de respuesta a la gravedad se recuperaba.

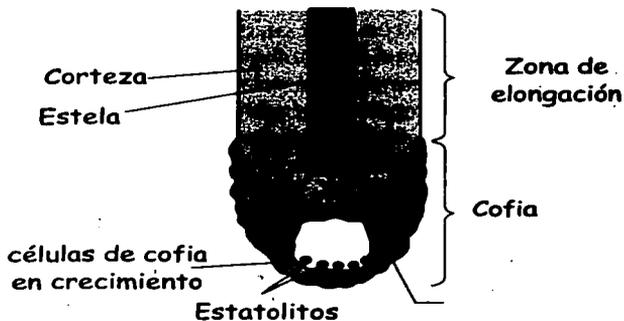
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

La curvatura, es la fase final de la respuesta gravitrópica y resulta de la reorientación de la raíz en relación al vector de gravedad. Cuando la raíz es orientada en forma vertical, crece de forma uniforme, por el contrario, cuando la colocamos en forma horizontal, el lado superior crece más que el inferior; el crecimiento más lento de la parte inferior curva la raíz hacia abajo. Este cambio en el crecimiento diferencial de alguna manera genera una señal química o eléctrica en la cofia que produce la curvatura hacia la dirección de la gravedad (Moore *et al.*, 1989).

La hipótesis de Cholodny-Went propone que la curvatura resulta de la acumulación de alguna hormona inhibidora del crecimiento, en el lado inferior de la zona de elongación. En general se propone que el ácido indol acético (IAA) y el ácido abscísico (ABA) pudieran ser los responsables del inicio de esta reacción (Went y Thimann, 1937). Cuando una raíz es colocada en posición horizontal, la auxina se redistribuye por el lado inferior de la raíz, esta redistribución promueve el crecimiento en el lado superior e inhibe en el lado inferior de las raíces, resultando en una curvatura, ver figura 7 (Hasenstein *et al.*, 1991). El transporte de auxinas está claramente involucrado en el gravitropismo de las raíces, los inhibidores del transporte de auxina tales como el ácido N-(1-naftil)talámico (NPA) y ácido triidobenzoico (TIBA) inhiben la curvatura de la raíz (Lee *et al.*, 1984, Evans *et al.*, 1992, Muday y Haworth, 1994). No obstante, la regulación del transporte de auxinas durante la gravirespuesta se desconoce. Se sugiere que la gravirespuesta y la reorientación de los microtubulos del citoesqueleto dependen del contenido de auxinas de la raíz (Blancaflor y Hasenstein, 1995). Sin embargo la destrucción de los microfilamentos con taxol y orizalina no inhiben el transporte de auxina y confirma que no es requerido para la curvatura gravitrópica (Hasenstein *et al.*, 1999). Por otro lado, la destrucción de actina con latrunculina B (Lat B) aumenta la gravirespuesta en la raíz de maíz (Hou Guichuan *et al.*, 2003).

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

**A) Orientación vertical**



**A) Orientación horizontal**

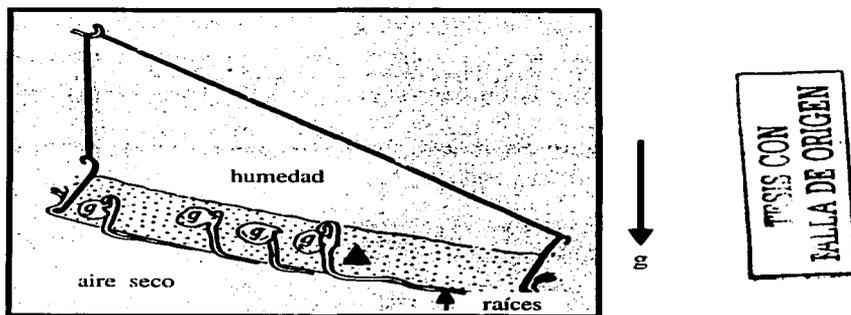


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 7.** Esquema de la curvatura de la raíz, se propone que la curvatura resulta de la acumulación de alguna hormona inhibidora del crecimiento. Cuando la raíz es colocada en posición horizontal, la auxina promueve el crecimiento del lado superior de la raíz e inhibe el del lado resultando en una curvatura (Hasenstein *et al.*, 1991).

## Hidrotropismo

Es el movimiento que realizan las raíces hacia gradientes de mayor humedad. La primera demostración del hidrotropismo en raíces fue por Knight en 1811, y Sachs en 1872. Este último autor, plantó semillas en una canasta colgante de malla llena de aserrín inclinado ligeramente, las plántulas de chícharo eran colgadas y sus raíces al elongarse no obedecían la fuerza de gravedad, permaneciendo adheridas al cilindro húmedo (Figura 8). Darwin (1880) usó el método de Sachs y también demostró hidrotropismo positivo en raíces de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Avena sativa* y *Triticum aestivum*. Muchos trabajos hacen referencia del hidrotropismo positivo en raíces pero no han medido los gradientes de humedad alrededor de las raíces. Hooker (1915) construyó un higrómetro para determinar el gradiente de humedad requerido para la inducción del hidrotropismo y estudió este fenómeno, aplicando gradientes de humedad utilizando papel filtro con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico en el lado contrario de las raíces, utilizando higrómetros para asegurarse de las concentraciones de humedad.



**Figura 8.** Hidrotropismo en raíces, demostrado por la técnica de Sachs (1872), cuando las raíces emergen de abajo del cilindro de malla se desvían de la fuerza de gravedad permaneciendo adheridas al cilindro húmedo.

Al igual que para la percepción del estímulo gravitacional, la localización del sistema sensorial del hidrotropismo es encontrado en la cofia (Jaffe *et al.*, 1985), de tal manera que basta con removerla para que las raíces no dirijan su crecimiento hacia el gradiente de mayor humedad. Los estudios sobre el hidrotropismo han sido difíciles de realizar, principalmente por la interacción que mantiene con el gravitropismo, que depende de la intensidad de uno o ambos estímulos (Takahashi y Scott 1991; Takahashi *et al.*, 1992a, 1992b, 1996). Por esta razón, fue necesario seleccionar mutantes insensibles a la gravedad como la mutante de chícharo *ageotropum*, que permite analizar al hidrotropismo sin que exista la interferencia con el gravitropismo (Jaffe *et al.*, 1985). Las raíces de *ageotropum* responden hidrotrópicamente pero no gravitrotópicamente, cuando *ageotropum* es introducida en una cámara cerrada con humedad relativa entre 98 y 86% con sus raíces en vermiculita seca; las raíces emergen de la vermiculita. Sin embargo, cuando no existe humedad relativa en la cámara, las raíces emergen pero después se doblan hacia la vermiculita húmeda.

Se demostró también que en la zona de elongación no existe percepción a gradientes de humedad (Takano *et al.*, 1995). Cuando la raíz de la mutante *ageotropum* es cortada a 1.5 y 2 mm de la punta ya no responde hidrotrópicamente (Jaffe *et al.*, 1985; Takahashi y Suge, 1991). Estos resultados indican que las células que perciben los gradientes de humedad se encuentran en la cofia. Aunque se sabe que es en esta parte, no se sabe cuales células ni que mecanismos se llevan a cabo para la percepción de los gradientes.

La transmisión de la señal hidrotrópica de la cofia a la región de elongación, se estudió con la curvatura hidrotrópica de *ageotropum* y la gravitrotópica de la variedad Alaska; los resultados indican que las curvaturas son totalmente inhibidas si las raíces son tratadas previamente con EGTA que es un agente quelante de calcio. Sin embargo, si el EGTA es reemplazado antes de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

hidroestimulación por calcio en solución, las raíces recobran la capacidad de respuesta (Takano *et al.*, 1997). Por otro lado se demostró que el lantano, que es un bloqueador de canales de calcio, también inhibe la curvatura hidrotropica y otros como nifedipina y verapimil no le afectan (Takano *et al.*, 1997). Estos resultados indican que el calcio apoplástico y la entrada de calcio a través de la membrana plasmática y algunos tipos de canales de calcio están involucrados en la señalización del hidrotropismo. Estos mecanismos de transducción pueden causar cambios en la extensibilidad de la pared celular para finalmente diferenciar el crecimiento en la región de elongación. Takahashi y colaboradores en 1999 aislaron un gen llamado endoxiloglucan transferasa (EXGT) por transcriptasa reversa (RT)-PCR usando poly(A)<sup>+</sup>RNA de raíz de chícharo *ageotropum*, la función de este gen es la regulación del crecimiento celular y se propone que puede ser utilizado como marcador para estudiar la relación entre los mecanismos de transducción y el crecimiento diferencial en el hidrotropismo.

La caracterización de mutantes que afecte alguna función de la cofia, tal como hidrotropismo, proveerá información sobre los procesos fisiológicos principales involucrados en este fenómeno. Recientemente, Eapen, D. y colaboradores (2003), desarrollaron un sistema de "screening" con un gradiente potencial de agua para el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* cuyas raíces responden negativamente al estímulo hidrotropico. Se aisló una mutante llamada *nhr1* (no hydrotropic response) que continúa su desarrollo hacia el medio con el potencial de agua más bajo contrariamente al hidrotropismo positivo.

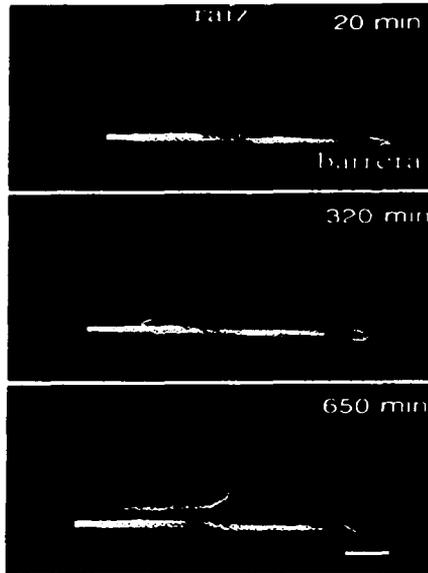
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### **Tigmotropismo**

En este tipo de respuesta, el estímulo detectado por la punta de raíces, o los tallos y/o hojas es el contacto físico. En el suelo, la dirección del crecimiento de las raíces frecuentemente es alterada, para escapar de los obstáculos que se atraviesan en su camino. El mecanismo por el cual escapan las raíces de los obstáculos no ha sido muy estudiado por la dificultad de mantener constante un estímulo tigmotrópico en las raíces y por la interacción que mantiene con otros estímulos del medio ambiente como por ejemplo la gravedad (Figura 9). Los sistemas que responden a la presencia de obstáculos y a la gravedad pudieran tener elementos comunes.

Okada y Shimura (1990), reportan que las raíces de *Arabidopsis* que crecen a lo largo de una superficie de agar en un ángulo de  $45^\circ$ , desarrollan una ondulación como resultado de una reversión periódica de rotación de la punta de las raíces que están en contacto con el agar. Por otro lado, Ishikawa y Evans (1992), concluyen que la curvatura de las raíces resulta de una respuesta tigmotrópica estimulada al aplicar calcio. Parece ser que el calcio tiene un papel funcional en la percepción del obstáculo, pero no se sabe todavía donde y cómo tales manipulaciones de calcio actúan a nivel celular (Fasano, J.M *et al.*, 2002). Otro factor que podría provocar una respuesta tigmotrópica es el pH que puede alterar la pared de las células de la cofia y de la zona de elongación (Fasano J.M *et al.*, 2001).

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 9.** Interacción del tigmotropismo y el gravitropismo en la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. El crecimiento lateral a través de la barrera representa una respuesta entre el crecimiento gravitropico y la información del obstáculo que percibe la cofia (Fasano *et al.*, 2002). Tamaño de la barra=1mm.

TESIS CON  
- LA DE ORIGEN

### • **Fototropismo**

Implica el crecimiento de la planta orientado por un estímulo luminoso. Cada parte de ella responde de distinta forma a este estímulo. En el caso del tallo, se observa un fototropismo positivo, porque crece hacia la fuente luminosa. En las hojas, se aprecia una reacción muy interesante. Estas adoptan diferentes posiciones que les permiten captar mejor la luz del sol. Además, los granos de clorofila que poseen también se desplazan en dirección a los rayos solares y esto permite hacer más eficiente el proceso de fotosíntesis. La raíz, en cambio, presenta un fototropismo negativo y se ha discutido mucho la necesidad de luz en la gravireacción porque la luz inhibe el crecimiento de la raíz ya que éstas están ocultas en la tierra, sin embargo, Mandoli *et al* (1990) demostraron que la luz es capaz de penetrar varios milímetros dentro del suelo.

En el fototropismo las plantas responden con un crecimiento desigual, inducido por un cambio asimétrico de la luz que recibe la planta, de forma que provoca diferentes intensidades de crecimiento en la parte oscura y en la iluminada. Como consecuencia de esto, la respuesta fototrópica se manifiesta por una curvatura de la planta orientada por la luz. En 1880, Darwin descubrió que las puntas de las plantas se curvan primero y que la curvatura se extiende gradualmente hacia abajo a lo largo del tallo. Cubriendo las puntas con papel estaño se evitó la curvatura de la punta, por lo que concluyó que algún factor se transmitía desde la punta de la planta a las regiones inferiores causando la curvatura de la misma. Por otro lado, en los años 20, Cholodny especuló que la asimetría del crecimiento que provocaba la curvatura fototrópica era debida a una distribución asimétrica de la auxina desde la parte iluminada a la oscura, esto fue demostrado por Went en 1926 por lo que se le conoce como la teoría de Cholodny-Went. Según esta interpretación, las diferencias de crecimiento se deben un gradiente de concentración de auxina, que es superior en la parte oscura sobre la iluminada.

TESIS CON  
FOLIA DE ORIGEN

El transporte polar de auxina puede ser inhibido a través de la aplicación de fitotropinas como el NPA. Philip J.J y colaboradores crecieron plantas de *Arabidopsis thaliana* con luz en un medio que contiene NPA y observaron que la elongación del hipocótilo, la raíz y el gravitropismo son fuertemente inhibidas. Cuando crecen en la obscuridad, el NPA interrumpe la respuesta de gravedad pero no afecta la elongación. Estos resultados indican que la luz tiene un efecto significativo sobre la inhibición inducida por NPA en *Arabidopsis thaliana* y se sugiere que la auxina tiene más importancia en respuestas de elongación en crecimiento con luz que en crecimiento en la obscuridad. Del mismo modo, en 1997, Watahiki M.K y colaboradores aislaron una mutante insensible a IAA (*msg1*) que no experimentó curvatura en el crecimiento del hipocótilo en ninguna de las concentraciones de IAA probadas, por lo anterior se sugiere que la auxina está implicada en los procesos de crecimiento diferencial en *Arabidopsis thaliana*.

Las plantas tienen varios receptores a la luz azul, que regulan diferentes aspectos de crecimiento y desarrollo. En recientes estudios se han identificado una clase nueva de receptores cinasa que son exclusivos de plantas: fototropina 1 (PHOT1) y fototropina 2 (PHOT2) (Briggs W.R. *et al.*, 2001; Winslow R, *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, PHOT1 y PHOT2 median no sólo el fototropismo, sino que también inducen la migración de cloroplastos y la apertura de estomas. Los receptores phot 1 y phot 2 tienen dos dominios LOV (regulados por luz, oxígeno o voltaje), un dominio cinasa y actividad de autofosforilación y funcionan como un fotoreceptor para el fototropismo. Otros receptores reportados son los criptocromos 1 y 2 (CRY1 y CRY2) que se sugiere funcionan también como fotoreceptores para el fototropismo (Ahmad, M. *et al.*, 1998), sin embargo estudios subsecuentes demuestran que la doble mutante *cry1-cry2* conserva fototropismo normal sobre un rango grande de tratamientos con luz (Lascève, G. *et al.*, 1999). Los criptocromos 1 y 2 son receptores que regulan el crecimiento del hipocótilo y el tiempo de floración; mientras que los fitotropinas median el fototropismo en respuesta

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

a la luz azul. Además el fitocromo A también media varias respuestas a la luz azul (Chentao Lin, 2000, Todd Mockler, *et al.*, 2003).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **III.- ANTECEDENTES**

#### **III.I. Aislamiento de genes específicos de la cofia**

Se aislaron nueve clonas a partir de un tamizado diferencial en un banco de cDNA  $\lambda$ GEM-4 específico de cofia de maíz utilizando como sondas los DNAs complementarios al RNA mensajero. Para identificar cuales de las nueve clonas son comunes, cada clona fue analizada por hibridación tipo Southern contra las ocho clonas de cDNA restantes. Este análisis reveló que la clona denominada C109 hibridaba con tres clonas (C104, C131 y C134), la clona llamada C123 hibridaba con dos clonas (C111 y C101) y la clona T101T hibridaba con una clona (TC101), sugiriendo que estos genes son altamente expresados en la cofia. Por otro lado, las clonas C103 y C106 no muestran homología con el resto de las clonas. De este modo, finalmente se aislaron cinco clonas diferentes: C109, C123, C106, C103 y T101T.

Un análisis anterior por hibridación tipo Northern con diferentes tejidos de maíz (raíz, cofia y hoja) indicó que las clonas C109, C123 y C106 se expresan únicamente en la cofia de la raíz, mientras que la expresión de la clona T101T no se encuentra en ningún tejido, lo cual podría deberse a que tiene una secuencia rica en AT en la región 3' no traducible, característica que presentan algunos RNAs mensajeros de vida corta o simplemente a que su RNA mensajero tiene un nivel de expresión muy bajo.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### III.II. Análisis de las secuencias de las clonas C109, C123 y C106 de cofia

La clona de cDNA C109 tiene una secuencia parcial de 982 pb, que codifica para dos posibles marcos de lectura abierto. El marco de mayor longitud predice una proteína clásica arabinogalactana (AGPs) con 31% de identidad, mientras que el marco de menor longitud es casi idéntico a una proteína llamada ZmRCP2 reportada en maíz que presenta un motivo conservado de cisteínas (Matsuyama *et al.*, 1999b).

Las AGPs son proteoglicanos de alto peso molecular que usualmente contienen 10% de proteína rica en prolina, alanina, serina y treonina y una porción alta en carbohidratos (90%) como galactosa, arabinosa, ácido urónico, glucosa, ramnosa, manosa y glucosamina. A pesar de su abundancia y extensa distribución en plantas no hay evidencias definitivas para su función aunque se cree que están implicadas en el crecimiento y desarrollo. Las AGPs clásicas contienen una estructura que incluyen la secuencia señal de anclaje-GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Figura 10).

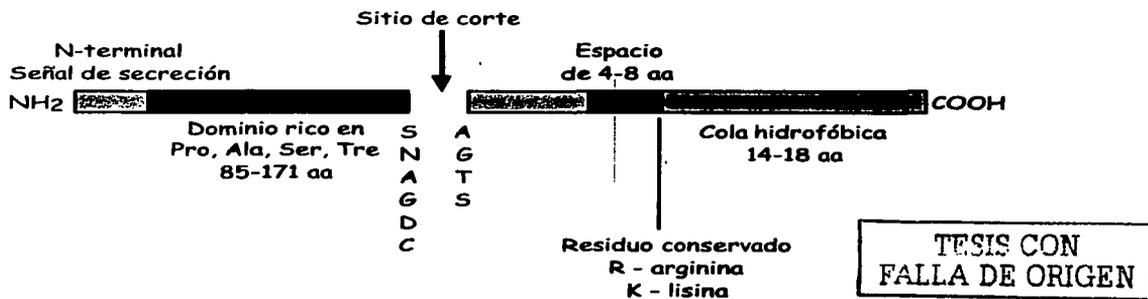


Figura 10. Estructura de las AGPs clásicas. Incluye la secuencia señal de anclaje-GPI.

En animales, esta señal provee una alternativa al dominio transmembranal para anclar proteínas a la superficie celular. Las proteínas con anclaje GPI participan en diferentes vías de transducción de señales. Por otro lado, ya se han clasificado genes de plantas que tienen homología con varios genes de animales y levaduras que codifican para AGPs clásicas (Tabla 1). En la tabla 1 se incluye la clona de cDNA C109 ya que tiene las características de las AGPs clásicas como el amino terminal hidrofóbico seguido por un dominio rico en prolina, alanina, serina o treonina, un carboxilo terminal donde está la señal de anclaje-GPI, seguido por un espacio de 4 a 8 aminoácidos y una cola hidrofóbica de 14 a 18 aminoácidos.

**Tabla 1.** Secuencias de AGPs clásicas que contienen una señal de anclaje de GPI.

CLONAS	SEÑAL DE ANCLAJE-GPI
C109. <i>Zea mays</i> <sup>c</sup>	TPRPAS ↓ S <u>PLTAPWRVTRRLAVAVTTALLWCQRSLASPPVAVVAKAWCARS</u> NQG6VL
AGPNa1. <i>Nicotiana glauca</i> <sup>b</sup>	PTSSPN ↓ AASLN <u>RVAVAGSAVVAIFAASLMF</u>
AGPc1. <i>Pyrus communis</i> <sup>b</sup>	DAIPPS ↓ GTS <u>AI SRVAIAGTALAGVFFAIVLA</u>
Ptx3H6. <i>Pinus taeda</i> <sup>c</sup>	SPSSVS ↓ GASVTS <u>LNLEKAAILTAALA</u> AVFFL
BnSta39-4. <i>Brassica napus</i> <sup>c</sup>	PEVLDG ↓ SATNV <u>KLSIAGTVA</u> AVGFFFSL
LeAGP1. <i>Lycopersicon esculentum</i> <sup>c</sup>	SLNDES ↓ GA <u>EKLKMLGSLVAGWAVMSWLLF</u>
pCK-H6. <i>Gossypium hirsutum</i> <sup>c</sup>	AGTDTs ↓ GANQM <u>WTVQKMMGLAMGWALLNL</u> AV
pPsENOD5. <i>Pisum sativum</i> <sup>c</sup>	S ↓ GAAAGHG <u>FIVLWGLASLPMLMFLIWL</u>
AtAGP1. <i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>c</sup>	PGPAQG ↓ GAVSN <u>KFASFGSVAVMLTAAVLVI</u>

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Donde: AtAGP1-5 . Obtenidas por ESTs

↓ Sitio de corte

<sup>b</sup> Confirmado experimentalmente

— Dominio Transmembranal

<sup>c</sup> Basado en proteínas codificadas por clonas de cDNA

Por otro lado, la proteína ZmRCP2 reportada en maíz tiene una alta homología (92%) con la secuencia de aminoácidos de otro marco de lectura de la clona C109 y con otras proteínas que codifican para plantas, pero no se conoce su función. El patrón de expresión de la proteína ZmRCP2 fue también detectado únicamente en la cofia. Con la obtención de la secuencia completa de la clona C109, se podrá verificar cual de las dos proteínas (AGP clásica o ZmRCP2) corresponde al mismo gen de la clona C109 o si solamente tiene homología entre alguna de ellas.

Los cDNAs de las clonas C106 y C123 son también secuencias parciales, tienen 452 pb y 428 pb respectivamente. La clona C106 codifica para GDP-D-manosa-4-6-dehidratasa y la clona C123 codifica para una proteína rica en glicina, casi idéntica a una proteína rica en glicina ya reportada llamada ZmGRP4 (Matsuyama *et al.*, 1999a). Para obtener las secuencias completas de estas clonas se realizó un tamizado del banco genómico de maíz del cual se obtuvieron una clona para C106 (ZmC106) y dos clonas para C123 (ZmC123).

La secuencia de aminoácidos de la clona ZmC106 presenta una alta identidad a la enzima GDP-D-manosa-4-6-deshidratasa de *Arabidopsis* (77%), *Escherichia coli* (57%), células HL-60 (55%) y cerebro de humano (54%). Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis de GDP-L-fucosa a partir de manosa (Bonin *et al.* 1997). La fucosa es el componente mayor del mucílago secretado por la cofia de maíz (Harris y Northcote, 1970).

