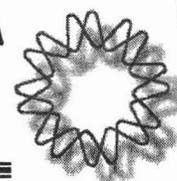




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



00551
00551

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DE POLEN Y COFIA DE *Zea mays*

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas
presenta

Yoloxochitl Sánchez Guevara

Directora de tesis
Dra. Gladys I. Cassab López

Cuernavaca, Morelos

Octubre, 2005

M: 349742



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Yoloxochitl Sánchez
Guevara

FECHA: 25 octubre 2005

FIRMA: 

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Gladys I. Cassab López en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM, con apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) registro 138509 y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM).

Durante el desarrollo del presente trabajo fungieron como comité tutorial la Dra. Gladys Cassab López, el Dr. Federico Sánchez Rodríguez, la Dra. Martha Vázquez Laslop y el M en C. Raúl Noguez Moreno.

Se contó también con la asesoría académica y técnica de: la Dra. Georgina Ponce Romero, la M en C. María Eugenia Campos Torres, la M en C. Rosario Luján Díaz, el Biól. Manuel Saucedo Ramírez, la Dra. Delfeena Eapen, la M en C. Maria Luisa Barroso García, la Dra. Edith García Hernández así como de la Dra. Ileana Echevarría Machado.

La revisión del trabajo final estuvo a cargo del Dr. Joseph Dubrovsky, la Dra. Gladys Cassab López, el Dr. Arturo Guevara García y el Dr. Luis Cárdenas Torres, del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM), y del Dr. Miguel Lara Flores, del Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM).

ÍNDICE

Resumen	5
Introducción	6
La raíz de maíz: la cofia	8
El polen de maíz: el tubo polínico	12
La posibilidad de convergencia en el patrón de expresión génica entre el polen y la cofia de raíz de maíz	17
Justificación	25
Hipótesis de trabajo	26
Objetivos	26
Materiales y métodos	26
Resultados y discusión	38
I. Detección de expresión de clonas aisladas de cofia de raíz de maíz	39
II. Identificación de genes con convergencia en el patrón de expresión entre polen y cofia de raíz de maíz	41
Obtención de un banco de cDNA de polen de maíz germinado <i>in vitro</i>	41
Selección de clonas con patrón expresión convergente en polen y cofia de raíz de maíz. Análisis de secuencias	46
Conclusiones y perspectivas	58
Referencias bibliográficas	61

RESUMEN

En los últimos años se han incrementado los estudios en plantas relacionados con el desarrollo del gametofito masculino, permitiendo la identificación de genes específicos de polen, principalmente aquellos relacionados con el crecimiento del tubo polínico.

Para estudios de convergencia genética y funcional como el que nos interesa, el siguiente paso a la identificación de genes en un tejido en particular, consiste en su caracterización y establecimiento de la relación morfofuncional entre ellos.

Durante la evolución de las plantas terrestres, la parte aérea y la parte subterránea fueron especializándose progresivamente para contender con las diferentes facetas de su ambiente: mientras que la parte aérea se encargaría de la recepción de energía y elaboraría metabolitos de los cuales depende su crecimiento, desarrollo y reproducción, las raíces anclarían la planta al suelo y absorberían agua y nutrientes; por lo que es posible considerar que exista un crecimiento interdependiente entre ambas partes.

En el presente proyecto analizamos la posibilidad de convergencia de patrones en expresión génica entre el tubo polínico y la cofia de la raíz, considerando que ambas estructuras presentan características fisiológicas comunes tal como respuestas a gradientes químicos y de humedad.

Para ello, se construyó un banco de cDNA de polen de maíz germinado *in vitro* con un título de 8×10^5 ufp/mL y del cual, mediante hibridación diferencial, se identificaron y aislaron cuatro genes con patrones de expresión preferencial en polen germinado y cofia de la raíz.

El estudio de estos patrones de expresión convergente, puede acercarnos a tratar de entender los mecanismos involucrados en el desarrollo celular e interacción con ambientes específicos como por ejemplo, respuestas a estrés.

INTRODUCCIÓN

Al hablar de plantas superiores, debemos recordar que éstas son organismos multifuncionales cuyo desarrollo está integrado por varios procesos con patrones establecidos. De manera independiente, cada planta contiene en su genoma toda la información necesaria para desarrollarse, siendo capaz de inducir o reprimir la expresión de un gen, o un grupo de éstos, para definir su morfología y función. Este trabajo, por razones prácticas, se reduce a un enfoque molecular y por lo tanto, es sólo una parte de un estudio integral de un organismo complejo como lo es el maíz.

La genómica se ha definido como el estudio de los genomas, es decir, un estudio que permite catalogar todos los genes que tiene un organismo y estudiar su organización y estructura de éstos en su conjunto, pero también intenta descubrir su función, los mecanismos implicados en la regulación de su expresión y el modo en que interactúan unos con otros en el interior de las células durante su ciclo de vida (Eguarte et al., 2003). Debido a la complejidad de los genomas eucariotas, una manera práctica para su estudio es hacerlo de manera parcial, estudiando por ejemplo, aquellos genes que se están expresando en un momento y bajo una condición determinada.

Los patrones de expresión de los genes en su conjunto revelan la identidad y el nivel de expresión de cada uno en una población definida de células. El término transcriptoma se refiere al estudio de los perfiles de expresión de todos los genes presentes en el genoma y gracias al análisis de un gen en particular, ahora se conocen algunas características funcionales y bioquímicas de tipos celulares específicos. Asimismo, sabemos que el transcriptoma está regulado por estímulos externos e internos, lo que nos permite tener una idea más completa de conceptos básicos de biología celular y respuestas biológicas ante diferentes señales, elucidando la posible función de genes de organismos tanto procariontes, como eucariontes (Lee y Lee, 2003).

Dentro de los organismos eucarióticos, incluyendo animales y plantas superiores, podemos encontrar múltiples diferencias de expresión génica. Los diferentes órganos y tejidos son generados para cada organismo durante su ciclo celular a través de una regulación temporal y espacial sobre la expresión selectiva en fracciones o regiones específicas del mismo genoma en diferentes células, entonces, el desarrollo es un proceso regulado por la expresión génica diferencial por el cual las células adquieren destinos particulares. Los estudios de patrones de expresión específicos ayudan a comprender como se establece el destino

celular y son más útiles cuando en un organismo se analizan la mayoría o idealmente todos los tipos celulares que lo constituyen (Birnbaum et al., 2003; Finnegan, 2001).

Las plantas superiores poseen un proceso de desarrollo relativamente simple, con sólo tres sistemas no reproductivos, menos de 25 tejidos principales y tipos de células por lo cual son un buen modelo para definir los patrones de expresión órgano-tejido específicos durante el desarrollo (Ligeng et al., 2005).

La mayoría de las plantas contienen DNAs que varían entre 10^9 a 10^{11} pares de bases. Aún cuando el maíz, *Zea mays*, no tiene el genoma más grande reportado en plantas (los miembros de la familia de las liliáceas tienen genomas más grandes que las gramíneas) éste cuenta con 5.5×10^9 pb de DNA por núcleo haploide; otro modelo vegetal, como *Arabidopsis thaliana*, tiene sólo el 1.27% del total del genoma del maíz (Fosket, 1994).

El maíz es un cultivo de gran importancia agrícola por su alta capacidad de adaptación y un elevado rendimiento. A pesar de que su ciclo de vida no es corto, la facilidad de modificación genética hace de esta planta un buen modelo para trabajo en el laboratorio.