La clona ZmC123 codifica para una proteína rica en glicinas llamada ZmGRP4 con 84% de identidad. Las proteínas ricas en glicinas son una clase de proteínas estructurales de la pared celular que juegan un papel importante en el desarrollo de tejido vascular (Cassab, 1998); su presencia en un tejido no vascular como lo es la cofia sugiere que las GRPs también participan en otros procesos de desarrollo.

TRABAJOS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **III.III. Localización de los RNAs mensajeros de las clonas ZmC109, ZmC123, ZmC106 y ZmC103 en la cofia.**

Utilizando la técnica de hibridación *in situ*, se analizó el nivel de expresión de estos genes en cortes de raíz de maíz variedad Merit. La sonda se sintetizó utilizando como templado las clonas de cDNA, con nucleótidos marcados con dioxigenina (Ponce *et al.*, 2000; ver Anexo I).

La expresión del RNA mensajero de la clona ZmC109 se restringe a las capas de la periferia de la cofia que incluye el 40% de las células de la cofia de maíz (Moore, 1984) (Figura 11A). Estas capas contienen las células que secretan mucílago. La señal de expresión de este gen es muy fuerte y también está presente en las células desprendidas de la cofia. Por otro lado, su patrón normal de expresión en cofias regeneradas después de la escisión de la cofia o ambas cofia y centro quiescente, se observó hasta que se distingue una cofia nueva (72 horas). Se sugiere que esta clona puede ser un marcador estructural de la cofia.

El RNA mensajero de la clona ZmC106 es detectado principalmente en la periferia de las células de la columela (Figura 11B). Esta expresión declina en las células que secretan mucílago. Al comparar las señales de los RNAs mensajeros de las clonas ZmC109 y ZmC106 en una sección transversal de la cofia, se observó que ambas señales se sobrelapan en dos capas externas de la cofia (dato no mostrado). Del mismo modo, el patrón de expresión de la clona C106 al igual que la clona C109 en cofias regeneradas, se observó hasta que la cofia está regenerada totalmente (48 horas) y se supone también que puede ser un marcador estructural.

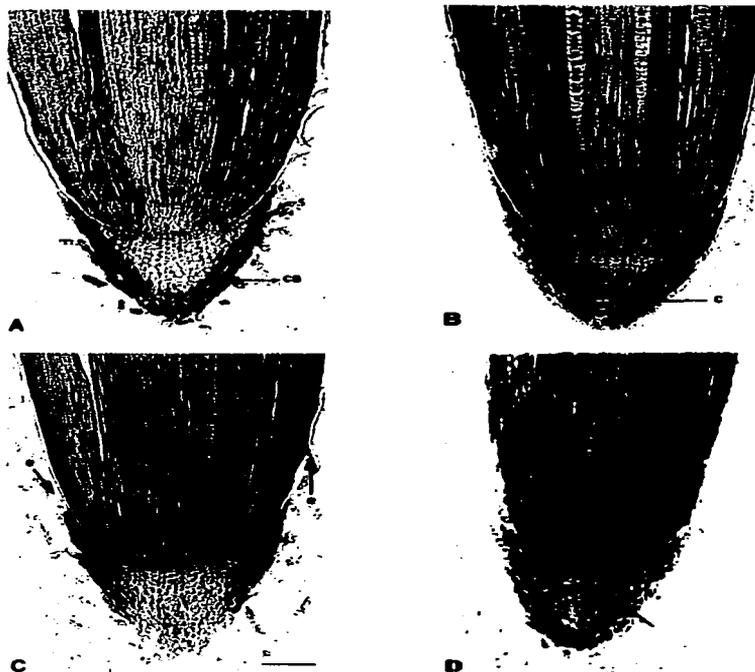
El RNA mensajero de la clona ZmC123 se observó en las células laterales de la cofia y en la epidermis de la raíz (Figura 11C), su localización sugiere una nueva función en el desarrollo de la raíz e indica una similitud entre la cofia lateral y la epidermis. Por otro lado, la cinética de expresión de esta

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

clona se observó muy temprano en el proceso de regeneración (24 horas) y en contraste con las clonas ZmC109 y ZmC106 se sugiere que puede ser un marcador posicional.

La localización del RNA mensajero de la clona ZmC103 mostró que tiene un patrón de expresión que se sobrelapa con algunas capas de la cofia donde tienen también su expresión las clonas ZmC109 y ZmC106 (Figura 11D). La expresión se observa principalmente en las capas más externas de la cofia.

TEXTO CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 11. Patrón de expresión de cuatro genes específicos de cofia: C109, C103, C106 y C123. A** La clona C109 se expresa en las capas de la periferia de la cofia, estas capas contienen las células que secretan mucílago. **B** La clona C106 se expresa en la periferia de las células de la columela. **C** La clona C123 se expresa en las células de la cofia lateral y en la epidermis de la raíz. **D** La clona C103 se sobrelapa con algunas capas de la cofia donde también se expresa las clonas C109 y C106.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **IV.- OBJETIVOS**

##### **OBJETIVO GENERAL:**

Aislamiento y caracterización molecular de tres genes de la cofia de la raíz de maíz.

##### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- a) Rastrear en un banco de DNA genómico de maíz las secuencias completas de las clonas C109 y T101T, utilizando el cDNA como sonda.
- b) Obtener la secuencia de la clona de cDNA C103 y la secuencia genómica de las clonas C109 y T101T por el método de Sanger.
- c) Verificar las secuencias obtenidas con las descritas en el banco de genes e inferir sobre sus posibles funciones en la cofia.

#### **V.- HIPÓTESIS**

Mediante la caracterización molecular de genes que se expresan en la cofia se podrá inferir o relacionar la función que dichos genes realizan en este tejido.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## VI.- MATERIALES y METODOS

**VI.I. Cepas bacterianas, vectores (plásmidos y bacteriófagos), marcadores de peso molecular para DNA, oligonucleótidos, soluciones amortiguadoras, medios de cultivo y antibióticos.**

### **Cepas bacterianas**

DH5 $\alpha$  : SupE44  $\Delta$ lac ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

XL1-Blue F' : ::Tn10proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>lac19D(lacZ)M15/recA1endA1gyrA96 (NaI<sup>r</sup>) thi hsdR17 (rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>) supE44 relA1 lac.

XL1-Blue MRA (P2):  $\Delta$  ( $\mu$ crA) 183  $\Delta$  (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac (P2 lysogen).

Las cepas DH5 $\alpha$  y XL1-Blue F' de *Escherichia coli* se utilizan rutinariamente para técnicas de biología molecular como la extracción y amplificación de plásmidos y para la producción de DNA para secuencia. La cepa XL1-Blue MRA (P2) se usa para la infección con bacteriófago  $\lambda$ . Los cultivos de estas cepas se llevaron a cabo a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) sólido o líquido según sea el caso.

### **Vectores (plásmidos y bacteriófagos)**

pGEM-1. Es un plásmido de 2,865 pares de bases derivado de pUC13. El sitio múltiple de clonación "polylinker" se encuentra flanqueado por los promotores Sp6 y T7. Se usa como un vector de clonación así como para la síntesis de RNA *in vitro*. El plásmido tiene un gen que confiere resistencia a ampicilina.

pBluescript SK<sup>+</sup>. Es un plásmido de 2,958 pares de bases derivado de pUC19. La designación de SK indica la orientación del "polylinker", siendo para SK<sup>+</sup> de *KpnI* a *SacI* y para SK<sup>-</sup> de *SacI* a *KpnI*. El "polylinker" tiene 21 sitios

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Únicos de enzimas de restricción, flanqueado por los promotores T3 y T7. Este vector puede ser usado para generar DNA de cadena sencilla en la presencia de fago ayudador (contiene F') y RNA *in vitro*. También tiene un gen que confiere resistencia a ampicilina.

$\lambda$  DASH II. Es un bacteriófago que contiene múltiples sitios de clonación (*Xba*I, *Sal*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I y *Xho*I) y es usado para clonar fragmentos grandes que van de 9 a 22 kilobases. El sitio policlonal está flanqueado por los promotores T3 y T7.

#### **Marcadores de peso molecular para DNA**

$\lambda$  *Hind*III (Boeringer-Manheim). Tamaños en pb 23130, 9416, 6557, 4361, 2332, 2027 y 564.

1Kb (Gibco). Tamaños en pb 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018 y 506.

#### **Oligonucleótidos**

Universales:

Oligo T3. 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

Oligo T7. 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Oligo Sp6. 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

Diseñados a partir de las secuencias de las clonas:

Oligo C109.1. 5'-CCATCTCATCTCAGTGAATC-3'

Oligo C109.251. 5'-CAGGGTGAGCTCCATGCGGT-3'

Oligo T101T.123. 5'-GCCGTGGAGAACCCGCCGCT-3'

Oligo T101T.147. 5'-GCGACGACGAACACCGGCAA-3'

Oligo T101T.179. 5'-GGTCAAACGCCATCGTCCTA-3'

Oligo T101T.532. 5'-TAGGCAATCTCCAGCAGGTC-3'

TRIPS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Soluciones amortiguadoras**

**Amortiguador TE.** Este amortiguador se utiliza para resuspender DNA. Consta de tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM pH 8.0.

**Amortiguador TBE.** Se usa como amortiguador de corrida en geles de agarosa o acrilamida. Para preparar el "stock" 10x se mezclan 108 g de tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en un litro de agua bidestilada.

**Amortiguador TAE.** Se usa también como amortiguador de corrida en geles de agarosa o acrilamida para análisis de DNA. Para preparar el "stock" 10x se mezclan 48.4 g de tris base, 11.42 mL de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en un litro de agua bidestilada.

**Amortiguador de carga.** Este amortiguador contiene azul de bromofenol 0.25%, xilen-cianol 0.25% y glicerol al 30% en agua bidestilada; se usa en la mezcla de DNA que va a ser analizada en un gel de agarosa. Para geles de agarosa con formaldehído consta de 50% de glicerol, 1mM de EDTA pH 8.0, azul de bromofenol 0.25% y xilen-cianol 0.25%

**Amortiguador SET.** Contiene 50mM de sacarosa, 25mM de Tris-HCl y 10mM de EDTA pH 8.0. Se usa para resuspender las minipreparaciones de DNA de plásmido.

**Amortiguador SM.** Es usado para resuspender fagos, su composición es 50mM de Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 8 mM de  $MgSO_4$  y 0.01% de gelatina.

TESTO CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Medios de cultivo (para crecimiento de *Escherichia coli*)**

### **Medios líquidos**

**Medio Luria-Bertani (LB).** A 950 mL de agua desionizada agregar 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g NaCl. Agitar hasta que los solutos se disuelvan. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1M y llevar a un volumen final de 1 L con agua desionizada. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 libras/pulgada<sup>2</sup> y guardar a temperatura ambiente.

En el caso de que las bacterias vayan a usarse para ser infectadas por fago lambda, añadir maltosa 0.2% (el receptor del fago en la membrana externa es una proteína inducida por maltosa; maltoporina) y 10 mM de MgSO<sub>4</sub> (el fago se estabiliza con magnesio).

**Medio 2xYT.** A 900 mL de agua desionizada agregar 16 g de bacto-triptona, 10 g de bacto-extracto de levadura y 5 g de NaCl. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M y llevar a un volumen final de 1 L con agua desionizada, Esterilizar en autoclave.

### **Medios Sólidos**

Al medio LB descrito arriba, agregar 15 g de bacto-agar. Esterilizar en autoclave. Dejar que el medio se enfríe hasta 50°C antes de agregar el antibiótico.

**Agarosa suave.** A 900 mL de agua desionizada agregar 10 g de bacto-triptona, 5 g de bacto-extracto de levadura, 5 g de NaCl y 6 g de agarosa. Ajustar a un volumen final de 1 L con agua desionizada. Esterilizar en autoclave. Cuando la solución se ha enfriado, agregar 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1M por cada 100 mL. Para transferir placas de lisis a filtros es mejor utilizar agarosa pues se pega menos a los filtros que el agar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Preparación de cajas: Vaciar 20 mL de medio a cada caja de petri de 90 mm. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente para que el agar solidifique. Almacenar a 4°C. Antes de usar, secarlas en una campana de flujo laminar (dejando las tapas entreabiertas) durante 20 minutos.

### **Antibióticos**

Las siguientes soluciones de antibióticos se preparan como soluciones "stock" 1000x y se almacenan a -20°C. Se añaden al medio una vez que el medio esterilizado al autoclave se ha enfriado:

Ampicilina (10 mg/mL). Disolver 50 mg en 5 mL de agua bidestilada. La concentración de la solución de trabajo es de 100 µg/mL.

Tetraciclina (12.5 mg/mL). Disolver 12.5 mg en 1 mL de etanol. La concentración de la solución de trabajo es de 12.5 µg/mL.

Kanamicina (50 mg/mL). Disolver 50 mg en 5 mL de agua bidestilada. La concentración de la solución de trabajo es de 25 µg/mL.

PREPARADO CON  
FALSA DE ORIGEN

## VI.II. Aislamiento de DNA

- Purificación de plásmidos en *Escherichia coli* (Rodriguez y Tait, 1983). Inocular una colonia bacteriana transformada en 3 mL de medio LB líquido con antibiótico durante toda la noche a 37°C y 250 rpm. Transferir el cultivo a un tubo eppendorf de 1.5 mL y centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1 mL de amortiguador SET mediante agitación con vortex por 1 minuto. Centrifugar las células durante 5 minutos a 12,000 rpm y resuspender en 150 µL de amortiguador SET. Agregar 5 µL de RNAsa (ribonucleasa pancreática A, 10 mg/mL) y 350 µL de mezcla lítica (solución 1:1, NaOH 0.4 M y SDS al 2%). Agitar por inversión el tubo e incubar en hielo durante 10 minutos. Agregar 250 µL de NaAc 3M pH 5.2 y continuar con la incubación en hielo durante 1 hora. Centrifugar 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C y separar el sobrenadante. Agregar un volumen de isopropanol para precipitar el DNA y centrifugar 15 minutos a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, desechar el sobrenadante y secar el tubo 10 minutos a temperatura ambiente. Resuspender en 300 µL de agua bidestilada y agregar un volumen de fenol y otro de cloroformo, agitar con vórtex y centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm. Pasar el sobrenadante a otro tubo y agregarle 1/2 volumen de NH<sub>4</sub>Ac 7.5M y un volumen de isopropanol para precipitar el DNA y centrifugar nuevamente. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL etanol al 70%. Secar la pastilla y resuspender en 50 µL de agua bidestilada. Tomar 5 µL de DNA para realizar digestiones con enzimas de restricción.

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

### **VI.III. Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Se utilizan los amortiguadores adecuados para cada enzima, la temperatura de reacción para todas las enzimas es de 37°C y las unidades de actividad definidas por los fabricantes es 1 unidad de enzima por 1 µg de DNA en un intervalo de 1 a 3 horas. En el caso de una digestión doble se usa el amortiguador más adecuado para ambas, primero se digiere el DNA con una enzima, se extrae con fenol y cloroformo con el fin de desactivar a la enzima, luego se precipita el DNA con isopropanol y NH<sub>4</sub>Ac 7.5 M y se digiere con la otra enzima. Las digestiones se inactivan a 65°C por 10 minutos o mediante extracción con fenol y cloroformo. Al final los productos de las digestiones se analizan en geles de agarosa.

### **VI.IV. Electroforesis de DNA**

Electroforesis en gel de agarosa. La técnica para preparación de geles de agarosa es la descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido de 0.4 a 1 Kb de tamaño se utilizan geles horizontales de agarosa al 1.2% (las concentraciones de agarosa puede variar de 1 a 1.5% según el tamaño del fragmento), estos geles se corren a un voltaje de 90 a 150 volts usando el amortiguador TBE 1x y 2 µL de amortiguador de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen-cianol y glicerol al 30% en agua bidestilada), por cada 10 µL de DNA. Después de correr los geles se sumergen en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 1 minuto. El gel se enjuagua en agua para remover el exceso de bromuro de etidio y al final se observa en el transiluminador de luz ultravioleta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **VI.V. Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

- **Purificación con polvo de vidrio utilizando el kit "Gen clean"**

Cortar la banda de interés del gel de agarosa. Para disolver la agarosa agregar 3 volúmenes de NaI e incubar 5 minutos entre 45° y 55°C. Agregar 5 µL de polvo de vidrio. Mezclar suavemente e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 30 segundos a 12,000 rpm y eliminar el sobrenadante. Lavar la pastilla 3 veces con 500 µL de solución "New Wash" (14 mL de "new" concentrado en 280 mL de agua bidestilada y 310 mL de etanol al 100%) a -20°C y centrifugar por 30 segundos. Eluir el DNA resuspendiendo la pastilla con 15 µL de agua bidestilada (2 veces, queda un volumen final de 30 µL) e incubar 5 minutos entre 55° y 60°C. Analizar la concentración del DNA con 2 µL en un gel de agarosa al 1.0%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **VI.VI. Subclonado de fragmentos de DNA con extremos cohesivos**

### **• Preparación de los vectores de clonación**

Digerir el plásmido Bluescript SK+ (Stratagene) con diferentes enzimas de restricción para linearizar sus extremos, en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Para evitar que durante la ligación se liguen los extremos del vector entre si mismos, tratar con fosfatasa alcalina para remover los grupos fosfato de los extremos 5'. De esta manera, después de las digestiones con las enzimas de restricción extraer con fenol y cloroformo para inactivar la enzima, después ajustar el volumen del amortiguador de la fosfatasa alcalina (10x: Tris-HCl 0.5mol/L, EDTA 1mmol/L pH 8.5) adicionando 1  $\mu\text{L}$  de dicha enzima, incubar a 37°C durante 1 hora. Al final de la desfosforilación, extraer con fenol y cloroformo, precipitar el DNA con 1 volumen de isopropanol y 1/2 de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  7.5M.

### **• Preparación de los fragmentos de clonación**

Los fragmentos de DNA obtenidos de las digestiones hechas con diferentes enzimas de restricción se analizan en un gel de agarosa al 1.0%. La bandas esperadas se cortan con una navaja y se purifican con polvo de vidrio con el kit de "geneclean".

### **• Ligación**

Las condiciones de ligación fueron las siguientes: relación molar 1:3 de vector e inserto (100 ng de vector por 300 ng de inserto), 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador de ligasa 5x, 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa y agua hasta un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , la reacción se dejó a temperatura ambiente toda la noche. Las transformaciones se llevaron a cabo por choque térmico utilizando todo ó 10 $\mu\text{L}$  de esta reacción.

TRABAJOS CON  
SERIE A DE ORIGEN

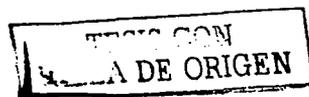
## **VI.VII. Preparación de células de *Escherichia coli* competentes para transformación con plásmidos y métodos de transformación**

### **• Preparación de células competentes**

Inocular 25 mL de medio LB líquido con una colonia de la cepa deseada (JM101 o XL1-Blue) e incubar toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm. Dividir el cultivo en dos matraces Fernback de 2.8 L que contengan 250 mL de LB líquido. Crecer a 37°C y a 250 rpm hasta una densidad óptica de aproximadamente 0.6 de absorbancia a 560 nm. Transferir el cultivo en 2 botellas de centrifuga estériles mantenidas en hielo. Centrifugar a 7,000 rpm por 5 minutos a 4°C y desechar el sobrenadante. Resuspender las células de cada botella con 100 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M (frío) por agitación con vortex e incubar en hielo durante 4 horas. Centrifugar a 5,000 rpm por 5 minutos a 4°C y decantar. Resuspender la pastilla celular en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M y 15% de glicerol frío con agitación suave. Incubar toda la noche en hielo. Al día siguiente alicuotar 200 µL en tubos eppendorf de 0.5 mL sobre hielo y congelar a -70°C.

### **• Método de transformación**

Tomar un tubo de células competentes y descongelarlas lentamente sobre hielo. Una vez descongeladas agregarle 1 ng de DNA ó 20-25 ng de mezcla de ligación e incubar en hielo durante media hora. Agitar el tubo por lo menos cada diez minutos. Dar choque térmico durante 5 minutos a 37°C y regresar al hielo por 5 minutos más. Pasar las células transformadas a tubos de ensayo de 13x100 mm con 1 mL de medio LB líquido e incubar durante 1 hora a 37°C y 250 rpm para que se recuperen las células. Platear 100 µL en medio selectivo con antibiótico y dejar crecer toda la noche a 37°C. Si es mezcla de ligación platear toda la reacción después de concentrarla.



#### **VI.VIII. Preparación de sondas radiactivas de DNA**

Se utilizó el estuche comercial Multiprime Labelling System (Amersham Life Science). Para cada reacción se utilizaron entre 2 y 25 ng de DNA. Diluir el DNA en 10  $\mu\text{L}$  de agua y calentar 5 minutos entre 95 y 100°C para desnaturalizar. Poner en hielo. Agregar 4  $\mu\text{L}$  de los dNTPs (dGTP, dTTP, dATP), 5  $\mu\text{L}$  de buffer, 5  $\mu\text{L}$  primer, 5  $\mu\text{L}$  [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP y 2  $\mu\text{L}$  de enzima klenow. Llevar a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con agua bidestilada. Mezclar e incubar 2 horas a 37°C. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm y resuspender la pastilla con 150  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M. Agregar al tubo de hibridación.

#### **VI.IX. Tamizado de la genoteca genómica de maíz**

El banco genómico de *Zea mays* fue proporcionado por el Doctor Jorge Nieto Sotelo del Instituto de Biotecnología-UNAM Este banco se construyó a partir de fragmentos de DNA genómico de maíz generados por digestión con la enzima *Sau3AI* y clonados al vector  $\lambda\text{DASHII}$  entre los sitios de *BamHI* (Nieto *et al.*, 1999).

- **Titulación de la genoteca genómica**

Para realizar el tamizado se infectaron 100  $\mu\text{L}$  de células XL1-Blue MRA P2 suplementado con  $\text{MgSO}_4$  1M y maltosa 20%, ( $A_{600}=0.6-0.8$ ) con 100  $\mu\text{L}$  de fagos a  $2.5 \times 10^9$  pfu/mL durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se les adicionaron 3 mL de agarosa suave (baño maria a 47°C) y se vertieron sobre cajas petri que se incubaron a 37°C durante 16 horas. Después de la incubación se dejaron las cajas a 4°C para usarlas en la transferencia.

- **Transferencia de placas a filtros de membrana "nylon"**

Las placas de lisis generadas se transfirieron, por duplicado, a membranas de "nylon" con un tiempo de 2 y 4 minutos, respectivamente. Primero se selecciona el tamaño correcto de la membrana para ponerla en la superficie de agarosa suave por 2 minutos (4 minutos para replicas). Posteriormente,

cada membrana se trata durante 1 minuto con la solución de desnaturalización (1.5 M NaCl + 0.5 M NaOH), seguidos de 1 minuto de solución de neutralización (1.5 M NaCl + 1 M Tris-HCl pH 8.0 ) y 1 minuto en la solución de lavado 2xSSPE (NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, y EDTA pH de 7.4). Por último, el DNA de las placas de lisis se fija a la membrana con luz ultravioleta (0.12 julios de luz de 254 nm).

- **Hibridación**

Después de la transferencia, el filtro se prehibrida en un tubo de hibridación por lo menos 30 minutos a 65°C con una solución preparada con: 2.25 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2M pH 7.2, 10.5 mL de SDS 10% y 2.25 mL de agua. El filtro prehibridado se hibrida con la sonda marcada con [<sup>32</sup>P] dCTP adicionandola al tubo de hibridación donde se continua la incubación a 65°C aproximadamente por 2 horas. Una vez terminada la hibridación se decanta la solución en desecho radioactivo y se lava a diferentes grados de astringencia (2xSSPE/0.1% SDS, 1xSSPE/0.1% SDS y 0.1xSSPE/0.1% SDS) incubando 15 minutos a 65°C en el horno de hibridación. Se expone el filtro a un film X-OMAT de Kodak (20.3x25.4 cm) durante el tiempo necesario a -70°C.