El estudio de la embriogénesis del maíz, por ejemplo, ha permitido describir patrones temporales de desarrollo entre la parte subterránea y la parte aérea. En el embrión temprano del maíz, los planos de división celular no son consistentes entre una planta y otra, sin embargo, por el noveno o décimo día de polinización, un grupo de células con gran división celular se forma en la cara anterior del embrión, marcando el sitio de división para la formación de la raíz y de la parte aérea. Para el día trece, se pueden distinguir los dos nuevos primordios (apical y radicular) y es en este momento cuando se inicia el desarrollo de la cofia de la raíz. Este nuevo tejido puede distinguirse claramente en el día 20 después de la polinización. Durante los siguientes 25 días, la cofia continúa creciendo y sus células se diferencian. A los 45 días después de la polinización, el embrión se desarrolla totalmente (Barlow, 1975; Leszek et al., 2002). La Figura 1 representa el ciclo de vida de una planta de maíz.

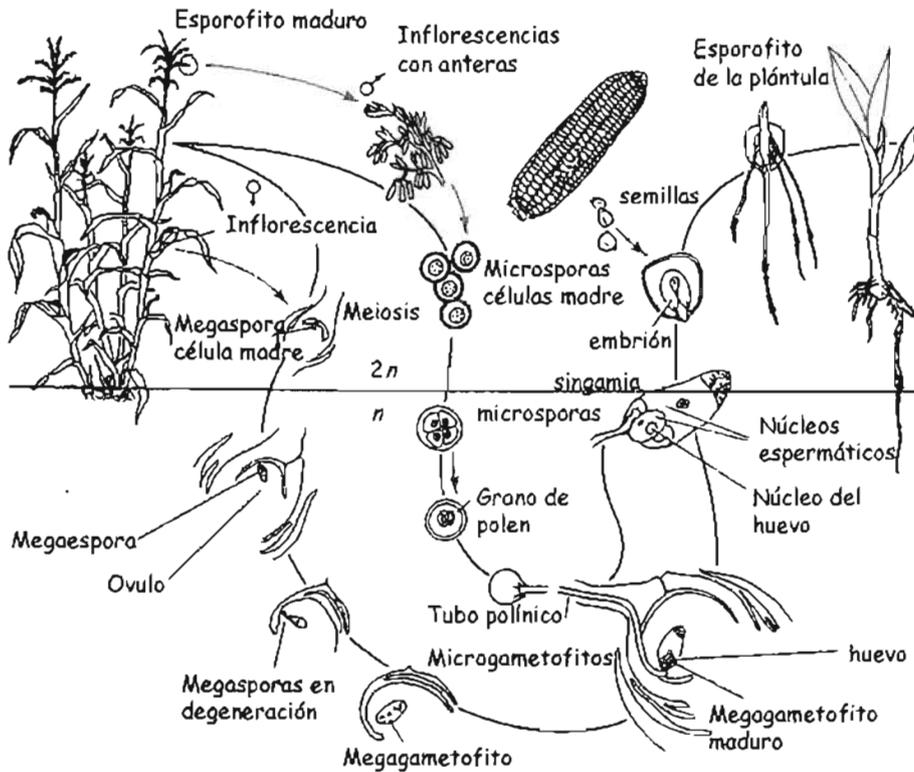


Figura 1. Esquema del ciclo del vida de *Zea mays*. Se observa el origen del polen y el tubo polínico, así como la emergencia de la raíz. (Tomado de Fosket, 1994).

En este trabajo nos ocuparemos solamente de la cofia de raíz y del polen, que coinciden por ser sistemas no fotosintéticos, carentes de cloroplastos. A continuación se mencionan algunas de las principales características de ambas estructuras.

La raíz de maíz: la cofia

El sistema radicular de una planta empieza su desarrollo a partir de la radícula del embrión. La radícula crece por fuera de la semilla después de que ésta absorbe cantidades suficientes de agua para iniciar la germinación, luego continúa su crecimiento como raíz primaria de la nueva planta. En condiciones óptimas de germinación, una raíz primaria de maíz de tamaño promedio (dos a tres centímetros) se obtiene en períodos cortos de tiempo (dos a tres días).