- **Amplificación y purificación de DNA de fago**

Tomar con una pipeta pasteur (extremo angosto), una placa que coincida con la hibridación de la clona positiva y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 100 µL de buffer SM. Guardar a 4°C durante toda la noche. Por otro lado, poner un cultivo de la cepa XL1-Blue MRA (P2) en 5 mL de LB líquido con 50 µL de MgSO<sub>4</sub> 1M y 50 µL de maltosa 20%, a 37°C durante toda la noche. Para absorber el fago con la bacteria agregar 500 µL del cultivo anterior al tubo que contiene la placa de fago e incubar a 37°C por 20 minutos. Agregar la incubación anterior a 100 mL de LB líquido (previamente a 37°C) suplementado con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1M en una matraz de 250 mL e incubar a 300 rpm a 37°C para que ocurra la lisis. Al finalizar la lisis adicionar 500 µL

de cloroformo y centrifugar el cultivo a 10,000 rpm en el rotor JA20 10 minutos a 4°C y recuperar el sobrenadante. El sobrenadante (lisado) se centrifuga en el rotor 60Ti a 30,000 K a 4°C durante 1 hora. Resuspender la pastilla obtenida en 2.5 mL de amortiguador SM y añadir RNAsa a 20 µg/mL y DNAsa 5µg/mL, incubar a 37°C por 30 minutos. Después de la incubación agregar 2.5 mL de Tris-HCl 0.3M, EDTA 100mM, SDS 1.25% pH 9 (Tris 1 M 0.75 mL, EDTA 0.5 M 0.5 mL, SDS 10% 0.312 mL y agua 0.937 mL) e incubar a 65°C por 10 minutos más. Añadir a la incubación anterior 2.5 mL de AcONa 3M pH 4.8 e incubar en hielo 10 minutos. Centrifugar y tomar el sobrenadante cuidando de no llevar el material floculado. Para precipitar la mezcla agregar 5 mL de isopropanol. Después de 15 minutos sobre hielo, centrifugar a 12,000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Lavar la pastilla obtenida con etanol al 70%, secar y resuspender en 500 µL de TE. Posteriormente extraer la muestra con fenol-cloroformo y resuspender la pastilla con 100 µL de TE. Por último, corroborar la concentración del DNA en un gel de agarosa al 1.0% para el Southern blot.

TRIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **VI.X. Southern Blots**

**(Transferencia de DNA desde geles a filtros de membrana)**

- **Tratamiento del gel de agarosa**

Para transferir fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se trata el gel antes de la desnaturalización dos veces 15 minutos con HCl 0.2 M (el azul de bromofenol debe volverse amarillo). Ello produce depurinación parcial y, durante el tratamiento alcalino, fragmentación. Para que se una el DNA al filtro de membrana "nylon" hay que desnaturalizarlo incubando dos veces 15 minutos con 500 mL de 1.5 M NaCl + 0.5 M NaOH y luego se neutraliza incubando 20 minutos con 500 mL 1.5 M NaCl + 1 M Tris-HCl pH 8.0 y 20 minutos con 20x SSPE. Las incubaciones se realizan con agitación. Este tratamiento elimina la tinción con bromuro de etidio por lo que ya no puede seguirse viendo el DNA con luz ultravioleta. Por tanto debe hacerse una foto del gel teñido antes de la transferencia, poniendo una regla graduada para identificar la posición del principio, la del final y la de los marcadores.

- **Transferencia del DNA al filtro de membrana "nylon"**

Para transferencia por capilaridad, colocar el gel encima del papel filtro Whatman 3MM que este comunicado con el líquido de transferencia (20x SSPE). El papel está sobre un vidrio apoyado en los bordes de la cámara y cubierto con tiras de papel que descienden y comunican con el líquido. Eliminar burbujas atrapadas entre el papel de filtro y el gel rodando un tubo horizontal y poner tiras de plástico (Saran Wrap, parafilm) en los bordes del gel para evitar que el líquido circule por la periferia. Colocar encima un trozo de filtro de membrana cortado del mismo tamaño que el gel y previamente mojado con 20x SSPE. Nuevamente eliminar burbujas atrapadas entre el gel y el filtro de membrana rodando un tubo de vidrio por encima. Colocar encima 2 trozos de papel de filtro mojados en 20x SSPE y cortados al mismo tamaño del gel. Poner encima servilletas de papel secas cortadas del mismo tamaño del gel y formando una pila de unos 7 cm. Al finar colocar una placa de vidrio

de las mismas dimensiones que lo anterior y con un peso de alrededor de 250 gr. Dejar la transferencia de 8 a 16 horas.

• **Fijación del filtro de membrana "nylon" con luz ultravioleta**

Lavar el filtro de "nylon" con 1x SSPE para quitarle restos de agarosa adheridos y cristales de sal. Fijar covalentemente el DNA al "nylon" iluminando con luz ultravioleta (0.12 julios de luz de 254 nm).

Guardar el filtro a 4°C hasta la hibridación con una sonda marcada radioactivamente con <sup>32</sup>P.

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **VI.XI. Preparación de DNA de cadena sencilla**

Partir de un cultivo de 3 mL de LB con antibiótico (Amp. 100 µg/mL y Tc 12.5 µg/mL) de una colonia bacteriana transformada en XL1-Blue. Al día siguiente, inocular en 3 mL de medio 2xYT líquido con antibiótico 300 µL del cultivo anterior ( $7.5 \times 10^8$  cel.). Incubar 30 minutos a 37°C con agitación en un matraz estéril de 50 mL y añadir el fago ayudador M13VCS (DO<sub>600</sub> 0.3 ó  $2.5 \times 10^8$  bacterias/mL) teniendo una relación de 20:1 (fago-células). Continuar la incubación a 37°C con agitación por 8 horas. Centrifugar el medio por 15 minutos a 13,000 rpm y transferir el sobrenadante a tres tubos eppendorf (1 mL c/u) cuidando de no transferir células. Añadir a cada tubo 250 µL (1/4 vol) de solución con NH<sub>4</sub>Ac 3.5 M, pH 7.5 20% y PEG al 20%. Mezclar los tubos por inversión y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos y centrifugar por 20 minutos a 12,000 rpm en una microfuga descartando el sobrenadante. Centrifugar otros 2 minutos y volver a eliminar el sobrenadante. Resuspender la pastilla con 100 µL de amortiguador TE agitando en vortex y pasar a un solo tubo. Tratar con 500 µL de fenol-cloroformo-isoamílico, transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y extraer con 500 µL de cloroformo isoamílico, transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Precipitar el DNA añadiendo un volumen igual de NH<sub>4</sub>Ac 7.5M y 2 volúmenes de etanol al 100%. Poner sobre hielo por 15 minutos y centrifugar por 20 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70%. Secar y disolver la pastilla con 30 µL de agua bidestilada. Comprobar la concentración analizando 1 µL de DNA en un gel de agarosa al 1.0%. Guardar a a -20°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **VI.XII. Secuenciación de DNA.**

La secuenciación de DNA se llevó a cabo utilizando el método de dideoxinucleótidos terminadores de la síntesis de cadena (Sanger *et al.*, 1977) utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7, así como oligonucleótidos específicos para las clonas. También fueron secuenciados algunos fragmentos de DNA mediante un secuenciador automático (Servicio de Secuenciación Fluorescente Automatizada del IBT), por el método de Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing y un secuenciador modelo 377-18 marca Perkin Elmer/Applied Biosystems.

### **Desnaturalización y alineamiento del templado y el primer**

Agregar a 5 µg de DNA de cadena doble, 0.1 volumen de NaOH 2M y 0.1 volumen de EDTA 2mM e incubar a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente neutralizar la mezcla con 0.1 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y precipitar con 2-4 volúmenes de etanol absoluto frío a -70°C por 15 minutos. Centrifugar por 20 minutos y desechar el sobrenadante. Lavar la pastilla con etanol al 70% y resuspender en 7 µL con agua destilada. Para alinear el templado con el primer añadir 2 µL de amortiguador de reacción de secuencia y 1 µL del primer deseado.

### **Reacción de marcaje**

Calentar la mezcla de alineamiento por 2 minutos a 65°C y enfriar lentamente durante 15 minutos hasta alcanzar una temperatura menor a 35°C. Centrifugar brevemente la mezcla en una picofuga y ponerla sobre hielo, agregar 1 µL de DTT 0.1 M, 2 µL de la mezcla diluida de marcaje, 0.5 µL ([<sup>35</sup>S] dATP) y 2 µL de polimerasa diluida. Mezclar la reacción e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

CON  
FUELLA DE ORIGEN

### **Reacción de terminación**

La reacción de marcaje se detiene con la mezcla de terminación. Para ello, debemos transferir 3.5  $\mu\text{L}$  de la reacción de marcaje a cada tubo eppendorf que contenga 2.5  $\mu\text{L}$  de cada dNTP (G, A, T y C), mezclar e incubar a 37°C por 5 minutos. Después de la incubación agregar a la reacción 4  $\mu\text{L}$  de solución "stop" y guardar a -20°C. Antes de correr las muestras en el gel de secuenciación, calentar las reacciones a 75°C por 2 minutos y cargar 3  $\mu\text{L}$  de la reacción. Correr las muestras a 35 ó 40 watts y 2000 volts.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **VI.XIII. Análisis comparativo de las secuencias**

El análisis consiste en buscar en bases de secuencias (reservorios de información donde se concentran todos los resultados de diferentes laboratorios) parámetros para decidir si la secuencia analizada es lo suficientemente parecida. Dentro de la información que se presenta, se encuentra el nombre y el número de acceso de cada secuencia, y es necesario identificar cuales de los fragmentos similares corresponden a una fase de lectura abierta y cuales son secuencias no codificadoras.

Los programas que se utilizaron son:

- **GCG (Genetics Computer Group)** también llamado Wisconsin, es un paquete integrado de más de 130 programas que permiten la manipulación y análisis de secuencias de nucleótidos y proteínas.  
dirección: <http://GCG.ceingebi.unam.mx/gcg-bin/seqweb.cgi>
- **BLAST**. Localiza secuencias similares a un patrón en una base de secuencias existentes. La secuencia patrón puede ser de nucleótidos o de proteína. Este programa puede utilizar diferentes tablas de calificación de similaridad entre aminoácidos, con lo cual se adquiere mayor precisión.  
dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
- **FASTA**. También realiza búsqueda de secuencias similares entre un patrón y una base de secuencias. Para la búsqueda en bases de secuencias, Fasta es más sensible que Blast. Este programa se puede usar solamente para nucleótidos.  
dirección: <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>
- **PLACE**. Base de secuencias nucleotídicas que identifica elementos de DNA regulatorios en plantas.  
dirección: <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>

El análisis comparativo de las secuencias con programas de secuenciación genómica de otras especies, se llevó a cabo con las siguientes direcciones

- arroz: <http://www.rice-research.org/> y <http://www.tmri.org/>
- arabidopsis: <http://www.arabidopsis.org/home.html>

## VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.I. Tamizado de un banco genómico de maíz.

Para obtener la secuencia completa de las clonas de cDNA C109 y T101T, se realizó un tamizado del banco genómico  $\lambda$  DASH II que fue construido con DNA de maíz (Nieto *et al.*, 1999). De acuerdo al tamaño del genoma haploide de  $3 \times 10^6$  Kb del maíz se tamizaron 1,380,000 pfu en un total de 28 cajas petri (150 x 15 mm) con 50,000 pfu cada una. Como sonda para el tamizado, se utilizaron diferentes fragmentos de las secuencias de las clonas de cDNA (Figura 12).

Se obtuvieron 10 clonas positivas utilizando una sonda a partir del 3' del cDNA de la clona C109. Para caracterizar los insertos contenidos en estas clonas se realizó un análisis del patrón de restricción con diferentes enzimas que mostró el mismo patrón de restricción para las 10 clonas. Para identificar cuales de los fragmentos de restricción corresponden a la secuencia de la clona de cDNA C109 se realizó un análisis tipo Southern usando la misma sonda 3' usada en el tamizado. La sonda hibridó con 2 fragmentos *EcoRI/ClaI* de aproximadamente 5 Kb y 2 Kb respectivamente. Dado que estos fragmentos son comunes en las 10 clonas, para los siguientes estudios seleccionamos únicamente una clona a la que denominamos C109.10. Los fragmentos de 5 Kb y 2Kb de la clona C109.10 fueron secuenciados parcialmente con los oligos T7 y T3. El análisis por BLAST mostró que las secuencias de ambos fragmentos si tienen homología con la clona de cDNA C109, pero no tienen la secuencia que corresponde al extremo 5' que contiene el codón de inicio. Para encontrar la secuencia del extremo 5' de la clona C109 se hizo un nuevo tamizado, pero ahora utilizando una sonda 5' de la clona de cDNA C109 (ver figura 12). Se obtuvieron tres clonas positivas. Los fragmentos de interés de estas clonas se determinaron analizando su patrón de restricción y por medio de un análisis tipo Southern. El análisis mostró que las tres clonas positivas tienen el mismo patrón de restricción e

TRIPES CON  
FALLA DE ORIGEN

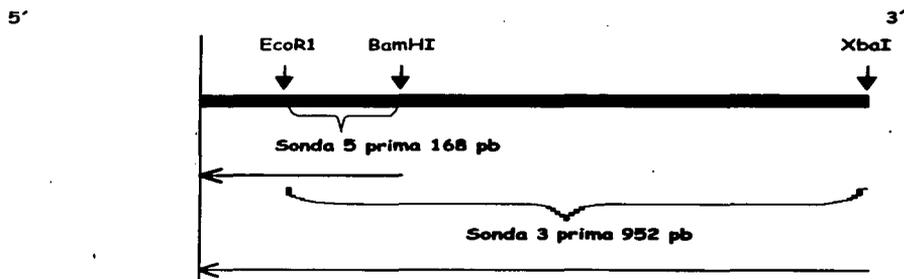
hibridación. De tal manera que sólo nos enfocaremos a una de ellas, la llamada C109.II.3. Para determinar si ésta última clona tiene la secuencia completa, se realizó otro tamizado usando ambas sondas; las sondas 3' y 5' de la clona de cDNA C109 utilizadas en los tamizados anteriores. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos; las clonas positivas para la sonda 3' los son también para la sonda 5', de esto podemos concluir que estas clonas tienen la secuencia completa.

Por otro lado, se obtuvieron del tamizado con la sondas del cDNA de la clona T101T (Figura 12), cinco clonas (las clonas positivas para la sonda 3' son positivas también para la sonda 5'). Determinamos su patrón de restricción y por un análisis tipo Southern se identificó cuales de los fragmentos de restricción corresponden a la secuencia de la clona del cDNA T101T. El análisis mostró que las cinco clonas tienen fragmentos diferentes y que dos de ellas se obtuvieron de placas de fago falsos positivos ya que no hibridaron los DNAs en el Southern blot. De tal manera, sólo nos enfocaremos a tres de las cinco clonas y las llamaremos T101T.1, T101T.2V y T101T.500. En las figuras 14, 15 y 16 se muestran los tamizados obtenidos de las tres clonas seleccionadas.

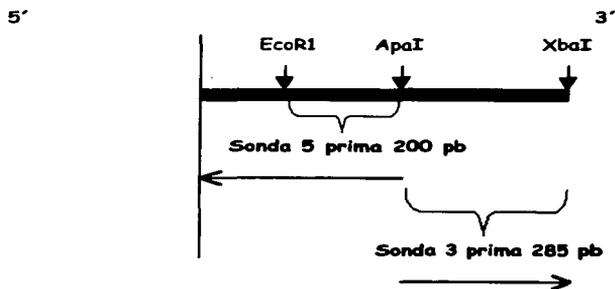
En el caso de la clona de cDNA denominada C103 no fue necesario hacer un tamizado del banco genómico para obtener su secuencia completa. La secuencia parcial del inserto de esta clona con los oligonucleótidos Sp6 y T7 mostró que en el extremo 5' se encuentra el codón de inicio y en el extremo 3' el codón de término, por lo que se concluyó que esta clona de cDNA estaba completa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**A Clona de cDNA C109**



**B Clona de cDNA T101T**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 12.** Mapa de restricción de las clonas de cDNA denominadas C109 y T101T. Las flechas representan la estrategia de secuenciación de los genes ZmC109 y ZmT101T utilizando diferentes oligonucleótidos y la ubicación de la sonda utilizada en el tamizado.

**Clona C109.II.3**

**1er tamizado**



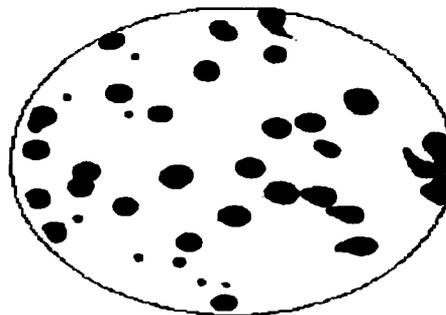
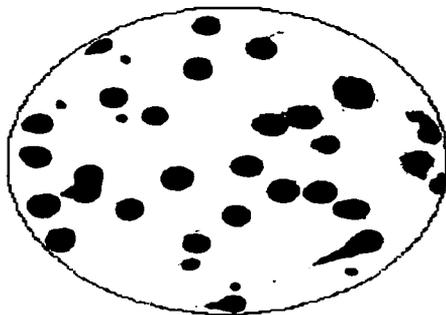
**TRIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**2er tamizado**

**Sonda 3 prima**

**Réplica**

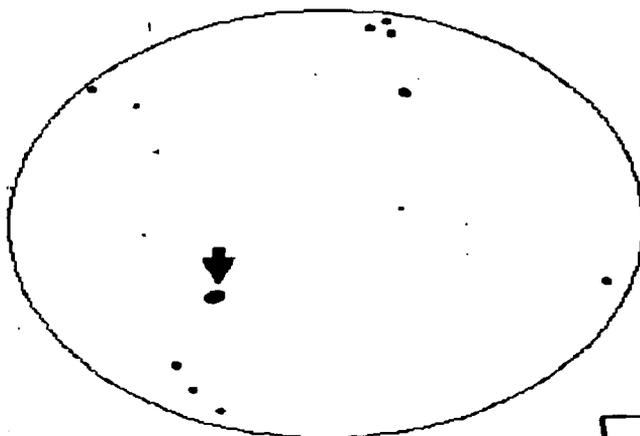
**Sonda 5 prima**



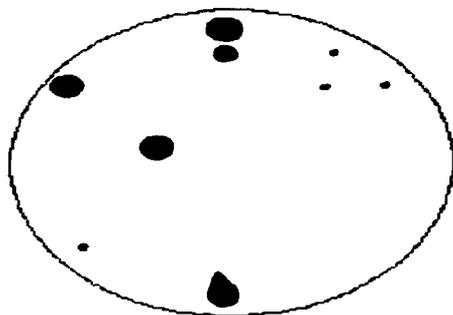
**Figura 13.** Tamizado de la genoteca genómica de maíz. Se hibridaron 1,380,000 pfu contra diferentes fragmentos de la secuencia de la clona de cDNA C109 marcados radioactivamente con [<sup>32</sup>P] dCTP. El lavado de alta astringencia fue a 65°C, con SSC 0.1x /SDS 0.1%. En el 1er tamizado fueron aisladas tres clonas positivas. Se muestra el filtro positivo para la clona C109.II.3 (la flecha indica la señal positiva) de la cual se obtuvieron placas puras hasta el 3er tamizado.

Clona T101T.1

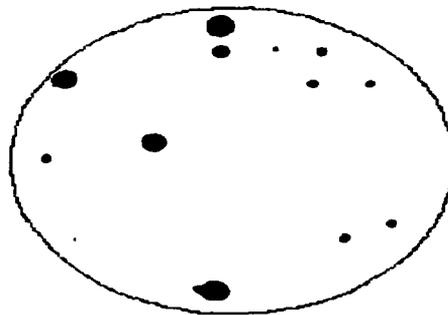
1er tamizado



4to tamizado



Réplica

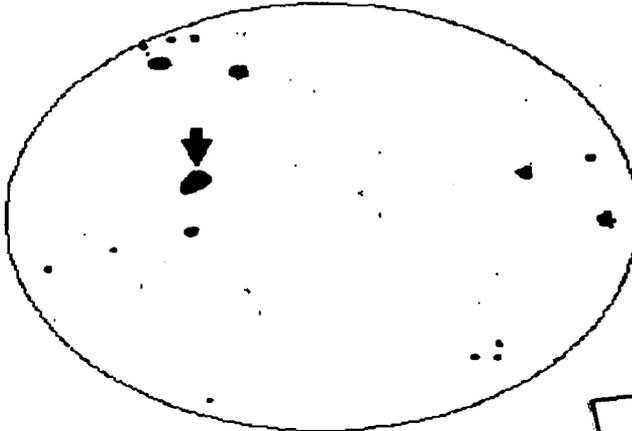


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

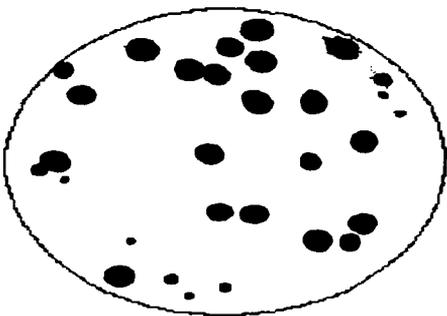
Figura 14. Tamizado de la genoteca genómica de maíz. Se hibridaron 1,380,000 pfu contra la secuencia de la clona de cDNA T101T marcada radioactivamente con [ $^{32}$ P] dCTP. El lavado de alta astringencia fue a 65°C, con SSC 0.1x /SDS 0.1%. En el 1er tamizado fueron aisladas cinco clonas positivas. Se muestra el filtro positivo para la clona T101T.1 (la flecha indica la señal positiva) de la cual se obtuvieron placas puras hasta el 4º tamizado.

**Clon T101T.2V**

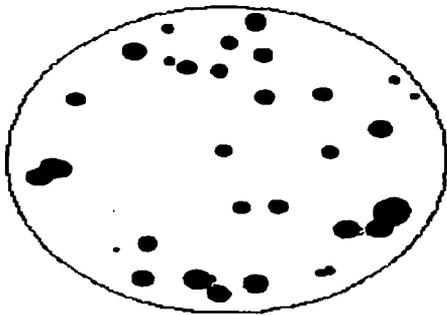
**1er tamizado**



**2er tamizado**



**Réplica**

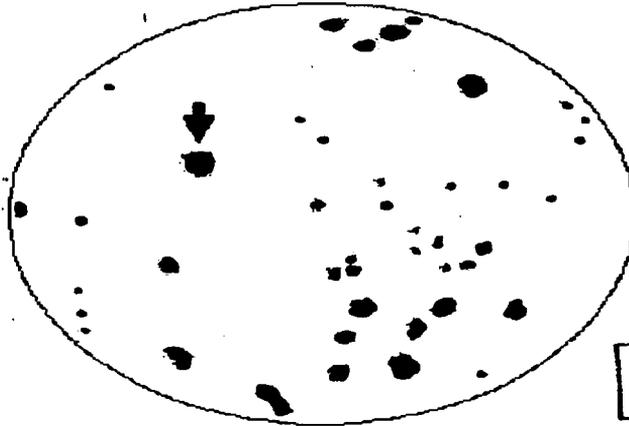


**TESTS CON FALLA DE ORIGEN**

**Figura 15.** Tamizado de la genoteca genómica de maíz. Se hibridaron 1,380,000 pfu contra la secuencia de la clona de cDNA T101T marcada radioactivamente con [<sup>32</sup>P] dCTP. El lavado de alta astringencia fue a 65°C, con SSC 0.1x /SDS 0.1%. En el 1er tamizado fueron aisladas cinco clonas positivas. Se muestra el filtro positivo para la clona T101T.2V (la flecha indica la señal positiva) de la cual se obtuvieron placas puras hasta el 3er tamizado.

Clona T101T.500

1er tamizado



TRUCIE CON  
FOLLA DE ORIGEN

3er tamizado

Réplica

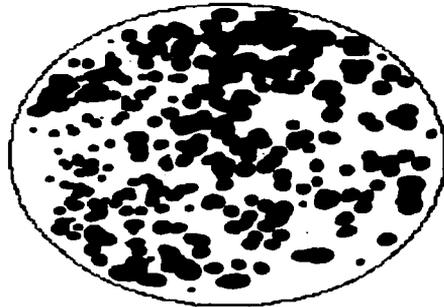
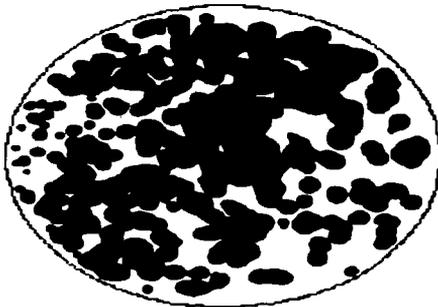


Figura 16. Tamizado de la genoteca genómica de maíz. Se hibridaron 1,380,000 pfu contra la secuencia de la clona de cDNA T101T marcada radioactivamente con [ $^{32}$ P] dCTP. El lavado de alta astringencia fue a 65°C, con SSC 0.1x /SDS 0.1%. En el 1er tamizado fueron aisladas cinco clonas positivas. Se muestra el filtro positivo para la clona T101T.500 (la flecha indica la señal positiva) de la cual se obtuvieron placas puras hasta el 3er tamizado.

## VII.II. Análisis del patrón de restricción de las clonas genómicas obtenidas.

Para caracterizar los insertos contenidos en las clonas positivas C109.II.3, T101T.1, T101T.2V y T101T.500, se realizó un análisis del patrón de restricción, que consistió en digerir las clonas utilizando diferentes enzimas con el objeto de encontrar una enzima que digiera el DNA en varios fragmentos favoreciendo el análisis de secuenciación por subclonación. Se eligieron enzimas de restricción que cortaban en sitios internos de la secuencia de nucleótidos de los cDNAs. Las enzimas utilizadas fueron: *ApaI*, *BamHI*, *BstXI*, *ClaI*, *EcoRI*, *NcoI*, *PstI*, *SalI* y *XhoI*. La digestiones de las clonas presentaron un patrón de restricción diferente.

En la figura 17A se muestran los resultados obtenidos de la clona C109.II.3. De las digestiones obtenidas únicamente *ApaI/BstXI* (carril 2), *ApaI/NcoI* (carril 3) y *PstI/BstXI* (carril 4) liberaron un inserto de aproximadamente 1.1.Kb que corresponde al tamaño esperado.

Del mismo modo, en la figura 18A se muestran las digestiones de las clonas T101T.1, T101T.2V y T101T.500, el resultado mostró un patrón de restricción similar para las clonas, a pesar de que existen diferencias en el tamaño de los insertos. Las clonas fueron digeridas con *ApaI* ya que con esta enzima se libera el inserto del cDNA en dos fragmentos, lo que facilitaría la localización de la secuencia que contiene el codón de inicio. Los fragmentos liberados con la digestión *ApaI* tienen un tamaño aproximado de 3.0 Kb y 300 pb (carriles 3, 10 y 16), al parecer alguno de estos fragmentos corresponden a la secuencia completa de la clona de cDNA T101T.

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, se confirmó el tamaño del fragmento de la clona de cDNA C103 con una doble digestión *EcoRI/XbaI* (dato no mostrado), se eligieron estas enzimas ya que los sitios de restricción respectivos se encuentran flanqueando al inserto de la clona en el plásmido pGEM-1 (contenido en el bacteriofago  $\lambda$  GEM-4). El fragmento liberado es de aproximadamente 1.5 Kb y fue clonado en el plásmido Bluescript SK+/SK-. Posteriormente se obtuvo la secuencia de DNA de cadena sencilla con el fago ayudador M13VCS.

Para identificar cuales de los fragmentos de restricción corresponden a la secuencia del gen completo se realizó un análisis tipo Southern; los resultados se describen a continuación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **VII.III. Análisis por Southern blot de las clonas genómicas.**

Se realizó un Southern blot de las clonas positivas digeridas con diferentes enzimas para identificar cuales de los fragmentos de restricción hibridaban con la sondas específicas utilizadas en el tamizado.

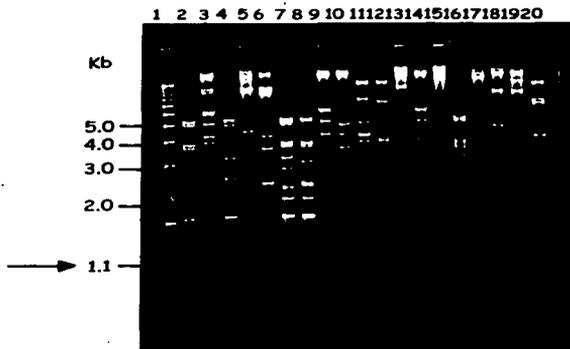
El análisis por Southern blot de la clona C109.II.3 mostró que las sondas 3' y 5' del cDNA hibridaron con varios fragmentos de diferentes tamaños (figura 17B y 17C). De estos, se eligió trabajar con el fragmento obtenido con la digestión doble *ApaI/BstxI* (carril 2) que hibridó con las dos sondas respectivamente y que tienen el tamaño esperado.

Por otro lado, el resultado del análisis de las clonas T101T.1, T101T.2V y T101T.500 por Southern blot muestra que las digestiones obtenidas con *ApaI*, *ApaI/SalI* y *ApaI/PstI* dividen el cDNA en dos fragmentos (ver figuras 18B y 18C; carriles 3, 4, 7, 10, 11, 14, 16, 17 y 20). Los fragmentos de 3.0, 2.0 y 1.5 Kb hibridaron con mayor intensidad con la sonda 5' mientras que los fragmentos de 300 pb hibridaron con mayor intensidad con la sonda 3', por lo que concluimos que los fragmentos de 3.0, 2.0 y 1.5 Kb tienen la secuencia completa del gen. Estos fragmentos son comunes a todas las clonas por lo que, a pesar de que existen diferencias en el tamaño de los insertos, los fragmentos correspondientes a la secuencia de la clona de cDNA T101T son los mismos en cada clona, por lo que en los siguientes análisis se utilizó únicamente el fragmento *ApaI* de 3.0 Kb de la clona T101T.1, que es el sitio de hibridación de mayor tamaño.

Posteriormente, los fragmentos seleccionados fueron clonados en el vector pBluescript SK+ anteceditos por un promotor T3 y T7 respectivamente, para facilitar la estrategia de secuenciación de las clonas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

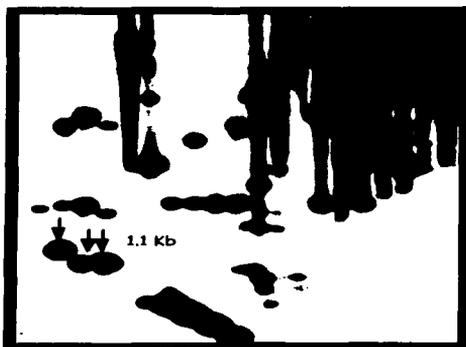
**A Clona C109.II.3**



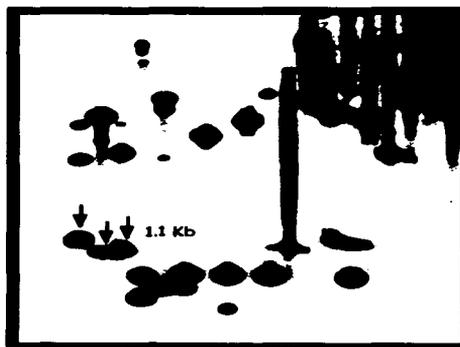
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Carriles: 1. 1 Kb; 2. *Apa*I/*Bst*xI; 3. *Apa*I/*Nco*I; 4. *Pst*I/*Bst*xI; 5. *Apa*I/*Bam*HI; 6. *Apa*I/*Sal*I; 7. *Bam*H/*Bst*xI; 8. *Sal*I/*Bst*xI; 9. *Bam*HI/*Nco*I; 10. *Sal*I/*Nco*I; 11. *Bam*HI/*Cla*I; 12. *Eco*RI/*Cla*I; 13. *Apa*I 14. *Nco*I; 15. *Bam*HI; 16. *Bst*xI; 17. *Pst*I; 18. *Sal*I; 19. *Eco*RI; 20. *Cla*I.

**B Sonda 3 prima**

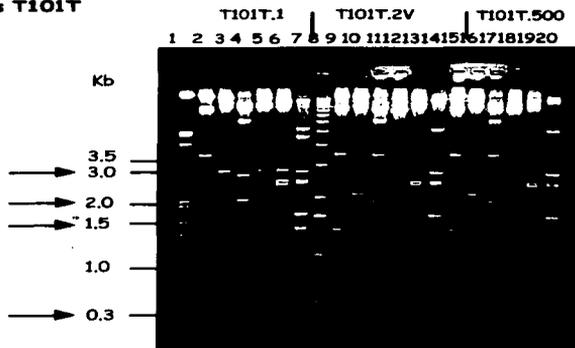


**C Sonda 5 prima**



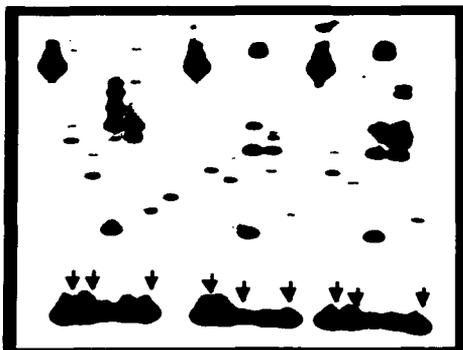
**Figura 17.** Análisis de hibridación tipo Southern del DNA genómico de la genoteca de maíz. A) Patrón de restricción del DNA con diferentes enzimas. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en agarosa al 1.0% y teñidos con EtBr. B) Autoradiografía de la hibridación tipo Southern contra diferentes fragmentos de la clona de cDNA C109 marcada radioactivamente con [<sup>32</sup>P] dCTP. El lavado de alta astringencia fue a 65°C, con SSC 0.1x /SDS 0.1%.

**A Clonas T101T**

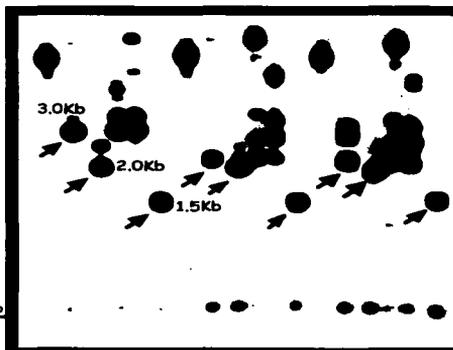


Carriles: 1.  $\lambda$  HindIII/EcoRI; 2. SalI; 3. ApaI; 4. ApaI/SalI; 5. ApaI/BamHI; 6. ApaI/XhoI; 7. ApaI/PstI; 8. I Kb; 9. SalI; 10. ApaI; 11. ApaI/SalI; 12. ApaI/BamHI; 13. ApaI/XhoI; 14. ApaI/PstI; 15. SalI; 16. ApaI; 17. ApaI/SalI; 18. ApaI/BamHI; 19. ApaI/XhoI; 20. ApaI/PstI.

**B Sonda 3 prima**



**C Sonda 5 prima**



**Figura 18.** Análisis de hibridación tipo Southern del DNA genómico de la genoteca de maíz. **A)** Patrón de restricción del DNA con diferentes enzimas. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en agarosa al 1.0% y teñidos con EtBr. **B)** Autoradiografía de la hibridación tipo Southern contra el cDNA de la clona T101T (se dividió en dos fragmentos: 5' y 3') marcada radioactivamente con [ $^{32}$ P] dCTP. El lavado de alta astringencia fue a 65°C, con SSC 0.1x /SDS 0.1%.

#### **VII.IV. Obtención de la secuencia completa de las clonas genómicas.**

Las clonas genómicas seleccionadas a partir del análisis tipo Southern blot fueron secuenciadas mediante el método de dideoxinucleótidos terminadores de la síntesis de cadena (Sanger *et al.*, 1977) utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7 específicos para el plásmido pBluescript SK+, y los oligonucleótidos específicos de las clonas de los cDNAs C109 y T101T (ver materiales y métodos). Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el paquete de programas de GCG, BLAST y FASTA. Los alineamientos de las secuencias obtenidas frente a las secuencias de los cDNAs confirmó la presencia de los extremos 3' y 5' e indicó la orientación del gen respecto a las clonas en el vector de clonación.

La secuencia genómica de la clona C109 contiene 1498 pb que exhibe un marco de lectura abierto de 350 aa (Figura 19). La secuencia se encuentra interrumpida por un intrón de 170 pb que interfiere con el marco abierto de lectura entre los nucleótidos 335 y 505. El intrón fue identificado por la presencia de secuencias conservadas aceptoras (3' AG) y donadoras (5' GT) de "splicing". Se realizó el análisis del uso de codones de la clona completa C109 utilizando el programa "Codon Preference" del paquete de GCG, para determinar el uso preferencial de codones de la secuencia, ya que un análisis anterior mostró que la secuencia del cDNA predice dos posibles marcos de lectura abierto (No. de Acceso en el GeneBank: AF134580). En la figura 20 se muestran los resultados de este análisis; la secuencia tiene un uso preferencial de codones en el primer marco de lectura.

Como parte de la caracterización de la secuencia de la clona C109, se identificó el sitio de inicio de la transcripción utilizando el programa "PLACE" (Plant cis-acting regulatory DNA elements) que es una base de secuencias nucleotídicas que identifica elementos de DNA regulatorios en plantas (Higo K, *et al.*, 1999). El inicio de la transcripción se encontró a 62 pb corriente arriba del inicio de la traducción (ATG). La secuencia inicio de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

transcripción es CTCATCT (donde A indica el nucleótido de inicio), que es una secuencia consenso de inicio de la transcripción en algunos genes de plantas que ya se han descrito (Joshi C.P, 1987). De igual manera, la señal consenso de poliadenilación AATAA reportada para otros genes de plantas (Morgen, B.D., *et al.*, 1992) fue identificada en la posición +1430 a +1434 de la secuencia. En la figura 19 se muestran los elementos regulatorios encontrados.

Por otro lado, la secuencia genómica de la clona T101T tiene 1817 pb con un marco de lectura abierto de 70 aa (Figura 21). El análisis de esta secuencia identifica el inicio de transcripción (CCATCT) a 93 pb corriente arriba del inicio de traducción y a un elemento de inserción llamado Ds1 en la región 5' del promotor similar a un elemento reportado para la secuencia del gen ABP1 de maíz que juega un papel en la percepción de auxina (Elrouby *et al.*, 2000).

La secuencia de la clona de cDNA C103 tiene 1435 pb y contiene un marco de lectura abierto de 355 aa (Figura 22). La señal de poliadenilación consenso AATAA se identificó en la posición +1371 a +1375 de la secuencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

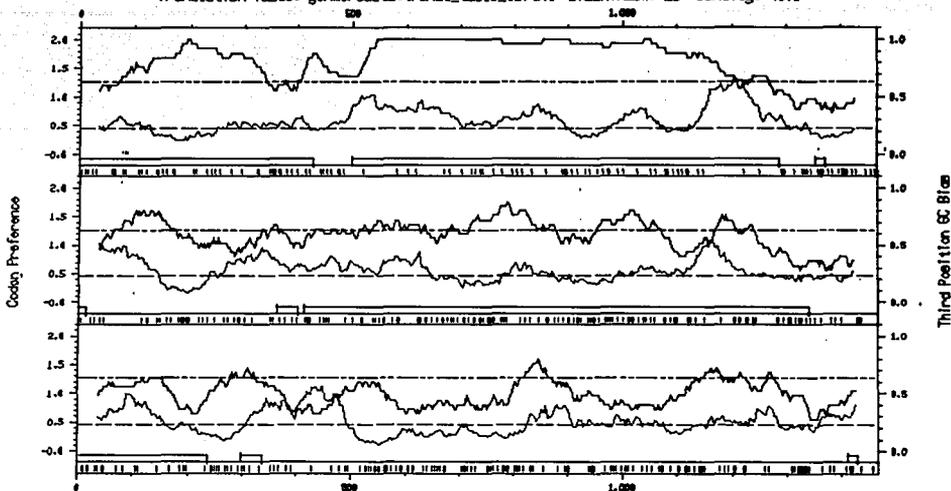
1 CCATGTCATCTCAGTGAATCATCACAGTACAGACAGCATCACAGCACTACCCAGCGCG 60  
 61 CAGTACAACGCAAATGCGCAGGCTGGGAGCACTGATTCGCGTGGCCATCTCTCTGCTCCG 120  
                   N A R L G A L I F L A I L L L A  
 121 CGCCGTCGCGGCCACTGCCGCGCCTTCAGACAGGCCACCCAAAGCGCGAGGGGCCAAGCC 180  
                   A V A A T A A P S D R P P K A Q G P K P  
 181 GCACAAGGAGAAGGAAAGGAAAGCCCAAGCCCATGAAGGTGAAGTGGCCGCGCCCGCTAA 240  
                   H K E K E K E K P K P M K V K C R P R K  
 241 GCTTACCCCTTACTGCCCGCGCAAGCCGATGGAGTGCCTCCGCGAGTGTTCACGCTCATG 300  
                   L Y P Y C P G K P M E C P A E C S Q S C  
 301 CTACGCGCACTGTCAGCTCTCTGCAAACCCGCTCTGCGGTGAGCGCCGCGCGTCAAGTCA 360  
                   Y A D C S S C K P V C  
 361 ACATGTCCTTGGTGGTTTAAATGGCTGCGCTTGC CGCAAGTTGATGGCCATGCATGTCAT 420  
 421 TGTCAACTACTAGCTGGCCGCGCTCACCGTCGCGCTGCGCCGCGTGCCTGGTGCATTTGTT 480  
 481 ACGTAGCTTTGATATACGCATGCACTGTGTGCAAGCGTGCCTGGGGGGCGTGGCGGACCCCGG 540  
                   C A S V P G A C G D P R  
 541 CTTCATCGGGGGCGACGGCAACGCGCTTCTACTTCCACGGCCGCGGGGACGCGGACTTCTG 600  
                   F I G G D G N A F Y F E G R R G R D A D F C  
 601 CGTGTCTCCGACCCGCACTCCACATCAACGCGCACTTCATCGGCAAGCAAGGGCCGCGA 660  
                   V L S D R D L H I N A H F I G K E G A D  
 661 CGGCATGTCCCGGGACTTCACTGGATCCAGGCCATCGCCGCTGCTTTCGACGGCCACGA 720  
                   G M S R R G D P T W I Q A I A V L F D G H E  
 721 GCTCTACGTCGCGCCAGGAAGACGGCCGCGTGGGACGACGACGCTGACCGCATGGAGCT 780  
                   L Y V G A R K T A A W D D D V D R M E L  
 781 CACCCGGAACCGCGCGCTGCGCTTCCCTGCGCGGAAACCGACCGCGCTGGACGTCGCG 840  
                   T L D G E P V R L L P G T D A A N T S G  
 841 CGCCGTCGCGCGCGCTGTCGCTCACCCGCAACGCGCGCAACCGCGCTGCTGCTGCGCT 900  
                   A V P A L S V T R T S A A N G V L V S L  
 901 CGACGGCAGGTTACCATCAAGGCGCAACGCGCTGCCCATCACAGAGGAGGAGTCCAGGGT 960  
                   D G R P T I R A N A V P I T E E S R V  
 961 GCACCGGTACGGCGTACGGCCGACGACTGCGCTCGCGCACCTTGAACCTGGCCTTCAAGT 1020  
                   H R Y G V T A D D C L A H L D L A F K P  
 1021 CGCGCGCTCACCGCCGACTGCACGGCGTGGTCCGCCAGAGCTACCGCTCCGACTACGT 1080  
                   G A L T A D V H G V V G Q T Y R S D Y V  
 1081 CAACCGGTTGATGTC AAGGCGCTCAATGCGCCACCATGGGAGGGGACAGCAACTACACC 1140  
                   N R F P D V K A S M P T M G O D S N Y T T  
 1141 GTCCAGCCTCTTCGCGCTGACTGCGCCGCGGCTTACGCGCGCTGTCGCGGATGCGCG 1200  
                   S S L F A A D C A V A R Y A P S G G S R  
 1201 TGACGACGGCGTGTGATGTCAGAGATCGCTGGCATCACCGTGCAGTGGGCACTGGG 1260  
                   D D G V A M V S E I A G I T C A S G M G  
 1261 TGGCCAAGCGTGGTGTGCAAGAAGTAACCAAGGAGGTGTGCTTCTACTTATTATACCG 1320  
                   G Q G V V C K K \*  
 1321 CGACGAAATCACACGAGGTTAATTTGGGTAACATATGATGTTATCGGGGTGTAACTGCT 1380  
 1381 ATATATATATAAGCGTGGGTGCTATCATGTGCATGACATTCACACCGCAATAGGCTGTG 1440  
 1441 CCATCGGTTGTGATTCACATTTGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1498

NO SE ORIGIN

**Figura 19. Secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida de la clona C109. La clona C109 presenta un marco de lectura de 1498 pb que codifica para una proteína de 350 aminoácidos. La secuencia se encuentra interrumpida por un intrón de 170 pb entre los nucleótidos 335 y 505. El nucleótido +5 corresponde al sitio de inicio de transcripción. La señal consenso de poliadenilación se encuentra en letras remarcadas en la posición +1430 a +1434.**

TECIS CON FALLA DE ORIGEN

CODONPREFERENCE of: C109.II.3 Ck: 7945, 1 to 1467 August 22, 2003 11:40  
 Codon Table: ecahigh.cod PrefWindow: 25 Rare Codon Threshold: 0.10  
 Translation Table: genomedata:transl\_table\_01.txt BiasWindow: 25 Density: 48.1



**Figura 20. Uso preferencial de codones de la clona C109.II.3. La figura muestra tres marcos de lectura donde la línea continua representa el uso de codones. La clona C109.II.3 presenta un uso preferencial de codones en el primer marco de lectura.**

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

1	CACCTACCTTCCCTCCACCTTCCCTGGTTCCTCCCTTCGGCTCTCTCAGTCTACTGCGTGGGA	.60
61	GCCTTATTTAGTCCCATTCAATTCAGATGACCACAAAAGCTTTCAAAAGGGTTATTAATTAAG	120
121	AAAAAGAAAGCAAACAAAATTTTACCACCATTACCACCACCACCGGGTGCATGCTGTAGT	180
181	TAGCTTTTTTGCCATCCGGCAAAGTCCATGGGAAATGGGATAAGTGGAAAGACTTTGAGTAAAGC	240
241	AACACTCCGGTAGGCATTCCTCAITTTTCTTTCCITGTTTTCTAGTTTTCTTTCTTTAATGT	300
301	TATGATTTTTTCCCTGTTCCTGTAAGAAACTAAATTTGTTAGTAAAGTAAATGGAGTACATAT	360
361	ATTTTTCCCTATAGGATACATTCATATAGATTTGCCACGTTAGTTCCTGTTAGGCAATCTCCCA	420
421	GCAGGTCGGTGAACGCCCGTGCBAABTACTGTTTTGTACTGTAGATTTGCACCTCTAGAA	480
481	SAGTGAAGTUTTGAAATAATTCAGTAAGATAGGAAGTCCGATAAAAAAATCTGTTGGAGATA	540
541	ATCTTAGCATGAGCTGTCCGTGATTTCCCTTCCTAACAAAACCAGCTGTGTTTTTCCACC	600
601	GCAGAGCACACAGCATGACAGCAGCAITTCCTCGAATTTTCATACATCTGGCCGTACGGTTC	660
661	GTCCITTAATGGAAAGCAGCTGCTGACTCTAGTACTGTACCATACTTTATAATATAATCT	720
721	ATCATACGAACCAAGTTCCTCTCTTTTGCAAAATGGAAATTAACGTAAGTACGTTAGTTGGTACC	780
781	GTAGTTGGTACCATACTTTATAATACAAAGCACATCCACACGGGTCAACCTTAAGGCTCGTGA	840
841	CGACTCCACTCCACGGCAGCTGTAGACGCACACGCAAGTACGGCAACCCAGGGGAAACGAAA	900
901	TTGAAAGGGGAAAAGCAAGCTTAGCTAGCCAGATTTGCATTCACAGTCCAAAAGCCAAACGAGT	960
961	GTTTGCAGCCTAACGGAGATCTAACCTACTACTCTGCTTTTCCATTTTGTCAACCCCCACAAA	1020
1021	ATCTCTTTCCATACACGAGCGAAACGGGACATTCAAAAGTCTCTCCGGCAGCTCTCATG	1080
1081	CACGACCCAGGACACCCCAATGCCAACACCCCAATTTAAGCATCTCCCTCTCTCTCTCT	1140
1141	CCCCCTCTCCAAGTGAAGTACTACTACAGCTTACAC <u>CCCATG</u> TCACAAAAGCTAAAAAAC	1200
1201	GCTATTTTGGCCCTCTCTCTCCAAAGTACGCTACGCTGCTCGCCGCCCTCCGGAGTATCTACC	1260
1261	TAGCTAGGCTAGGACGATGGCGTACTCCGGTCTGTCGACTGGCTGTTCGGTGGCGGT	1320
<b>M A L L R S C R L A V R V A G</b>		
1321	CGCGGTGGTGTCTCTCTCGGGCTACGCTCTTTGGCCGGCCGAGGGCCGCCAGV	1380
<b>A V V L L L L C G Y A L G A A E G A R P</b>		
1381	TCTGCCAGGCGGCCACGGGGGCGCCAGCGCGGGTTCCTCCACGGCGAAGTTCGCGGTGTT	1440
<b>L P G G H G G A S G G O F S T A N L P V F</b>		
1441	CGTCGTCGAGGGCCCGGCCAGCCGCGGAGAGCTGGCCATAGCAGTCTGTGTACA	1500
<b>V V A R A G O F S R R G A G H *</b>		
1501	GACCTGCCTCTGCATGTCTCGAAGCTTATTAATTTCTCAAAAGTGAATCATTAAICAA	1560
1561	GGATTTTTTTCCCTCTCTTTTAAATTTACTCTCTAGCTACTACTCTCTCTGCTGTTTCAT	1620
1621	TGGTTCTTTGCCCTGTCTTAAGGATGCTCAGCCCATAGCTTTTCGATGTGCACTGACAGGG	1680
1681	TGAGCAAGCTAAGTTTTTGTGCCCTTCGATGTTTATATGGTTTTTTTATTTATCTCTGTAC	1740
1741	ATGTA AAAACAGGATAATGGCTTTTTTACAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1800
1801	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1817	

T101T CON  
 MARCA DE ORIGEN

**Figura 21. Secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida de la clona genómica T101T. La clona T101T tiene 1817 pb con un marco de lectura de 70 aminoácidos. En el recuadro se, señala el sitio de transcripción y con letras subrayadas se resalta la secuencia que corresponde al elemento de inserción Ds1.**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### VII.V. Análisis comparativo de las secuencias completas de las clonas genómicas.