La punta de la raíz está cubierta por un grupo de células en diferentes etapas de diferenciación que constituyen la cofia de la raíz. La cofia se origina a partir de su propio meristemo y anatómicamente se ha dividido en regiones: células iniciales, células de la columela, cofia lateral y células de la periferia o del borde (Sievers y Braun, 1996).

El meristemo, llamado caliptrógeno presenta menor grado de diferenciación y altas tasas de división. Por su parte, las células de la columela tienen su origen en una división periclinal que ocurre en la región central del caliptrógeno. Estas células se distinguen por su forma alargada y por su alto contenido de amiloplastos muy desarrollados que se sedimentan en la parte inferior de la célula en respuesta a la gravedad.

Conforme se producen nuevas células por el caliptrógeno, en los siguientes dos o tres días, las células de la cofia se desplazan a lo largo de ésta y eventualmente grandes cantidades de ellas son liberadas hacia el medio y se diferencian en células de la periferia, conservando su actividad metabólica, pero con patrones de expresión génica muy propios. La cofia está en permanente flujo: nuevas células se mueven constantemente a través de la cofia y van remplazando a las miles de células de la periferia que serán liberadas de la cofia conforme la raíz crece a través del suelo. La cofia de maíz libera aproximadamente 10,000 células por día. Hawes y colaboradores, han propuesto que las células que son liberadas pueden influir en la expresión génica y en el comportamiento de algunos patógenos del suelo modificando para beneficio de la planta, la ecología de la rizósfera y protegiendo así a las raíces más jóvenes (Brigham et al., 1998).

Para el caso de plantas monocotiledóneas, las células que corresponderían a la cofia lateral se originan en el caliptrógeno, a diferencia las dicotiledóneas como *Arabidopsis*, en donde las células de la epidermis y las de la cofia lateral tienen un origen común (von Guttenberg, 1968 en Ponce et al., 2000). En la Figura 2 podemos observar un esquema de la punta de la raíz de maíz y los principales tipos celulares de la cofia.

Además de su estructura específica y su patrón de crecimiento, ahora se sabe que la cofia no participa solamente en el mantenimiento y protección del meristemo apical de la raíz, sino además tiene muchas otras funciones relacionadas con su desarrollo (Scheres et al., 1996) por ejemplo la percepción de estímulos ambientales y la secreción por exocitosis de mucílago - polisacáridos hidratados que contienen azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas, otras proteínas e iones que son liberados por vesículas del aparato de Golgi de células secretoras - que actúa como lubricante del ápice de la raíz, protegiéndola de

daños físicos provocados a lo largo de su paso por obstáculos del suelo (Bacic et al., 1986; Hawes et al., 2003). El mucílago participa de manera importante en la fisiología de la raíz produciendo un ambiente favorable a organismos benéficos como bacterias y posiblemente a algunos hongos, favoreciendo las asociaciones micorrízicas, además de facilitar la absorción de agua y nutrientes de la rizósfera. Este mismo puede ser capaz de inmovilizar iones tóxicos e influye en la relación de las partículas del suelo y la superficie de la raíz, protegiendo a la planta de largos períodos de desecación (Aiken y Smucker, 1996; Ying-Feig, 1998).