La comparación de la secuencia de la clona C109 (ZmC109) con las secuencias proteicas descritas en bases de datos, usando el programa BLAST, identifican varias secuencias homólogas con plantas, incluyendo a proteínas de maíz, arroz y arabidopsis. El porcentaje de identidad entre la clona C109 y sus homólogos, es el siguiente: 98% con *Zea mays* (ZmRCP2) [No. de Acceso AB021176], 61% con *Oryza sativa* (Osat) [No. de Acceso CAD4066.1], 60% con *Zea mays* (ZmRCP1) [No. de Acceso AB021175], 60% con *Arabidopsis thaliana* (Atha1) [No. de Acceso BAB02467], y 50% con *Arabidopsis thaliana* (Atha2) [No. de Acceso BAB85320]. La figura 23 muestra el alineamiento entre estas proteínas. Las seis proteínas tienen un péptido señal putativo N-terminal hidrofóbico y un motivo de seis residuos de cisteínas conservados en tres pares de Cys-X-X-X-Cys.

La clona C109 predice una proteína con un alto porcentaje de identidad llamada ZmRCP2, que se expresa específicamente en la cofia de maíz (Matsuyama *et al.*, 1999b). Esta proteína contiene el motivo conservado de cisteínas y es similar a otras proteínas que codifican para plantas. Sin embargo aún no se conoce su función. El patrón de expresión de ambos C109 y ZmRCP2 fue detectado en las células secretoras de la cofia. La expresión del RNAm de la clona C109 es muy abundante en las capas de la periferia de la cofia que contienen las células que secretan mucílago (Figura 11A) y su cinética de expresión durante la regeneración de la cofia y centro quiescente después de cortarlos del resto de la raíz indica que se requiere la regeneración del centro quiescente para la expresión de este gen en la cofia.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

maiz	Zm109	MARL <del>GA</del> LILFL	ATILLLAAVAA	TAAPS <del>DR</del> PK	AQGPKPHKEK	EKEKPKEMKV	50
maiz	ZmRCP2	MARL <del>GA</del> LILFL	ATVLLAAVAA	TAAPS <del>DR</del> PK	AQGPKPHKEK	EKEKPKEMKV	50
arroz	CAD4066.1	-----	-----	-----	-----	-----	56
maiz	ZmRCP1	-----	-----	-----	-----	-----	52
Atha1	BAB02467	-----	-----	-----	-----	-----	335
Atha2	BAB85320	MARAYMAVAV	A-LFLVVVCA	AVSEAAKFP-	ASHPRLPPNY	HMINPGSSGL	48
maiz	Zm109	KCRPRKL-YF	YCRGKPMEDF	AECSQSCYAD	GSSCKPVC-C	ASVPGA-CGD	97
maiz	ZmRCP2	KCRPRKL-YF	YCRGKPMEDF	AECSQSCYAD	GSSCKPVC-V	CSVPGA-CGD	97
arroz	CAD4066.1	-----	-----	-----	-----	-----	105
maiz	ZmRCP1	-----	-----	-----	-----	-----	99
Atha1	BAB02467	-----	-----	-----	-----	-----	381
Atha2	BAB85320	GKRDQELSCA	DTYKGGKKGCM	AKC-NQCIVM	CPSCKTFQCM	DFYFG-SCGD	101
maiz	Zm109	PRFIGGDCNA	FVFHGRRDAD	FCVLSDRDLH	INAHF <sup>*</sup> IGKHS	ADGMSRDFTW	147
maiz	ZmRCP2	PRFIGGDCNA	FVFHGRRDAD	FCVLSDRDLH	INAHF <sup>*</sup> IGKHS	ADGMSRDFTW	147
arroz	CAD4066.1	PRFVSGDGNK	FLFHGRKOAD	FCLLSDANLH	INAHF <sup>*</sup> IGKRN	A-AAARDFEW	154
maiz	ZmRCP1	PRFTGADGNN	FVFHGGKDRD	FCIVSDAALH	INAHF <sup>*</sup> IGKRN	-FAMSRDFEW	148
Atha1	BAB02467	PRFIGGDLTL	FVFHGGKDSN	FCLLSDPNLH	INAHF <sup>*</sup> IGKRR	A-CAARDFEW	430
Atha2	BAB85320	PRFTGGDGNN	FVFHGGKDH	FCIVSDADLH	INAHF <sup>*</sup> IGKRN	PT-MSRDFTW	150
maiz	Zm109	IQALAVLFDG	HELYVYGARKT	AAWDDDDVDRM	ELTLDGEPV-	--RLDPAQ-AD	193
maiz	ZmRCP2	IQALAVLFDG	HELYVYGARKT	AAWDDDDVDRM	ELTLDGEPV-	--RLDPAQ-AD	193
arroz	CAD4066.1	IQALGIRFFG	HRLYLVAQRRT	VRWDAADVRL	VITFDGAEV-	--ELDAV-PA	200
maiz	ZmRCP1	IQALGIRFAH	HRLYVAAQRT	PRWDAADHDL	ALALDDEDVD	VASLPRFVW	198
Atha1	BAB02467	IQSAILLFGT	HRLYVYGALKT	ATWDDSDVRI	AVSFDGNI-	--S-LPQ-LD	475
Atha2	BAB85320	IQALGIRFAD	HRLYMGALKT	AKWSSDVRDL	ELAFDGAEV-	--DVEAQ-LD	196
maiz	Zm109	AA-WTS--GA	VEALSVRTS	A-ANGVLVSL	DGRFTIRANA	VPITEESRV	239
maiz	ZmRCP2	AA-WTS--GA	VEALSVRTS	A-ANGVLVSL	DGRFTIRANA	VPITEESRV	239
arroz	CAD4066.1	AS-WSP--AS	VEALSVRTG	P-ANGVVVRL	DGRFRIVANA	VPITEESRRI	246
maiz	ZmRCP1	AR-WSSP--PT	APALSVRTA	R-VNTVVVEL	RGAFRIVASV	VPITAEDSRI	244
Atha1	BAB02467	GARWTSPPGV	YPEVSVKRVN	TDINNLEVEV	EGLLKITARV	VPITMDSRI	525
Atha2	BAB85320	AR-WES--AA	VEGLTVTRTA	A-TNAVRVQL	AGVFDIMANV	VPITEHDSRI	242
maiz	Zm109	HRYGV <del>TAD</del> --	DCLAHLDLAF	KFGALTADVH	GVVGGQYRS	YVNR-EDVFA	286
maiz	ZmRCP2	HRYGV <del>TAD</del> --	DCLAHLDLAF	KFGALTADVH	GVVGGQYRS	YVNR-EDVFA	286
arroz	CAD4066.1	HGYGL <del>TAD</del> --	DSL <del>AHL</del> NVAF	KFYSISADVH	GVLGQYRFD	YVSAGVDFGA	294
maiz	ZmRCP1	HNYGVREDDG	DTLAHLDLGF	KFYDLTDDVH	GVLGQYRFD	YVNS-INVTS	293
Atha1	BAB02467	HGYVD <del>EED</del> --	DCLAHLDLGF	KFQDLSDDVH	GVLGQYRSD	YVSR-KVIGV	572
Atha2	BAB85320	HNYGVTEE--	DTLAHLDLGF	KFYDLSDDVH	GVLGQYRSD	YVNK-LSVSA	289
maiz	Zm109	SMPTMGGDSN	YTTSSLFAAD	CAVARYAPSG	GSRD--DGVA	MVSELAGITC	334
maiz	ZmRCP2	SMPTMGGDSN	YTTSSLFAAD	CAVARYAPSG	GSRDRDDGVA	MVSELAGITC	336
arroz	CAD4066.1	KIPVMGASGK	YAVSDIFATD	CEVARFAGED	GALA--SSVG	MVDAEADALC	342
maiz	ZmRCP1	NMPVMGGAPD	YVSSDLFSTD	CAVARF--G	GRRH--Q-QA	TAANITAMTD	337
Atha1	BAB02467	HMPVMGGDRE	FQTTGLFAPD	CSAARFTGNG	DS-N--NGRS	KL-ELPEMSC	618
Atha2	BAB85320	SMFVMGGAPS	YVASDIFSAD	CAVARFGHRA	G-----	-----	320
maiz	Zm109	ASGMGGGGVV	CKK	-----	-----	-----	347
maiz	ZmRCP2	SSGMGGGGVV	CKK	-----	-----	-----	349
arroz	CAD4066.1	GSGKGSAGLV	CKK	-----	-----	-----	355
maiz	ZmRCP1	DDD-----	-----	-----	-----	-----	341
Atha1	BAB02467	ASGLGGGGVV	CKR	-----	-----	-----	631
Atha2	BAB85320	-----	-----	-----	-----	-----	-----

**Figura 23.** Alineamiento múltiple de la clona C109 y otras proteínas relacionadas. Los aminoácidos que son conservados entre las proteínas se muestran en cuadros grises. El recuadro marca el péptido señal putativo que tienen las proteínas y los asteriscos indican un motivo de seis residuos de cisteínas conservados en tres pares de Cys-X-X-X-Cys.

El análisis por BLAST de la secuencia de la clona C103 (ZmC103) [No. de Acceso AAP68981] mostró que tiene un alto porcentaje de identidad con la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa. Se realizaron alineamientos de la enzima con sus homólogos en otros organismos (Figura 24). Los resultados revelan una identidad de 89% con *Oriza sativa* (Osat) [No. de Acceso BAC02925], 81% con *Cyamopsis tetragonoloba* (Ctet1) [No. de Acceso AJ005082], 81% con *Arabidopsis thaliana* (Atha) [No. de Acceso NP\_194123], ], 68% con *Cyamopsis tetragonoloba* (Ctet2) [No. de Acceso AJ005081], 68% con *Pisum sativum* (Psat) [No. de Acceso U31544] y 61% con *Homo sapiens* (Hsap) [No. de Acceso NP\_000394].

La enzima UDPG epimerasa cataliza la conversión reversible de UDP-D-glucosa a UDP-D-galactosa. La principal función de esta enzima en plantas es la producción de UDP-D-galactosa utilizada en la biosíntesis de polímeros de la pared celular, incluyendo los galactomananos (Campbell *et al.* 1982). Este tipo de moléculas aparecen en las paredes celulares del endospermo de algunas semillas de leguminosas (ej. *Cyamopsis tetragonoloba*), donde juegan también un papel de reserva energética y absorción de agua. Contienen una cadena de manosas unidas por enlace  $\beta(1-4)$  y cuando aparece un residuo de galactosa éste se une a la manosa mediante enlace  $\beta(1-6)$ .

Finalmente, el resultado de la búsqueda de secuencias similares por análisis tipo BLAST para la clona T101T (ZmT101T) [No. de Acceso AAP58405] muestra que no existe similitud alguna con proteínas ya reportadas, por lo que podría tratarse de un nuevo gen de maíz. Por análisis tipo Southern con DNA genómico de maíz y de arabidopsis, la sonda de cDNA T101T hibridó con un fragmento (1.5 Kb) del DNA genómico de la primera especie, pero no con la segunda. Estos resultados sugieren que el gene ZmT101T no está dentro del genoma de esta última especie (datos no mostrados) lo cual además es congruente con el análisis de secuencia mencionado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

maíz	<b>ZmC103</b>	MVSAVLRITL	VTGGAGYIGS	HTVLQLLQGG	FRVVVVLDNL	NASEAALRV	50
arroz	BAC02925	MVSALLRITL	VTGGAGYIGS	HTVLQLLQGG	FRVVVLDNL	NASEAALRV	50
Ctet1	GEP148	MSS---QTVL	VTGGAGYIGS	HTVLQLLQGG	FKAVVVLDNL	NASEATLHV	47
Atha	NP_194123	M--A---KSVL	VTGGAGYIGS	HTVLQLLEGG	YSAVVVLDNYD	NSSAASLQV	43
Ctet2	GEP142	MVS---TLL	VTGGAGYIGS	HTVVQLLQGG	FHVSTIDNLY	NSVTDVTHRV	50
Psat	U31544	-----TLL	VTGGAGYIGS	HTVLELLQGG	FHVSTIDNLY	NSVTDVTHRV	50
Hsap	NP_000394	-----VL	VTGGAGYIGS	HTVLELLEAG	YLFVVLDNFH	NAFRGSLRRV	50
maíz	<b>ZmC103</b>	AELAGHDGAN	LVFHKKVDLRD	RHALVDIFSS	HRFEAVLHFA	GLKAVGESVH	100
arroz	BAC02925	RELAGHNANN	LDFRKVDLDR	KQALDQIFSS	ORFEAVLHFA	GLKAVGESVQ	100
Ctet1	GEP148	KELAGKFNAN	LSFHKLDDLR	RDALKEIFSS	TKFDVVIHFA	GLKAVGESVQ	97
Atha	NP_194123	KCLAGENGAGR	LSFHQVDLDR	RPALKEIFSE	TKFDVVIHFA	GLKAVGESVQ	90
Ctet2	GEP142	RLVGVPLSSN	LFHFHGDLLR	IHDLDILFSK	TKFDVVIHFA	GLKAVGESVQ	100
Psat	U31544	REVVGSNQQN	LEHTLGDLLR	KDDLEKLFSSK	TKFDVVIHFA	GLKAVGESVQ	100
Hsap	NP_000394	QELVGR---S	VEFEEMDILD	QGALQRLFFK	YSPFMAVIHFA	GLKAVGESVQ	100
maíz	<b>ZmC103</b>	KPLLYDNNL	VGTTTLLVEM	AANGCKKLVF	SSSATVYGNP	KEVPCVDEFP	150
arroz	BAC02925	KPLLYDNNL	IGTITLLVEM	AAHGCTKLVF	SSSATVYGNP	KEVPCVDEFP	150
Ctet1	GEP148	KPLLYDNNL	IGTIVLFEVM	AAHGCKKLVF	SSSATVYGNP	KEVPCVDEFP	147
Atha	NP_194123	KPLLYYNNL	VGTTTLLVEM	AQVGCCKLVF	SSSATVYGNP	KEVPCVDEFP	140
Ctet2	GEP142	NPSNYDNNL	VATINLFOVM	SKFNCKKLVF	SSSATVYGNP	DOIICVDESN	147
Psat	U31544	NPRRYDNNL	VGTTINLYEM	AKHNCKKLVF	SSSATVYGNP	EKIICVDEPK	150
Hsap	NP_000394	KPLDYKRVNL	TGTTQLLEIM	KAHGVKNLVF	SSSATVYGNP	QYLPLDEAHP	150
maíz	<b>ZmC103</b>	LCATNPFYGR	KLVIEDICRD	VHRSDPDWKI	ILLRYFNEVG	AHPSGGTIGED	200
arroz	BAC02925	LCAMNPFYGR	KLVIEDMCRD	LHASDPNWKI	ILLRYFNEVG	AHPSGGTIGED	200
Ctet1	GEP148	LSATNPFYGR	KLVIETICRD	LYRADEEWKI	ILLRYFNEVG	AHPSGGTIGED	197
Atha	NP_194123	TSATNPFYGR	KLVIETICRD	VHRSDPEWKI	ILLRYFNEVG	AHPSGGTIGED	189
Ctet2	GEP142	LHAMNPFYGR	KLVEEVAR	IORAEAEWRI	ILLRYFNEVG	AHESGGTIGED	200
Psat	U31544	LQAMNPFYGR	KLFLLEEAR	IQKAEPEWRI	VLLRYFNEVG	AHESGGTIGED	200
Hsap	NP_000394	TGCTNPFYGR	KFFTEEMIRD	LCQADKTWNV	VLLRYFNPTG	AHASGCTIGED	200
maíz	<b>ZmC103</b>	PCGVENNLM	YVQOVAVGRL	PHLTVYGTDY	STKDGAGVRD	YIHVVDLADG	250
arroz	BAC02925	PCGIEPNNLM	FVQOVAVGRR	PALTVYGTDY	NTKDGAGVRD	YIHVVDLADG	250
Ctet1	GEP148	PRGIEPNNLM	FVQOVAVGRR	PALTVFGNDY	TTSDGAGVRD	YIHVVDLADG	247
Atha	NP_194123	PLGVENNLM	YVQOVAVGRR	PHLTVFGTDY	PTKDGAGVRD	YIHVVDLADG	239
Ctet2	GEP142	PRGLENNLM	YIQOVAVARL	PFLNVYGHDY	PTKDGATIRD	YIHVVDLADG	250
Psat	U31544	PRGIEPNNLM	YIQOVAVGRL	PFLNVYGHDY	PTKDGATIRD	YIHVVDLADG	250
Hsap	NP_000394	PCGIEPNNLM	YVSQVAVGRR	EALNVFGNDY	PTEDGAGVRD	YIHVVDLADG	250
maíz	<b>ZmC103</b>	HIAALRKLHE	DSDKIGCEVY	NLGTGKGTSTV	LEMVAAFEKA	SGKIKLPLVFA	300
arroz	BAC02925	HIAALRKLVE	DSDRIGCEVY	NLGTGKGTSTV	LEMVAAFEKA	SGKIKLPLVFA	300
Ctet1	GEP148	HIAALRKLND	--PKIGCEVY	NLGTGKGTSTV	LEMVAAFEKA	SGKIKLPLVFA	281
Atha	NP_194123	HIAALRKLDD	--LKIGCEVY	NLGTGKGTSTV	LEMVAAFEKA	SGKIKLPLVFA	280
Ctet2	GEP142	HIAALRKLFT	TTDNIGCTAY	NLGTGKGTSTV	LEMVAAFEKA	SGKIKLPLVFA	299
Psat	U31544	HIAALRKLFT	--SENIGCTAY	NLGTGKGTSTV	LEMVAAFEKA	SGKIKLPLVFA	300
Hsap	NP_000394	HIAALRKLKE	---OCGCRIT	NLGTGKGTSTV	LQMVQAMEKA	SGKIKLPLVFA	297
maíz	<b>ZmC103</b>	GRREGDAEIV	YAAATAKAEKE	LKWKAKYIGIE	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	350
arroz	BAC02925	GRREGDAEIV	YAAATAKAEKE	LKWKAKYIGVE	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	349
Ctet1	GEP148	GRREGDAEIV	YASTNKAERE	LNWKAKYIGID	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	319
Atha	NP_194123	GRREGDAEIV	YASTNKAERE	LNWKAKYIGIE	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	318
Ctet2	GEP142	PRREGDATAV	YASTEKAEGE	LGWKAKYIGVE	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	348
Psat	U31544	PRREGDATAV	YASTAKAEKE	LGWKAKYIGVE	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	350
Hsap	NP_000394	ARRREGDVAC	YANFSLAQEE	LGWTAALGLD	EMCRDLNWA	SKNPFYGYGS	344
maíz	<b>ZmC103</b>	RDNS					354
arroz	BAC02925	EDSS					353
Ctet1	GEP148	EDSS					348
Atha	NP_194123	SNSS					
Ctet2	GEP142	----					
Psat	U31544	----					
Hsap	NP_000394	----					

Figura 24. Alineamiento múltiple de la clona C103 con sus homólogos en otros organismos. Los aminoácidos que son conservados entre las proteínas de diferentes organismos se muestran en cuadros grises.

## VIII.- CONCLUSIONES

Se caracterizaron molecularmente tres genes de la cofia de la raíz de maíz a partir de clonas específicas de cDNA denominadas C109, T101T y C103. La caracterización de genes expresados en la cofia es uno de los primeros pasos para entender cómo es que esta estructura dirige los movimientos de la raíz hacia o en contra de los estímulos ambientales.

Los genes ZmC109 y ZmT101T se aislaron a partir de un tamizado en un banco genómico de maíz utilizando como sondas diferentes fragmentos de las secuencias de las clonas de cDNA. Se obtuvo la secuencia completa de los genes ZmC109 y ZmT101T y de una clona de cDNA denominada C103.

- El marco de lectura abierto del gen ZmC109 es de 350 aa interrumpido por un intrón de 170 pb. La clona C109 muestra un uso preferencial de codones en el primer marco de lectura, corroborando de esta forma que el gen aislado codifica para una proteína de maíz llamada ZmRCP2 y no para una proteína AGP clásica. El análisis de la secuencia ha demostrado que el gen ZmC109 es muy similar a ZmRCP2 de maíz con 98% de identidad cuya función no se conoce.
- El análisis de la secuencia de ZmT101T mostró que no tiene homología con ninguna proteína descrita en el banco de genes, por lo que se sugiere que se trata de un nuevo gen de maíz.
- La secuencia nucleotídica del gen ZmC103 predice un marco de lectura abierto de 355 aa. El gen ZmC103 es homólogo a la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa con 89% de identidad. La función de esta enzima en plantas es la producción de UDP-D-galactosa utilizada en la biosíntesis de polímeros de la pared celular.