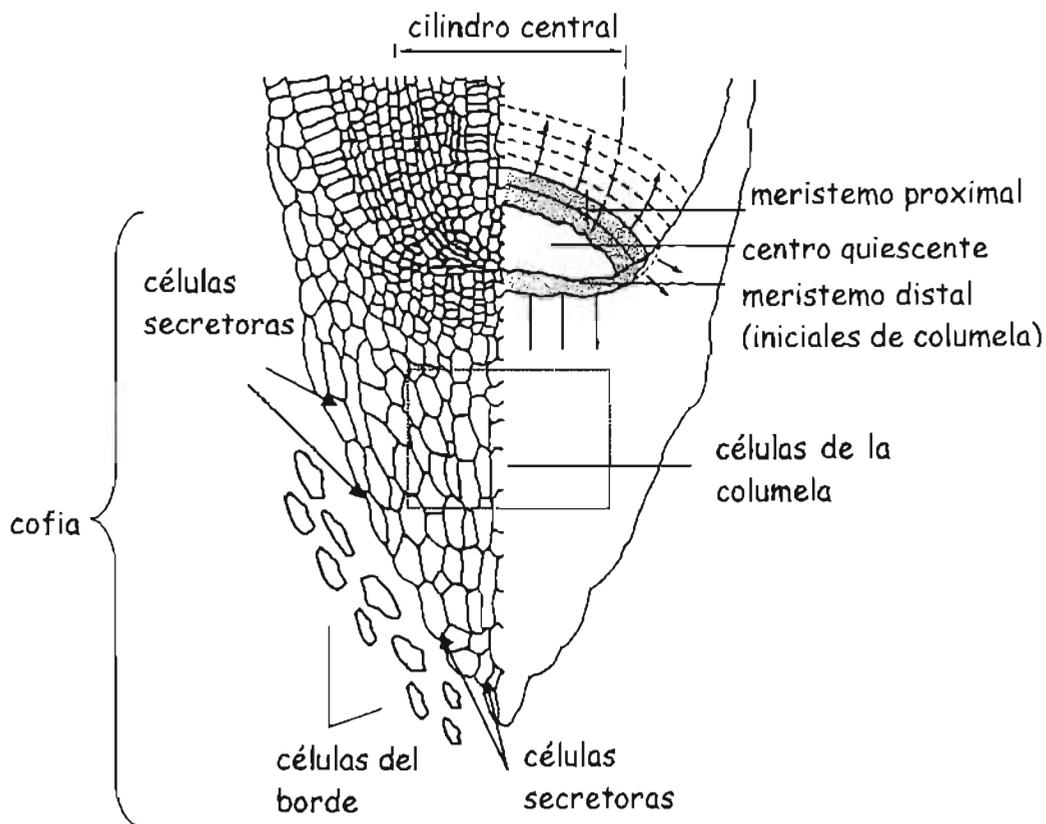


Figura 2. Esquema de la estructura de la punta de la raíz de *Zea mays*, mostrando la cofia y sus diferentes tipos celulares. Conforme ocurre una división celular en el meristemo de la cofia, las filas de células se desplazan hacia la periferia de ésta. En la región de la columela, las filas de células exhiben diferentes morfologías debido a su especialización. Conforme cada fila es desplazada, las funciones anteriores cesan y se inician nuevas funciones en las células que se van diferenciando. El tiempo requerido para que la cofia entera sea desplazada por un nuevo grupo de células, varía de 24 horas hasta siete días, dependiendo de las condiciones de crecimiento (modificado de Jiang et al., 2003 y Hawes et al., 2003)

A pesar de que la cofia sólo cubre el meristemo de la raíz en los ápices radicales de las plantas vasculares y no está presente en plantas no vasculares como hepáticas o musgos (Sievers y Braun, 1996), por ser una estructura con alta capacidad regenerativa, funciona como buen modelo de estudio, por ejemplo para entender organogénesis. La cofia de la raíz primaria de maíz tiene suficientes células y por lo tanto un tamaño adecuado que facilita su identificación y desprendimiento *in vitro*. Cuando a una raíz de maíz se le desprende la cofia, ésta última se restablece completamente en los siguientes tres o cinco días. (Barlow, 1975).

El conocimiento de genes expresados en la raíz y en la cofia se ha fortalecido con grandes avances, principalmente por estudios usando como modelo *Arabidopsis thaliana*.

Un ejemplo es el trabajo de Birnbaum y colaboradores (2003) quienes utilizaron la raíz de esta planta como modelo aprovechando su organización radial, su desarrollo continuo a partir de un grupo de células y la existencia de líneas transgénicas ya caracterizadas que