En un futuro sería muy importante identificar los promotores contenidos en las clonas de la cofia con el fin de dilucidar los posibles mecanismos de la expresión de estos genes.

Además, la obtención de anticuerpos específicos, nos permitirá conocer mas sobre la localización intracelular de estas proteínas.

También sería importante conocer la localización y distribución mas específica de estos genes en otras especies de plantas, como arroz y arabidopsis con las que hemos encontrado una alta homología y poder analizar su función.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

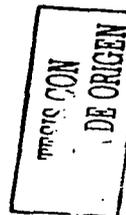
- 1.- Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova, O, Cashmore AR. 1998. Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 392: 720-723.
- 2.- Barlow PW. 1975. The root cap. In the Development and Function of roots (J.G. Torrey and D.T. Clarkson) (eds.). Academic Press, London. 2: 21-54.
- 3.- Barlow PW, Grundwag M. 1974. The development of amyloplasts in cells of the quiescent centre of *Zea* roots in response to removal of the rot cap. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 56-64.
- 4.- Bengough AG, McKenzie BM. 1997. Sloughing of root cap cells decreases the frictional resistance to maize (*Zea mays* L.) root growth. *J Exp Bot* 48: 885-893.
- 5.- Blancaflor EB, Gilroy S. 1998. Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiol.* 116: 213-222.
- 6.- Blancaflor EB, Hasenstein KH. 1995. Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots. *Protoplasma.* 185:72-82.
- 7.- Bonin PC, Potter I, Vanzin GF, Reiter WD. 1997. The MUR1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4-6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 2085-2090.
- 8.- Briggs WR. et al. 2001. The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13, 993-997.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 9.- Brigham LA, Woo H-H, Wen F, Hawes MC. 1998. Meristem-specific suppression of mitosis and a global switch in gene expression in the root cap of pea by endogenous signals. *Plant Physiol.* 118: 1223-1231.
- 10.- Campbell JM, Reid JSG. 1982. Galactomannan formation and guanosine 5-diphosphate-mannose: galactomannan mannosyltransferase in developing seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L., Leguminosae). *Planta* 155: 105-111.
- 11.- Caspar T, Pickard BG. 1989. Gravitropism in a starch-less mutant of *Arabidopsis*: implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* 177: 185-197.
- 12.- Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 281-309.
- 13.- Chaboud A. 1983. Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant Soil* 73: 395-402.
- 14.- Chandra A, Chabot JF, Morrison GH, Leopold AC. 1982. Localization of calcium in amyloplasts of root cap cells using ion microscopy. *Science.* 26: 1221-1223.
- 15.- Chentao Lin. 2000. Plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science.* 5: 337-342.
- 16.- Cronquist A. 1984. *Introducción a la Botánica*. Editorial Continental. 2a edición. México, D.F. pág. 454-458.
- 17.- Curtis H. 1988. *Biología*. Editorial Médica Panamericana. 4a edición. México, D.F. pp.664.

NO SE PUEDE VENDER  
LIBRO DE BOTANICA

- 18.- Darwin C. 1880. The power of Movement in plants. John Murray, London. pp. 129-200.
- 19.- Eapen D, Barroso ML, Campos ME, Ponce G, Corkidi G, Dubrovsky JG, Cassab GI. 2003. A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 131: 536-546.
- 20.- Elrouby N, Bureau T.E. 2000. Molecular characterization of the *Abp1* 5'-flanking region in maize and the teosintes. *Plant Physiology*. 124: 369-377.
- 21.- Evans ML. What remains of the Cholodny-Went theory?. 1992. *Plant Cell Environ*. 15:767-8.
- 22.- Evans ML, Moore R, Hasenstein KH. 1986. How roots respond to gravity. *Scientific American*. 255: 100-107.
- 23.- Fasano JM, Massa GD, Gilroy S. 2002. Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. *J. Plant Growth Regul*. 21: 71-88.
- 24.- Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao T, Gilroy S. 2001. Changes in root cap pH are required for the gravity responses of the *Arabidopsis* root.
- 25.- Feldman L. 1985. Root gravitropism. *Physiol. Plant*. 63: 341-344.
- 26.- Feldman L. 1994. The Maize Root. In *The Maize Handbook*. Freeling, M., Walbot, V. New York: Springer Verlag. 4: 29-37.
- 27.- Guinel FC, McCully ME. 1986. Some water-related physical properties of maize root-cap mucilage. *Plant Cell Environ* 9: 657-666.



28.- Haberlandt G. 1914. "Physiological Plant Anatomy" (translation of 4th German edition by M. Drummond). MacMillan, London.

29.- Hasenstein KH. 1991. Measurement of circumnutation in maize roots. Microgravity. Sci Tech. 4: 262-266.

30.- Hasenstein KH, Blancaflor EB, Lee JS. 1999. The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots. Physiologia Plantarum. 105:729-738.

31.- Hawes MC, Lin HJ. 1990. Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea. Plant Physiol 94: 1855-1859.

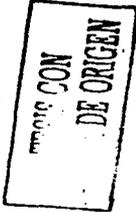
32.- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000. The role of root border cells in plant defense. Trends in plant science. 5: 128-132.

33.- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Res. 27(1):297-300.

34.- Hooker HD. Jr. 1915. Hydrotropism in roots of *Lupinus albus*. Ann. Bot. 29, 265-283.

35.- Hou G, Mohamalawari DR, Blancaflor EB. 2003. Enhanced Gravitropism of Roots with a Disrupted Cap Actin Cytoskeleton. Plant Physiology. 131: 1360-1373.

36.- Ishikawa H, Evans ML. 1992. Induction of curvature in maize roots by calcium or by thigmostimulation: Role of the postmitotic isodiametric growth zone. Plant Physiol. 100: 762-768.



37.- Ishikawa H, Evans ML. 1995. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727.

38.- Jaffe MJ, Takahashi H, Biro RL. 1985. A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science* 230: 445-447.

39.- Joshi CP. 1987. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Research.* 15: 6643-6653.

40.- Juniper BE, Groves S, Landau-Schacher B, Audus LJ. 1966. Root cap and the perception of gravity. *Nature* 209: 93-94.

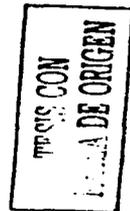
41.- Kiss JZ, Hertel, R, Sack FD. 1989. Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177: 198-206.

42.- Knight TA. 1811. On the causes which influence the direction of the growth of roots. *Philos. Trans. R. Soc. London, Biol. Sci.* 2: 209-219.

43.- Lascève G. *et al.* 1999. *Arabidopsis* contains at least four independent blue-light-activated signal transduction pathways. *Plant Physiol.* 120. 605-614.

44.- Lee JS, Mulkey TJ, Evans ML. 1983. Gravity induced polar transport of calcium across root tips of maize. *Plant Physiol.* 73: 874-876.

45.- Lee JS, Mulkey TJ, Evans ML. 1984. Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin-transport inhibitors. *Planta* 160: 536-543.



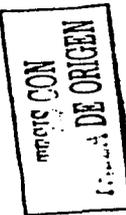
- 46.- Legue V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D, Gilroy S. 1997. Cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  in Arabidopsis roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiol.* 114: 789-800.
- 47.- Mandoli DF, Ford GA, Waldron LJ, Nelson JA, Briggs WR. 1990. Some spectral properties of several soil types: implications for photomorphogenesis. *Plant Cell Environ.* 13: 287-294.
- 48.- Matsuyama T, Satoh H, Yamada Y, Hashimoto T. 1999(a). A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant Physiol.* Jul; 120 (3): 665-674.
- 49.- Matsuyama T, Yasumura N, Funakoshi M, Yamada Y, Hashimoto T. 1999(b). Maize genes specifically expressed in the outermost cells of root cap. *Plant Cell Physiol.* 40 (5): 469-476.
- 50.- Mockler T, Yang H, Yu X, Parikh D, Cheng YC, Dolan S, Lin C. 2003. Regulation of photoperiodic flowering by Arabidopsis photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 2140-2145.
- 51.- Moore R. 1984. Cellular volume and tissue partitioning in caps of primary roots of *Zea mays*. *Am J Bot.* 71: 1452-1454.
- 52.- Moore R, McClelen CE. 1989. Characterizing pathways by which gravitropic effectors could move from the root cap to the root of primary roots of *Zea mays*. *Ann Bot.* 64: 415-423.
- 53.- Morgen BD, MacDonald MH, Leggewie G, Hurt AG. 1992. Several distinct types of sequence elements are required for efficient mRNA 3' end formation in a pea *rbcS* gene. *Mol Cell Biol.* 12: 5406-5414.



- 54.- Muday GK, Haworth P. 1994. Tomato root growth, gravitropism, and lateral development: correlation with auxin transport. *Plant Physiol Biochem.* 32(2):193-203.
- 55.- Nieto-Sotelo J, Kannan KB, Martínez LM, Segal C. 1999. Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp 100 protein homologue. *Gène* 230: 187-195.
- 56.- Oades JM. 1978. Mucilages at the root surface. *Journal of Soil Science* 29: 1-16.
- 57.- Okada K, Shimura Y. 1990. Reversible root-tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250: 274-276.
- 58.- Ponce G, Luján R, Campos ME, Reyes A, Nieto-Sotelo J, Feldman LJ, Cassab GI. 2000. Three maize root-specific genes are not correctly expressed in regenerated caps in the absence of the quiescent center. *Planta* 211: 23-33
- 59.- Rodriguez RL, Tait RC. 1983. *Recombinant DNA techniques: an introduction*. Reading, Mass: Addison- Wesley, Massachusetts. Xviii. Pp. 236:il.
- 60.- Rougier M. 1981. Secretory activity of the root cap. In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 13B, Plant Carbohydrates II*. (W. Tanner, and F.A. Loewus, Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 542-574.
- 61.- Roux SJ. 1984. The cellular bases of gravity and light induced gravitropism. *NASA Tech. Memorandum 86654*: 51-53.

- 62.- Sachs J. 1872. Ablenkung der wurzel von ihrer normalen wachstumsrichtung durch feuchte körper. Arb.D. Not. Inst. Würzburg 1: 209-222.
- 63.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 64.- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
- 65.- Sievers A, Hensel W. 1991. Root cap: Structure and function. In Plant Roots. The Hidden Half. Waisel, Y; Eshel, A and Kafkafi, U. New York. 4: 53-74.
- 66.- Takahashi H, Scott TK. 1991. Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. Plant Physiol. 96: 558-564.
- 67.- Takahashi H, Brown CS, Dreschel TW, Scott TK. 1992(a). Hydrotropism in pea roots in a porous-tube water delivery system. HortScience. 27: 430-432.
- 68.- Takahashi H, Scott TK, Suge H. 1992(b). Stimulation of root elongation and curvature by calcium. Plant Physiol. 98: 246-252.
- 69.- Takahashi H, Suge H. 1991. Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. Physiol. Plant. 82: 24-31.
- 70.- Takahashi H, Takano M, Fuji N, Yamashita M, Suge H. 1996. Induction of hydrotropism in clino-rotated seedling roots of Alaska pea, *Pisum sativum* L. Plant Res. 109: 335-337.

- 71.- Takahashi H, Takano M, Fujii N, Higashitani A, Yamashita M, Hirasawa T, Nishitani K. 1999. Agravitropic mutant for the study of hydrotropism in seedling roots. *Adv. Space Res.* Vol. 23, No. 12: 2021-2028.
- 72.- Takano M, Takahashi H, Hirasawa T, Suge H. 1995 (b). Perception of a gradient of water potential by the root cap and a role of calcium in root hydrotropism. *Plant Cell Physiol.* 36: 59.
- 73.- Takano M, Takahashi H, Suge H. 1997. Calcium Requirement for the Induction of Hydrotropism and Enhancement of Calcium-Induced Curvature by Water Stress in Primary Roots of Pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol.* 38(4): 385-391
- 74.- Volkmann D, Buchen B, Hejnowicz Z, Tewinkel M, Sievers A. 1991. Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitational field during parabolic flights of rockets. *Planta.* 185: 153-61.
- 75.- Watahiki MK, Yamamoto KT. 1997. The massugul mutation of *Arabidopsis* identified with failure of auxin-induced growth curvature of hypocotyl confers auxin insensitivity to hypocotyl and leaf. *Plant Physiol.* 115(2): 419-426.
- 76.- Went FW, Thimann KV. 1937. *Phytohormones.* Macmillan, New York. Pp.294.
- 77.- Wilkins MB. 1984. *Gravitropism.* In *Advanced Plant Physiology* (M.B. Wilkins, ed.). Pitman, London. pp. 163-185.
- 78.- Winslow R, Briggs, John M, Christie. 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science.* 17(5):204-209.



79.- Zhang W, Cheng W, Wen M. 1995. Detachment of root cap cells of maize and its effects on the relationship between root and rhizosphere. Acta Phytophysiol Sin. 21: 340-346.

TESIS CON  
FOLIA DE ORIGEN

**X.- ANEXO 1**

**Georgina Ponce, Rosario Luján, María Eugenia Campos, Alejandra Reyes, Jorge Nieto-Sotelo, Lewis J. Feldman, Gladys I. Cassab. 2000. Three maize root-specific genes are not correctly expressed in regenerated caps in the absence of the quiescent center. Planta 211: 23-33.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## Three maize root-specific genes are not correctly expressed in regenerated caps in the absence of the quiescent center

Georgina Ponce<sup>1</sup>, Rosario Luján<sup>1</sup>, María Eugenia Campos<sup>1</sup>, Alejandra Reyes<sup>1</sup>, Jorge Nieto-Sotelo<sup>1</sup>, Lewis J. Feldman<sup>2</sup>, Gladys I. Cassab<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Molecular Biology, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, P.O. Box 510-3, Cuernavaca, Mor., 62250, Mexico

<sup>2</sup>Department of Plant and Microbial Biology, 111 Koshland Hall, University of California, Berkeley, CA 94720, USA

Received: 22 September 1999 / Accepted: 9 November 1999

**Abstract.** The quiescent center is viewed as an architectural template in the root apical meristem of all angiosperm and gymnosperm root tips. In roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., the quiescent center inhibits differentiation of contacting initial cells and maintains the surrounding initial cells as stem cells. Here, the role of the quiescent center in the development of the maize (*Zea mays* L.) root cap has been further explored. Three maize root-specific genes were identified. Two of these were exclusively expressed in the root cap and one of them encoded a GDP-mannose-4,6-dehydratase. Most likely these two genes are structural, tissue-specific markers of the cap. The third gene, a putative glycine-rich cell wall protein, was expressed in the cap and in the root epidermis and, conceivably is a positional marker of the cap. Microsurgical and molecular data indicate that the quiescent center and cap initials may regulate the positional and structural expression of these genes in the cap and thereby control root cap development.

**Key words:** Development (root cap) – Quiescent center – Root cap initials – *Zea* (root development)

### Introduction

Root caps (RCs) are the terminal-most tissue of roots of most plants (Barlow 1975). For many years, it was believed that the RC functioned only to protect the apical meristem of the root. Within the past 25 years, however, functions of the RC have been shown to be considerably more diverse and to include regulation of many aspects of root development (Scheres et al. 1996).

Root caps perceive and process many environmental stimuli, mediating the direction of root growth in relation to the stimulus gradient. Gravity (gravitropism), unilateral light (phototropism), touch (thigmotropism), gradients in temperature (thermotropism), humidity (hydrotropism), and ions and other chemicals (chemotropism) are all examples of environmental stimuli that are perceived and processed by the cap (Hasenstein and Evans 1988; Okada and Shimura 1990; Fortin and Poff 1991; Takahashi 1997).

In roots with a “closed” type of construction such as maize (Fig. 4A) and *Arabidopsis*, a distinct cap meristem, known as the root cap initials, is present. This layer of initials consists of the most rapidly dividing and least differentiated cells in the RC. As new RC cells are produced by the RC initials these derivatives are displaced through the RC, until they are finally released (sloughed-off) into the soil as border cells (Hawes and Lin 1990). During their passage to the outside of the cap, cells are transformed from statocytes (i.e. gravity-perceiving cells) into secretion cells, which produce mucilage before they finally detach from the cap and differentiate into border cells (Barlow 1975; Hawes and Lin 1990). If these cells are allowed to accumulate, and are not sloughed off (by suspending the root in air), the RC meristem ceases initiating new cells, suggesting communication between border cells and the RC initials (Hawes and Lin 1990). There is also evidence that RC initials communicate with adjacent cells located basally (proximally) in the root proper. If the cap is excised, the adjacent root tissues alter their development and regenerate a new cap (Barlow 1974; Feldman 1976). This regeneration of a new cap occurs from a population of mitotically inactive root cells designated the quiescent center (QC). In experiments in which both the RC and QC are together excised a new RC re-forms, but not until after a new QC redevelops, leading to the suggestion that the QC functions as an architectural template, because it mainly retards cell differentiation, and not cell division (Feldman 1976, 1998). Recent work using laser ablation to destroy one or more QC cells in *Arabidopsis* roots has extended this view (van den Berg et al. 1997).

Abbreviations: GRP = glycine-rich protein; QC = quiescent center; RC = root cap

Correspondance to: G. I. Cassab;

E-mail: gladys@ibt.unam.mx; Fax: + 52-73-13-99-88

In *Arabidopsis* the QC consists of four cells and is surrounded by contacting meristematic initials. When one or more of the QC cells is ablated the contacting RC initials, which normally lack starch, differentiate and develop starch grains. The results of the laser ablation studies also suggest that communication between the QC and RC extends only to contacting initial cells. Collectively, the surgical and ablation studies indicate that positional cues play a critical role in controlling the identity of the component tissues. In addition, the QC and the RC participate in the establishment of histological patterns in the root, as seen by genetic analysis of the *hobbit* and *hombadil* mutants (Scheres et al. 1996; Willemssen et al. 1998).

In the current work, we have isolated three maize root-specific genes. Two of these are cap-specific and one is expressed in the cap and also in the root epidermis. All of them apparently code for proteins or enzymes of the cell wall. Here, we propose that positional information is exchanged between the QC and the RC, resulting in the expression of cap-specific (tissue-specific) genes. We report on the expression of RC-specific markers in the regenerating RC and relate these results to the re-establishment of the QC.

## Materials and methods

**Plant material.** Seeds of *Zea mays* L. cv. Merit (Asgrow Seed Co.) were germinated as described previously (Feldman and Briggs 1987). Two-day-old primary seedling roots were used in order to dissect RCs. Root caps were collected using a dissecting microscope in dim ( $4 \times 10^{-14}$  W m<sup>-2</sup>) green (515–575 nm) light as the only illumination. Immediately after excision from the primary root, the cap was frozen by placing in contact with a glass slide resting on a block of dry ice. For the isolation of 750 ng of poly(A)<sup>+</sup> mRNA, approximately 10,000 caps were collected.

**Isolation of total and poly(A)<sup>+</sup> mRNA.** Total RNA from RCs and decapitated root tips was prepared as described by (Rochester et al. 1986). Polyadenylated mRNA was isolated using the polyA tract mRNA isolation systems from Promega.

**Construction and screening of a cDNA library.** An RC cDNA library was constructed by using the Riboclone system from Promega using poly(A)<sup>+</sup> RNA (approximately 0.75 µg). M-MLV reverse transcriptase (200 U/µl) from Gibco-BRL was used instead of AMV-reverse transcriptase from Promega. Any cDNAs above 300 bp were ligated to *EcoRI*-*XbaI*-digested λGEM-4 and packaged in vitro with Gigapack II (Stratagene). A total of  $2 \times 10^6$  recombinants were obtained. Eighty thousand recombinants were screened by differential hybridization with single-stranded cDNA probes complementary to mRNA from either RCs or decapped root tips. The cDNA probes were prepared by polymerase chain reaction (PCR) amplification from 1 µg of total RNA from RCs and decapitated roots using a modified T primer [(TCG AGA TCT AGA GGT ACC (T)<sub>n</sub>]. Confirmed positives were plaque-purified, and the cDNA inserts were subcloned into the *EcoRI*-*XbaI* sites of the BlueScript SK (+) and (-) plasmid (Stratagene).

**Sequencing of DNA and sequence analysis.** The nucleotide sequence of the cDNAs was determined either by the dideoxy method using [<sup>32</sup>S]dATP (specific activity:  $> 37$  TBq mmol<sup>-1</sup>; NEN) and the 'Sequenase' (USB) or by automated DNA sequencing on an Applied Biosystems PE 377-18 apparatus using dye terminators. The DNA sequence analyses were performed on a VAX computer

using the BLASTP and PILEUP programs of the GCG (Devereux et al. 1984; Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group, Madison, Wis., USA). Hydrophobicity plots were done with the MacMolly program.

**Screening a maize genomic library.** A total of 1,380,000 plaque-forming units (pfu) was screened from an amplified maize genomic library (Nieto-Sotelo et al. 1999) with  $2.5 \times 10^4$  pfu/ml, and thus the entire haploid genome size of maize was included.

**Analysis of RNA gel blots.** Samples of RNA were electrophoresed in agarose-formaldehyde gels as described by Maniatis et al. (1982). A ladder of RNA size standards (Gibco-BRL) was run to estimate the RNA size. After blotting to Nytran (Schleicher & Schuell), RNA was UV-cross-linked to the membrane. Prehybridization and hybridization were performed as described by Maniatis et al. (1989). <sup>32</sup>P-Labeled DNA probes were prepared by the random primer method (Feinberg and Volgestein 1983).

**In-situ hybridization.** Tissue preparations were lightly fixed in 4% paraformaldehyde in 1 M PBS (10 mM K-phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2) overnight at 4 °C. Tissues were then dehydrated in a graded ethanol/H<sub>2</sub>O/xylene series (20, 30, 50, 75, 90, 95, 100% ethanol, 3:1 ethanol:xylene, 1:1 ethanol:xylene, 1:3 ethanol:xylene, 1:1 xylene:paraffin, pure paraffin). Tissues were embedded in paraffin blocks for sectioning, and then mounted on Probe-On Plus slides. The in-situ hybridization method using digoxigenin-labeled riboprobes (derived from cDNA clones) was as described by Ruzin (1999).

**Microsurgical removal of the RC and QC.** The RC and QC were removed surgically from 2-d-old seedling roots as described by Feldman (1976). Subsequent to the surgery, roots were returned to the dark, sampled periodically, fixed, dehydrated, embedded and sectioned as described above. Sections were then used for in-situ hybridization analysis with digoxigenin-labeled C109, C106 and C123 antisense and sense riboprobes (data not shown).

## Results

**Isolation of RC-specific genes.** A λGEM-4 cDNA library prepared from poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated from maize RCs was differentially screened with single-stranded cDNA probes complementary to mRNA from either RCs or decapped root tips. Screening a total of  $2 \times 10^6$  recombinant phage yielded nine clones that hybridized to mRNA from RCs but not decapped root tips. One of the RC clones (C109) was chosen for DNA blot analysis against the other eight clones. This analysis revealed that three clones (C104, C131 and C134) cross-hybridized with clone C109, suggesting that this gene is highly expressed in the RC. Clone C123 was also selected for DNA blot analysis against the other remaining four RC clones. This experiment showed that only one clone (C111) cross-hybridized with the C123 clone (data not shown). A DNA blot analysis of the three remaining clones (C106, T101T and C103) did not show any homology between them. Thus, we isolated five different RC clones: C109, C123, C106, T101T, and C103. Clones C109, C106 and C123 were further analyzed.

A northern blot analysis was performed to study the expression of transcripts for clones C106, C109 and C123 in different maize tissues. This analysis indicated that these genes are only expressed in root caps (Fig. 1A–C).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 1A–D.** Accumulation of mRNA of RC clones C106, C109 and C123 in different maize tissues. *Lanes 1*, 10  $\mu$ g of total RNA from decapped primary roots; *lanes 2*, 10  $\mu$ g of total RNA from root caps; *lanes 3*, 10  $\mu$ g of total RNA from young leaves. **A** Autoradiography of a gel blot using cDNA clone C106 as a probe. **B** Autoradiography of a gel blot using cDNA clone C109 as a probe. **C** Autoradiography of a gel blot using cDNA clone C123 as a probe. **D** Ethidium bromide staining of the gel used for RNA blotting, which indicates equal loading of total RNA from decapped roots, root caps and leaves from blots shown in A–C

**Sequence analysis of root cap clones C109, C106 and C123.** C109 is a partial cDNA clone of 982 bp in length with two possible open reading frames (GenBank accession number: AF134580). The longest open reading frame predicts a protein with 31% identity to both a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan protein (AGP) and to an epithelium-associated human mucin JUL7 (Dufosse et al. 1993). This predicted protein is highly hydrophilic, like mucin JUL7. However, it also includes a C-terminal hydrophobic region as seen in AGPp1 (Chen et al. 1994) that may serve as a membrane anchor. The shortest open reading frame in clone C109 is identical to a novel plant protein recently reported in maize (Matsuyama et al. 1999a). This predicted protein is mostly hydrophobic with a region of regularly-spaced cysteine residues.

The cDNAs for clones C106 and C123 are also partial and are 452 bp and 428 bp in length, respectively. Since all three cDNAs are smaller than their corresponding mRNAs (see northern analysis, Fig. 1), we decided to isolate their related genomic clones. We obtained six genomic clones related to cDNA clone C109 (*Zm109*), one for C106 (*Zm106*), and two for C123 (*Zm123A* and *Zm123B*). The predicted amino acid sequence of clone *Zm106* presents a high overall identity to the GDP-D-mannose-4,6-dehydratase of *Arabidopsis* (77%), *Escherichia coli* (57%), HL-60 cells (55%), and human brain (54%) (Fig. 2). This enzyme catalyzes the first step in the de-novo synthesis of GDP-L-fucose (Bonin et al. 1997). Clone *Zm123A* codes for a putative glycine-rich cell wall protein and is highly similar (89% to *GRPZm*, and 68% to *Zm11*, respectively) to two glycine-rich proteins (GRPs) recently reported from maize (Matsuyama et al. 1999b) (Fig. 3A). Hydropathy analysis of the three maize GRPs shows that they are highly hydrophilic but that only *Zm11* contains an hydrophobic region in the C-terminal (Fig. 3B). Glycine-rich proteins are a class of structural wall proteins that seem to play important

roles in the development of the vascular tissue (Cassab 1998). Their presence in a non vascular tissue such as the RC suggests that GRPs also participate in other developmental processes.

**Localization of C106, C109 and C123 transcripts in the RC.** To determine the cellular localization of the transcripts for the three cap genes within the root, in-situ hybridization experiments were performed. The mRNA for clone C109 was restricted to the outer layers of the RC that include 40% of the cap cells of maize roots (Moore 1984) (Figs. 4B, 5B). These layers contain the mucilage-secreting cells. In addition, the signal was very strong and thus this gene may be expressed in large quantities. C109 mRNA was also present in the detached cells. The mRNA for clone C106 was primarily detected in the peripheral columella cells (Figs. 4B, 5D). Its expression declined in the mucilage-secreting cells. By comparing the signals of C109 and C106 mRNAs in transverse RC sections, we observed that both signals overlap in the two outer cell layers of the cap (data not shown). The mRNA for clone C123 was observed solely in the region that corresponds in dicotyledonous roots to the lateral RC but it was also present in the root epidermis (Figs. 4B, 5F). However, the signal disappeared in epidermal cells proximal to the root meristem. In contrast, transcripts for clone C123 could not be detected by northern analysis in roots without caps (Fig. 1C).

**Expression of RC genes in developing caps after microsurgery of the RC and QC.** Thus far we have shown that several genes are expressed preferentially, if not exclusively in the RC, and that the expression pattern is distinct for each of the three genes. We wished to explore the timing of the expression of these genes as the RC develops and whether this expression pattern is related to the development of the QC. For this we used a surgical approach to remove either the cap alone, or the cap plus the QC, and then followed the regeneration of the excised tissues. Using this approach we analyzed when and in which tissues these genes were expressed. When the cap alone is removed, QC cells at the distal (now exposed) surface of the root differentiate starch grains within about 12 h of the surgery, coincident with the ability of the root to again perceive gravity. Shortly thereafter, cells of the QC begin dividing, initiating a new RC and new RC initials. Forty-eight hours after this surgery the QC has re-formed to its pre-decapping dimensions. In the case of removal of both the RC and QC, regeneration of a new RC also occurs, but there is not any histological evidence of RC regeneration until a new QC begins to re-form (Feldman 1976). In roots from which only the cap has been excised, a complete new RC regenerates from reprogrammed distal QC cells after 72 h (Barlow 1974) (Fig. 6A–C). However, in roots from which both the QC and the cap have been removed, regeneration of the damaged apex arises from the region of tissue bordering on the excised QC (the proximal root meristem) (Feldman 1976). Thirty-six to 48 hours after surgery of the QC, a small but discrete QC

RECIBO  
 NO. 555  
 DE LA DE ORIGEN

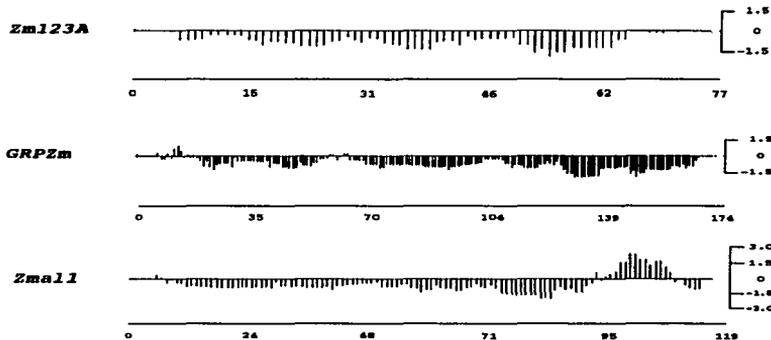
<i>Zm106</i>	MAHFNQAAAT	ATACGGDMD	ETAPVPRALA	PARKVALITG	ITGQN	GSYLT	50
<i>A. thaliana</i>	MAHFNQGRS	DGSGTAPPA	DSTVTV---	P-RKVALITG	ITGD	GSYLT	45
HL-60 cells	MAHAFARCP	ARGSG---	---DGEMG	KPRVALITG	ITGD	GSYLA	40
hbrain	M-----	-----	-----	-----	---D	GSYLA	7
<i>E. coli</i>	M-----	-----	-----	--SKVALITG	VTGD	GSYLA	19
Consensus	MA.....	.....	.....	--RKVALITG	ITGD	GSYLA	50
<i>Zm106</i>	EXLLSKGVEV	HGLILRSBNF	WFORLNDWIH	DPHKVPSAPR	PPKRLFTYADL		100
<i>A. thaliana</i>	EXLLSKGVEV	WFORLNDWIH	WFORLNDWIH	DPHKVPSAPR	PPKRLFTYADL		92
HL-60 cells	EFLLEKGEV	HGLIVRSSF	WFGRIEELFK	NFQAHIEG---	---NMR	LHYGDL	87
hbrain	EFLLEKGEV	HGLIVRSSF	WFGRIEELFK	NFQAHIEG---	---NMR	LHYGDL	54
<i>E. coli</i>	EFLLEKGEV	HGLIKRASSF	WFERVDWIYQ	DPHT-CNP---	---KPL	LHYGDL	65
Consensus	EFLLEKGEV	HGLI.RRSSF	W.F.RI.IIY	DPH.....	---MK	LHYGDL	100
<i>Zm106</i>	SDSSLLRRAL	DATS FDEVTE	PAAQSEVAVS	FELPHYSADV	VATGALLLE		150
<i>A. thaliana</i>	TDASSLRHWI	DVK FDEVTE	LAQSEVAVS	FELPDTADV	VATGALLLE		142
HL-60 cells	TDSVCLVKII	NEVK FTEIYE	LGAQSEVKIS	FDLAEYTABV	DGVGTLRLD		137
hbrain	TDSVCLVKII	NEVK FTEIYE	LGAQSEVKIS	FDLAEYTABV	DGVGTLRLD		104
<i>E. coli</i>	SDTSNLTRLI	REVQ FDEVTE	LGAQSEVAVS	FESPEYTABV	DAMGTLRLLE		115
Consensus	SDSS.L.R.II	.EVK FDEVTE	LGAQSEVAVS	FE.PEYTABV	DA.GTLRLLE		150
<i>Zm106</i>	AVR---LSR-	KPMRYQAGS	SEMPGSTFP-	PKKEDSFFPH	RSPYAAARVA		195
<i>A. thaliana</i>	AVRSHTTDSG	RTVKYQAGS	SEMPGSTFP-	PKSETTFPH	RSPYAAARVA		191
HL-60 cells	AVKTCGLI--	NSVKF YQAST	SELYGVQEI	PKKETTFFYP	RSPYGAARLY		185
hbrain	AVKTCGLI--	NSVKF YQAST	SELYGVQEI	PKKETTFFYP	RSPYGAARLY		152
<i>E. coli</i>	AYRFLGLE--	KKTRF YQAST	SELYGVQEI	PKKETTFFYP	RSPYAAARLY		163
Consensus	AVR..GL---	..VKF YQAST	SELYG.VQEI	PKKETTFFYP	RSPYAAARLY		200
<i>Zm106</i>	AHWYTVVEYE	AYGVFACGVI	LFWESPRG	ENFVTRNITE	AVGR IKVGLQ		245
<i>A. thaliana</i>	AHWYTVVEYE	AYGLFACGVI	LFWESPRG	ENFVTRKITE	LVGR IKVGLQ		241
HL-60 cells	AYWIVVVFRE	AYNLFAVGOI	LFWESPRG	ANFVTRKISR	SVAK IYLG--		233
hbrain	AYWIVVVFRE	AYNLFAVGOI	LFWESPRG	ANFVTRKISR	SVAK IYLG--		200
<i>E. coli</i>	AYWITVVEYE	AYGVFACGVI	LFWESPRG	ENFVTRKISR	AVR IYGLQLE		213
Consensus	AYWITVVEYE	AYGLFACGVI	LFWESPRG	ENFVTRKITE	AVA..I..GL.		250
<i>Zm106</i>	TRVPLGNLSA	A-----	R DMGFAGDYE	AMWMLGQQEQ	PGDVVVATEE		287
<i>A. thaliana</i>	TKLFLGNLQA	S-----	R DMGFAGDYE	AMWMLGQQEQ	PDDVVVATEE		283
HL-60 cells	-----QLE	FSLGNLDAK	R DMGHAKDYE	AMWMLGQND	FEDFVIATGE		277
hbrain	-----QLE	FSLGNLDAK	R DMGHAKDYE	AMWMLGQND	FEDFVIATGE		244
<i>E. coli</i>	SCLYLNHDS	L-----	R DMGHAKDYE	MQWMLGQQEQ	FEDFVIATGV		255
Consensus	....LGNL..	.....	R DMGHAKDYE	AMWMLGQQE.	FEDFVIATGE		300
<i>Zm106</i>	SHTVEEFLOA	AFGYAG--LS	W-----	-----	-----KDHV		310
<i>A. thaliana</i>	GHTVEEFLDV	SFGYLG--LN	W-----	-----	-----KDVV		306
HL-60 cells	VHSVREPFVK	SFLHIGKTVI	WEGR--NENE	V-----	---CKETGKVHV		317
hbrain	VHSVREPFVK	SFLHIGKTVI	WEGR--NENE	V-----	---CKETGKVHV		284
<i>E. coli</i>	QYSVROQFVM	AAQGLGIKLR	FEGTGVEER	IVSVVTGHDA	PGVKPGDVII		305
Consensus	..HSVREPVE.	SF...G..L.	WEG---E..	-----G---	-----GKVHV		350
<i>Zm106</i>	VIDKKYFRPA	EVDLSLGGAT	KARKVLKWRP	KVGFQELVEM	MVDHDIELAK		360
<i>A. thaliana</i>	EIDORIFRPA	EVDNLGGAS	KAKEVLKWRP	QVGFELKVRM	MVEDDELAK		356
HL-60 cells	TVDKTYRPT	EVDLGGDCT	KARKQLNWRP	RVAFDELVRE	MVHADVELAR		367
hbrain	TVDKTYRPT	EVDLGGDCT	KARKQLNWRP	RVAFDELVRE	MVHADVELAR		334
<i>E. coli</i>	AVDFRYFRPA	EVTLLGGPT	KAHEKLGWRP	ETITREMVSSE	MVANDLEAK		355
Consensus	..VD.KYFRPA	EVD.LGGD.T	KAK.KL.WRP	.V.F.ELV.E	MV..D.EI.AK		400
<i>Zm106</i>	KEKVLVDAGY	-RDPKQOP					377
<i>A. thaliana</i>	REKVLVDAGY	-MDAKQOP					373
HL-60 cells	-----	-----NA					372
hbrain	-----	-----NA					339
<i>E. coli</i>	KHSLLKSHGY	DVAIALES					373
Consensus	....L...GY	-----					418

Fig. 2. Genomic clone *Zm106* encodes GDP-mannose-4,6-dehydratase and is specifically expressed in the RC of maize. Alignment of the *Zm106* predicted protein sequence with other GDP-mannose-4,6-dehydratases. GenBank accession numbers for the enzymes in the alignment are as follows: *ZmC106*, AF134575; *A. thaliana*, U81805; HL-60 cells (human promyelocytic cells), AF042377; human brain (hbrain), AF040260; *E. coli*, P32054

is evident but the distinctive architecture of the root apex is not clear (Fig. 6D,E) (Feldman 1976). Root cap initials that produce derivatives in a distal direction are evident approximately 72–84 h after the cap and QC are removed (Fig. 6F), and the QC reaches its maximum size (Feldman 1976). Here, we have confirmed the timing and sequence of these regenerative events. When only the cap was excised, C109 expression was first evident 72 h after removal of the cap and appeared in the outer layers of the regenerated cap (Fig. 6C) as in intact root sections from 2-d-old seedlings (Fig. 5B). At this stage, the anatomically discrete layer of RC initials was

evident, indicating that the re-expression of C109 is preceded by both the development of a new QC and of new RC initials. However, when both the QC and the cap were excised, the expression pattern was very different. Even though a new layer of RC initials was not yet evident and the QC was small, the outer "cap-like" cells very strongly expressed C109 after 48 h regeneration (Fig. 6E). The expression of C109 declined 72 h after excision, a stage at which the RC initials were evident (Fig. 6F). A pattern similar to that in intact roots was seen in caps that were allowed to regenerate for 96 h (Fig. 6G).

<b>Zm123A</b>	-----	-----	-----	-----	-----	
<b>GRP2m</b>	MAGTKRLISLG	LLVLIGIGLA	NAVRVARYSS	ADGTGTGEGQ	GGGYVNGGGS	50
<b>Zm11</b>	M-----	-----VQ	HA-----	-----	-----	5
<b>Consensus</b>	M-----	-----	.A-----	-----	-----	50
<b>Zm123A</b>	-----	-----	-----	-----	-----	
<b>GRP2m</b>	GGSGTGSQGD	SSPYGVHTSA	GGGGAGCCAS	QNGSGYVSG	SGSGSGSSTY	100
<b>Zm11</b>	-----	-----SAS	GGGGGGG-TS	QYGGSGYVSG	SGSGSGSSTY	37
<b>Consensus</b>	-----	-----	... GGGG.GG--S	Q..GGSGYVSG	SGSGSGSS..	100
<b>Zm123A</b>	-----	GSSNAAGTQG	QGGGQAGGY	ENNAQGGSG	GTGSGSSTAS	40
<b>GRP2m</b>	SQGGYYSYCG	ESSNAAGTQG	QGGGQAGGS	WENNAQGGSG	GTGSGSSTAN	150
<b>Zm11</b>	LVKEGYSYCG	ESSNAAGTQG	QGGGQAGGA	WENNAQGGSG	GTGSGSSTAN	87
<b>Consensus</b>	....YSCYCG	ESSNAAGTQG	QGGGQAGG.	WENNAQGGSG	GTGSGSSTAN	150
<b>Zm123A</b>	KYWDGSEV-	GANANQGGG	TGNSQNGGG	QSGAGAGTY	SA----YP	83
<b>GRP2m</b>	RNWDGSSCG-	-ANANQGGG	TGNSQNGGG	QSGDGSQYA	NA----YP	192
<b>Zm11</b>	RYWYGSSES	CKCANQGVA	QEIYKTEVV	VSGAGSQTG	NATPNFYI	135
<b>Consensus</b>	RYWDGSE-	-ANANQGGG	TGNSQNGGG	QSGAGSQTG	NA----YP	198



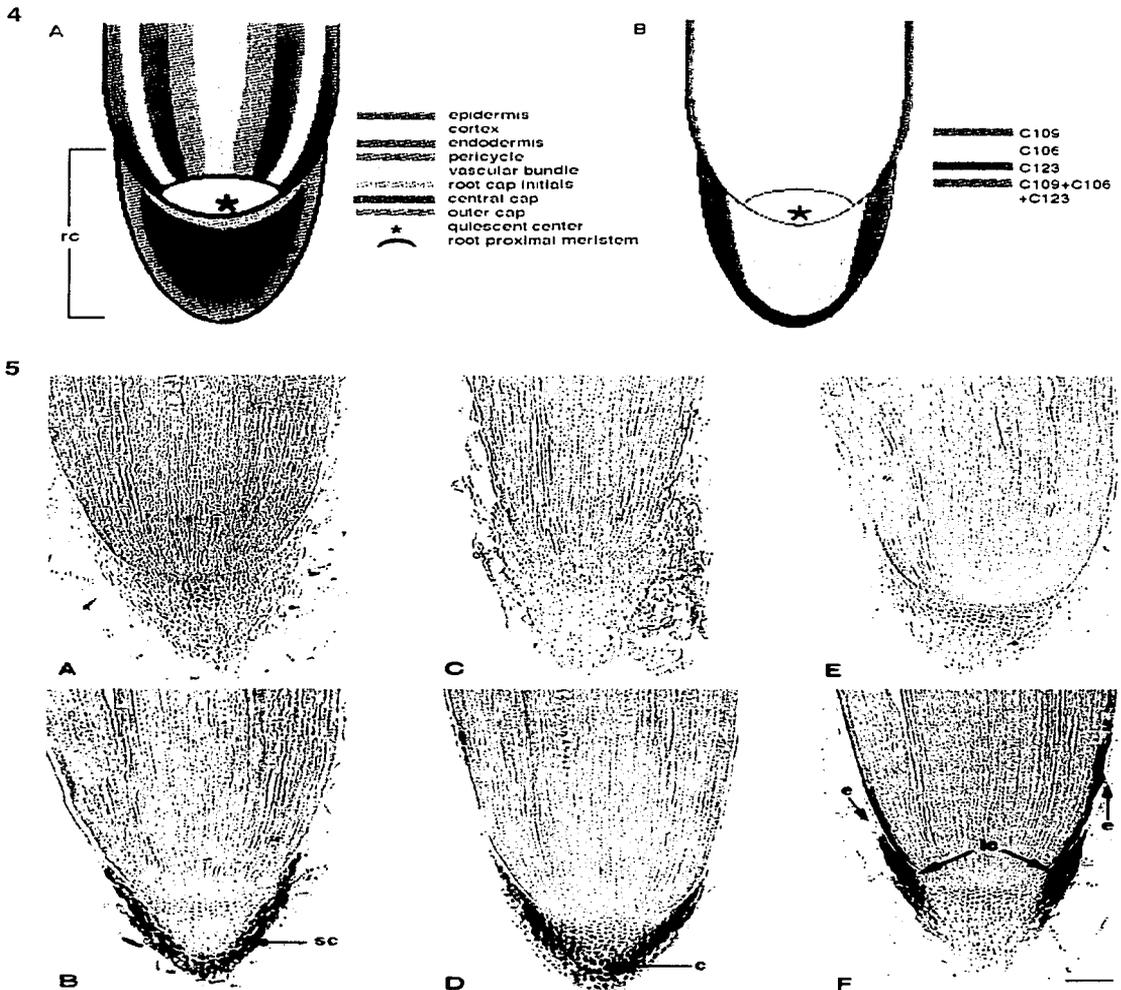
TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig. 3.** Genomic clone *Zm123A* encodes a protein similar to GRPs and is expressed in the RC and root epidermis. *Top*, alignment of the amino acid sequence encoded by genomic clone *Zm123A* with two maize GRPs. GenBank accession numbers are as follows: *Zm123A*, AF134579; *GRP2m*, AB014475; and *Zm11*, AF031083. *Bottom*, hydrophobicity analysis of the deduced amino acid sequences of clone *Zm123A* and two GRPs from maize, *GRP2m* and *Zm11*

The expression of clone C106 was different (Fig. 7A–G). Forty-eight hours after the removal of only the cap, this clone was intensely expressed in the outer layer of the developing new cap and not in the peripheral columella cells (Fig. 7B) as in intact roots (Fig. 5D). As the cap developed, the expression pattern for this clone was re-established in the peripheral columella cells (Fig. 7C). Twenty-four hours after both QC and cap were excised, clone C106 was detected at a low level in the new cells emerging from the site of QC excision (Fig. 7D). After 48 h, the outermost newly produced cap cells continued to express this gene (Fig. 7E). Nonetheless, it was not until the RC initials had reappeared that the expression pattern for clone C106 was localized to the cap in a pattern similar to that observed in intact, nonsurgically treated tissues (compare Fig. 7F to Fig. 5D). This pattern continued in RCs that had regenerated for 96 h since the signal was

preferentially located in the peripheral columella cells (Fig. 7G).

The pattern of expression of C123 in regenerating tissues was quite different from that of either C106 or C109 (Fig. 8A–G). In roots from which the cap only had been excised, C123 expression was slight in the peripheral nascent cap cells and also in the root epidermis (Fig. 8A). At 48 h (Fig. 5F), expression increased around the entire regenerating cap and epidermal root cells (Fig. 8B). By 72 h, when the cap had nearly completely re-formed, the expression pattern was predominantly found in the lateral RC as in intact root tips (compare Fig. 8C to Fig. 5F). In apices allowed to regenerate for 24 h following removal of the root cap and QC, clone C123 was basically expressed in all the newly formed cell layers of the emerging cap and also in the epidermal root cells (Fig. 8D). This expression continued to be elevated in the 48-h-regenerated apex



but was now more accentuated in the lateral region of the regenerating root cap than in the central cap (Fig. 8E). However, by the time the regeneration had proceeded for 72 h, the expression of clone C123 had

decreased in both the central and lateral cap (Fig. 8F). By 96 h after surgery, at a time when the new RC initials are anatomically distinct and the QC fully re-established, the expression pattern for this clone was confined

94

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4A,B. Schematic representation of the maize root apex. A The different constituents in the root tip. B The expression pattern of two RC-specific genes (clones C109 and C106) and one RC and epidermis gene (clone C123). Clone C109 is expressed in the outer cap made of secretory cells. Clone C106 is expressed in the periphery of the central cap made of columella cells. Clone C123 is expressed in the lateral cap and root epidermis

Fig. 5A-F. Differential expression of three maize genes in the maize root apex. In-situ hybridization analysis of three clones in median sections of 2-d-old primary maize roots (sc: secretory cell; c: columella cell; lc: lateral cap cells; e: epidermis). A,B Clone C109 expression is only observed in the secretory cells of the RC, with antisense (B) but not sense (A) probes. C,D GDP-D-mannose-4,6-dehydratase (clone C106) mRNA is uniquely present in the peripheral columella cells of the cap, using antisense (D) but not sense (C) probes. E,F The GRP (clone C123) mRNA is distinctively shown in the lateral cap and in the root epidermal cells, using antisense (F) but not sense probes (E). Bar = 385  $\mu$ m

to the lateral cap cells and to the root epidermis (Fig. 8G), similar to intact roots (Fig. 5F).

## Discussion

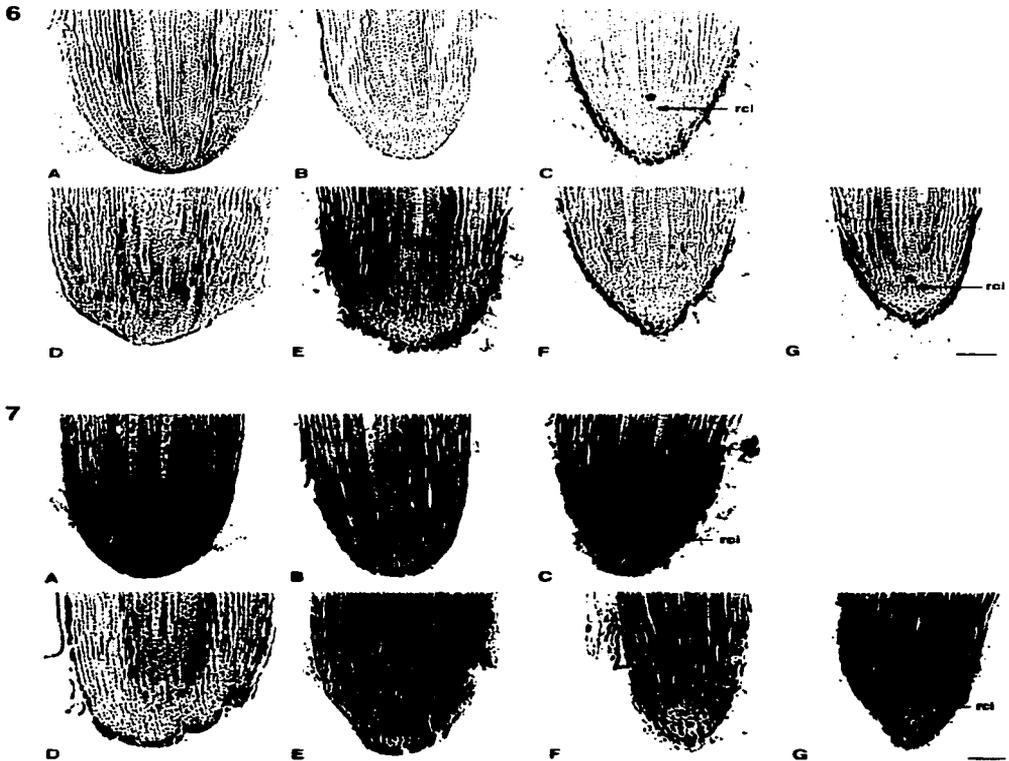
The isolation and characterization of genes uniquely expressed in the RC are the first steps for understanding the different activities known to occur in the cap. Further, the RC genes which we have here characterized are two putative cell wall proteins and one cell wall enzyme. Cell walls contain proteins and polysaccharides able to condition the development of a plant (Cassab 1998), and thus the characterization of cap-specific cell wall proteins may be an important step towards understanding how morphogenesis in the cap is regulated.

*Structure of the C109, C106 and C123 gene products.* One of the predicted proteins of the RC gene represented in clone C109 (ORF3) resembles the human tracheobronchial mucin (Dufosse et al. 1993) and a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored classical arabinogalactan protein (Youl et al. 1998). Arabinogalactan proteins have been found as a component of maize RC mucilage (Bacic et al. 1986). The mucilage is the primary site for colonization of the root by microbial symbionts and pathogens. Alternatively, ORF2 in clone C109 predicts a protein that is identical to ZmRCP2, a recently reported novel plant protein, specifically expressed in the root cap of maize (Matsuyama et al. 1999a). This protein contains six conserved cysteine residues in three pairs of Cys-X-X-X-Cys, and is similar to several proteins encoded in *Arabidopsis* expressed sequence tags and genomic sequences, and to a somatic-embryogenesis-associated cDNA from *Picea glauca* (Dong and Dunstan 1999; Matsuyama et al. 1999a). Since the mRNA for this gene is highly abundant in the secretory cells of the RC (Figs. 4B, 5D), one can suggest that the protein product is part of the mucilage secreted by the RC. In the mucilage, it may contribute to the physicochemical properties of this material and/or, it may interact with the microorganisms of the rhizosphere.

The other RC gene, clone C106, encodes GDP-mannose-4,6-dehydratase, which catalyzes the first step in the de-novo synthesis of GDP-fucose (Bonin et al. 1997). Fucose is a major component of the mucilage secreted by the RC of maize and is a distinctive feature of the particular differentiation state of the outer RC cells (Harris and Northcote 1970). In previous studies in which roots regenerating a cap were fed with [ $^3$ H]-L-fucose, the autoradiographs showed that the label was concentrated over the cell walls immediately distal to the RC initials and not over the outermost mucilage-synthesizing cells as anticipated (Barlow 1974). The mRNA for the fucose-synthesizing enzyme was primarily observed in the periphery of the central cap (Figs. 4B, 5D), confirming this observation.

Finally, clone C123 encodes for a putative cell wall GRP. Glycine-rich proteins are structural wall proteins of unknown function, and their location in the lateral RC and epidermis suggests a new possible function in root development (Figs. 4B, 5F). In monocots, the lateral RC does not originate independently from the rest of the RC. During embryogenesis in monocots, the RC seems to organize as a whole, and thus the cap is not a composite of cells having two different origins (von Guttenberg 1968). This is not the case with many dicots, in which the peripheral and columella cells have different origins during embryogenesis. The columella portion, as for example in *Arabidopsis*, arises from cells not connected to the dermatogen but to the hypophysis, whereas the side (flank) portions of the cap have origins in dermatogen-associated cells (Dolan et al. 1993). Thus, in *Arabidopsis*, the epidermis and lateral root cap cells have a common origin. Interestingly, in maize, C123 mRNA was labelled in both the lateral cap and epidermis, apparently indicating a distinction between the columella and the lateral RC cells. In addition, this labelling pattern presumably also indicates a similarity between the lateral RC and the epidermis.

*Expression of C109, C106 and C123 genes in regenerated caps after microsurgery.* We used a surgical approach to remove either the cap alone, or the cap plus the QC, and then followed the regeneration of the excised tissues in order to examine the questions of when and where the three RC-specific genes were expressed. Our long-term goal is to understand the spatial differentiation and development of the many activities known to occur in the cap. By monitoring regeneration following removal of the cap only, or the cap plus the QC we have been able to show that as the cap is re-formed its normal gene expression activities occur in an atypical pattern (Fig. 9A,B). Even without knowing the exact roles of these gene products in RC function, we can nevertheless suggest that the onset of these activities may be related to a recovering of functions by the cap (e.g. gravity perception, mucilage secretion, etc.). In this regard, the sequential regaining of cap gene activities (e.g. C123 activities appear first, followed in time by C106 and C109 in decapped roots) may suggest that subsequent later-expressed genes may be regulated by the products of the genes expressed earlier (Fig. 9A,B). Moreover,



**Fig. 6A–G.** Expression patterns of clone C109 during regeneration of the maize RC, or RC and QC. **A,B** Upon complete removal of the cap, clone C109 expression is not detected in apices that have been regenerating from reactivated distal QC cells for 24 h (**A**) and 48 h (**B**). **C** The signal reappears 72 h after excising the cap when both the QC (*asterisk*) and RC initials (*arrow*, *rci*) can be distinguished. **D–G** Apices of seedling roots from which the RC and QC have been removed. After surgery, regeneration of new apical tissues from the proximal root meristem was allowed to proceed for 24 (**D**), 48 (**E**), 72 (**F**) and 96 (**G**) h. **D** Clone C109 expression is hardly evident. **E** Once the incipient cap is present in an apex, clone C109 expression is abundant in the outer cell layers. **F, G** By the time the RC initials (*arrow*, *rci*) and the QC are recognizable, the intensity of the signal of this gene has slightly decreased. Bar = 378  $\mu$ m

**Fig. 7A–G.** Expression pattern of clone C106 during regeneration of the maize RC, or RC and QC. **A–C** In-situ hybridization analysis of

because the re-establishment of normal gene expression patterns appears after the re-formation of the QC, this suggests that the newly re-formed QC may exert some

control over the gene expression pattern within the cap. For example, must the QC re-form prior to the expression of the RC genes? The kinetics of C109

clone C106 in newly forming caps 24 (**A**), 48 (**B**) and 72 (**C**) h following excision of the cap only. **A,B** Removal of the cap results in the induction of clone C106 in the outer cell layers of the 48-h nascent cap (**B**) but not in apices which have regenerated for only 24 h (**A**). **C** The pattern of expression for this gene is re-established in the columella cells as in intact roots (Fig. 5D) once the RC initials (*arrow*, *rci*) are noticeable (*asterisk*, QC). **D–G** Apex regeneration 24 (**D**), 48 (**E**), 72 (**F**), and 96 (**G**) h following removal of the cap and the QC. **D,E** In apices which have regenerated for 24 and 48 h, the expression of clone C106 is detected in the outer cell layers of the emerging cap. **F** Progression in the development of the new cap coincides with a light expression of clone C106 in few columella cells. **G** By the time the QC (*asterisk*) and RC initials (*arrow*, *rci*) are restored, clone C106 is highly expressed in the columella cells of the newly formed cap and to a lesser extent in the outer secretory cells. Bar = 337  $\mu$ m

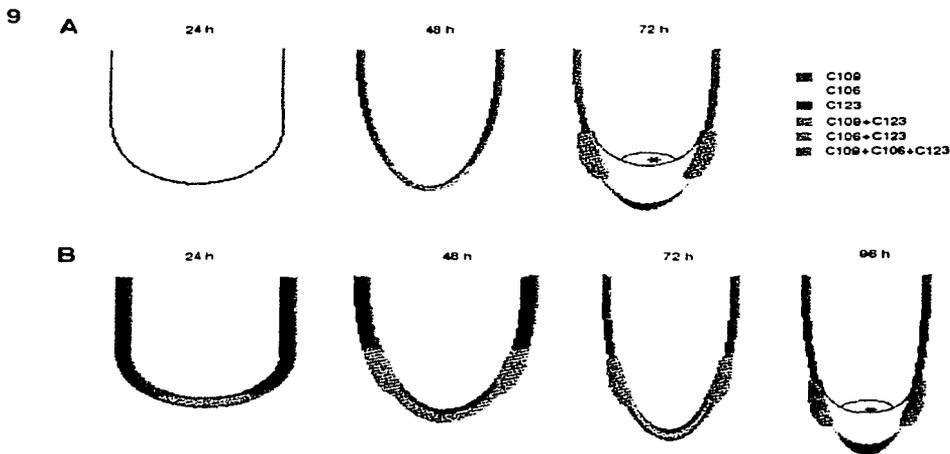
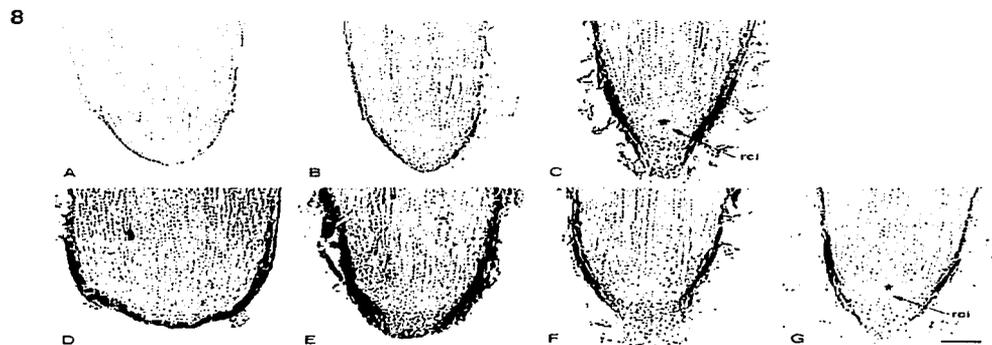


Fig. 8A-G. Expression pattern of clone C123 during regeneration of the maize RC, or RC and QC. A-C In-situ hybridization analysis of a putative glycine-rich cell wall protein (clone C123) in regenerating caps 24 (A), 48 (B) and 72 (C) h following excision of the cap only. A,B At 24 and 48 h after removal of the cap, clone C123 is primarily detected in the lateral region of the nascent cap and in the root epidermis. C In completely regenerated caps, clone C123 is highly expressed and distinctively localized in the lateral region of the cap and epidermis. D-G Apex regeneration 24 (D), 48 (E), 72 (F), and 96 (G) h after removal of the cap and the QC. D When the root proximal meristem is responding to the loss of the QC, clone C123 is intensely expressed in the newly formed cells of the future cap and in the root

epidermis. E As the development of the incipient cap progresses, clone C123 continues to be strongly expressed in both the lateral cap and epidermis but is also seen in the columella cells. F,G Once the original pattern of cells in the distal meristem (arrow, *rci*; asterisk, QC) is restored, expression of clone C123 begins to decrease and is limited to the lateral region of the newly formed cap and to the root epidermis. Bar = 395  $\mu$ m

Fig. 9A,B. Schematic representation of clones C109, C106 and C123 expression patterns during root cap regeneration after excision of the cap A or both the cap and the QC B. The diagrams correspond to the images shown in Figs. 6, 7 and 8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

97

expression may indicate that re-formation of the QC is apparently required for proper gene expression in the RC (Fig. 9B). On the other hand, expression of clone C106 in regenerated caps following RC and QC excision is detected in the outermost cells of the emerging cap (Fig. 9B). But, it is not until the QC has reappeared that the expression pattern for clone C106 is restored to the peripheral columella cells. The expression pattern of clone C123 differs. Because C123 is expressed so rapidly following surgical manipulations, one might speculate that its initial expression pattern in the regenerating cap is not regulated by signals released by the QC (Figs. 8D, 9B). However, as the QC is being re-formed, C123 expression is seen preferentially in the lateral RC (Fig. 8E-G) as in intact roots (Fig. 5F).

The kinetics of expression of C109 differs developmentally depending upon what tissues have been excised (RC or RC plus QC) (Fig. 9A,B). Hence, this protein may play an important role in indicating the cellular differentiation (activity or identity) of the mucilage-secreting cells when the QC is not yet re-established. On the other hand, the kinetics of expression of clone C106 (GDP-mannose dehydratase) in regenerated caps after excision of either the cap or both the RC and the QC, practically follows the same pattern. The signal is initially detected in the outermost newly formed cap cells (Fig. 9A,B) but once the RC has been completely remodelled as a morphologically distinctive structure, its expression closely resembles the pattern observed in intact roots (Figs. 7C,G, 5D). These observations suggest that the appearance of C106 in the outermost cap cells of early regenerated caps (Figs. 7B,E, 9A,B) may indicate that this gene plays a role in determining future cap activities such as mucilage secretion. In other words, signalling between newly divided cells seems to direct the choice of developmental pathway and some of these signals may arise from the wall itself. In fact, C106 expression in the outermost cap cells precedes the appearance of clone C109 after excision of the RC only (Figs. 6B, 7B), and both RC and QC (Figs. 6D, 7D, 9B). In addition, fucose is a distinctive feature of the outer RC cells (Harris and Northcote 1970). Interestingly, in regenerating caps, higher expression of clone C123 always antedates the appearance of both C109 and C106 (Fig. 9A,B). The early expression pattern of clone C123 in regenerating cap cells may indicate that this gene participates in early fate selection (future cap cells). In other words, nascent cells that express C123 could be identified by their newly emerged neighboring cells, and thus differentiate as cap cells.

Because the cap is the terminal-most tissue in the root we also wondered whether this expression pattern indicated structural (i.e. specific RC-expressed genes) or positional (i.e. genes expressed at the root tip) markers. Topping and Lindsey (1997) have recently distinguished these two types of markers (promoter trap marker) in roots of *Arabidopsis*. They showed that the promoter trap marker *POLARIS* (positional marker) was expressed in the correct position in root tips where one would expect to find several cell types, even if those cells did not actually form, as in *hydra* or *emb30 Arabidopsis* mutants.

This is in contrast to promoter trap markers such as *COLUMELLA* (structural marker) that was cell-type specific and was expressed only if the correct cell type (root cap) was differentiated. In maize roots following removal of the cap, the expression of clones C109 and C106 is not observed until roots have regenerated for 72 and 48 h, respectively (Figs. 6, 7, 9A). Because C109 and C106 are not appropriately expressed until a morphologically distinctive new RC is evident, we suggest that these may be structural, tissue-specific markers of activities specific to the RC. This contrasts with C123 which is expressed early in the regeneration process in the peripheral incipient cap cells. Consequently, we may hypothesize that C123 could be a positional marker, since it is expressed in whatever cells are the terminal, outermost cells of the new root cap (Figs. 8A,D, 9A,B). In early regenerated caps which developed from the proximal root meristem, expression of clone C123 in the epidermis was apparently higher (Fig. 8D,E). Here, clone C123 is now expressed in epidermal cells in close proximity to the meristem, and this expression disappeared once the QC had reformed. In the *Arabidopsis* root meristem, positional signals for proper differentiation appear to derive from more-mature cells to guide the cell fate of initials of the same cell type (van den Berg et al. 1995). In intact roots, C123 is not expressed in the newly formed epidermal cells but only in more-mature cells, further leading us to hypothesize that it might be a positional marker for the epidermis of the root. Collectively, these results are not simply the consequence of wounding associated with cap or QC surgery since several factors such as drought, radiation, heat or cold also produce an activation of the QC and regeneration of a new cap (Torrey and Feldman 1977). Further, we observe different patterns of expression of the three clones by excising either the cap only or both the QC and the cap. If wounding were responsible, the pattern of expression of these genes would be similar in all cases.

Previous work with *Arabidopsis* has shown that interactions between the QC and other root cells extend only to contacting cells (van den Berg et al. 1997). In maize we have shown that the QC re-forms, indeed needs to re-form prior to correct transcript expression, suggesting that the QC in maize, as in *Arabidopsis*, exerts control of the developmental status of contacting non-QC cells. But while our work with maize supports the view of van den Berg et al. (1997) of the importance of contact between the QC and adjacent cells, we also conclude that there may be fundamental differences in QC-regulation of transcript expression between these two root types. In maize, with its large QC, the timing of QC re-formation in relation to correct message re-expression in the cap suggests that the QC may regulate developmental events not only in contacting cells, but also in cells not contacting the QC, indeed some distance from the QC. Interestingly, one of the messages, C123, is re-expressed in the regenerating cap before the QC re-forms, but the location of this expression differs from that observed after QC re-formation. In addition, the mitotic activity of the RC initials was previously shown to be influenced by an extracellular signal from

the cap border cells (Brigham et al. 1998); thus the basis of cross-talk between these two populations of cells has already been established. Since the maize root meristem presumably utilizes a different mechanism for controlling cell differentiation than *Arabidopsis* the challenge is now to identify the QC signals that regulate the tissue-specific pattern of gene expression within the RC. It remains to be seen whether the putative cell wall components isolated in this work are implicated in guiding cellular differentiation in the cap. Critical testing of this hypothesis will rely on the molecular analysis of the C109, C106 and C123 gene activities, and the identification of the QC signals that control them.

We thank N. Kerk, J. Sussex and S. Gillmor for critical reading of the manuscript; S. Ruzin and D. Schichnes from the NSF Center of Plant Developmental Biology at UC Berkeley for excellent technical assistance with the in-situ hybridization experiments; René Hernández from the Sequencing Facility at IBI-UNAM, and the Sequencing Facility at UC Berkeley; and, finally Y. Sánchez, for outstanding aid with the figures. We also acknowledge L. Castrejón for collecting root caps. This project was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Grant No. 25186N), and National Science Foundation-CONACYT (Grant No. E120.508).

## References

- Bacic A, Moody SF, Clarke AE (1986) Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.) Plant Physiol 80: 771-777
- Barlow FW (1974) Regeneration of the cap of primary roots of *Zea mays*. New Phytol 73: 937-954
- Barlow FW (1975) The root cap. In: Torrey JG, Clarkson DT (eds) The development and function of roots. Academic Press, London, pp 21-54
- Bonin PC, Potter J, Vanzin GF, Reiter W-D (1997) The *MURI* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2085-2090
- Brigham LA, Woo H-H, Wen F, Hawes MC (1998) Meristem-specific suppression of mitosis and a global switch in gene expression in the root cap of pea by endogenous signals. Plant Physiol 118: 1223-1231
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 281-309
- Chen C-G, Pu Z-Y, Moritz RL, Simpson RJ, Bacic A, Clarke AE, Mau S-L (1994) Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. Proc Natl Acad Sci USA 91: 10305-10309
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res 12: 387-395
- 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
- Dong J-Z, Dunstan DI (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. Plant Mol Biol 39: 859-864
- Dufosse J, Pochet N, Audie JP, Duperrat GV, Laine A, Seuningen VI, Marrakchi S, Degand P, Aubert JP (1993) Degenerate 87 base pair tandem repeats create hydrophilic/hydrophobic alternating domains in human mucin peptides mapped to 11p15. Biochem J 293: 329-337
- Feinberg A, Volgestein B (1983) Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132: 6-13
- Feldman LJ (1976) The de novo origin of the quiescent center in regenerating root apices of *Zea mays*. Planta 128: 207-212
- Feldman LJ (1998) Not so quiet quiescent centers. Trends Plant Sci 3: 80-81
- Feldman LJ, Briggs WR (1987) Light-regulated gravitropism in seedling roots of maize. Plant Physiol 83: 241-243
- Fortin M-C, Poff KL (1991) Characterization of thermotropism in primary roots of maize: Dependence on temperature and temperature gradient, and interaction with gravitropism. Planta 184: 410-414
- Harris PJ, Northcote DH (1970) Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root tips. Biochem J 120: 479-491
- Hasenstern KH, Evans ML (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. Plant Physiol 86: 890-894
- Hawes MC, Lin HJ (1990) Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from the root cap of *Pisum sativum*. Plant Physiol 94: 1855-1859
- Ishikawa H, Evans ML (1990) Electropism of maize roots: role of the root cap and relationship with gravitropism. Plant Physiol 94: 913-918
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Matsuyama T, Yasumura N, Funakoshi M, Yamada Y, Hashimoto T (1999a) Maize genes specifically expressed in the outermost cells of root cap. Plant Cell Physiol 40: 469-476
- Matsuyama T, Satoh H, Yamada Y, Hashimoto T (1999b) A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. Plant Physiol 120: 665-674
- Moore R (1984) Cellular volume and tissue partitioning in caps of primary roots of *Zea mays*. Am J Bot 71: 1452-1454
- Nieto-Sotelo J, Kannan KB, Martinez LM, Segal C (1999) Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, *HSP101*, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. Gene 230: 187-195
- Okada K, Shimura Y (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. Science 250: 274-276
- Rochester DE, Winter JA, Shah DM (1986) The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp 70. EMBO J 5: 451-458
- Ruzin SE (1999) Plant Microtechnique. Oxford University Press, Oxford and New York
- Scheres B, McKhann H, van den Berg C, Willemsen V, Wolfenkelt H, de Vrieze G, Weisbeck P (1996) Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil 187: 97-105
- Takahashi H (1997) Hydrotropism: the current state of our knowledge. J Plant Res 110: 163-169
- Topping J, Lindsey K (1997) Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. Plant Cell 9: 1713-1725
- Torrey JG, Feldman, LJ (1977) The organization and function of the root apex. Am Sci 65: 334-344
- van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeck P, Scheres B (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. Nature 378: 62-65
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeck P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. Nature 390: 287-289
- von Guttenberg H (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel (Handbuch der Pflanzenanatomie. 2. vollständig neubearb. Auf. Spezieller Teil, Bd 8. T5. Borntraeger, Berlin)
- Willemsen V, Wolfenkelt H, de Vrieze G, Weisbeck P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. Development 125: 521-531
- Youl J, Bacic A, Oxley D (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7921-7926

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN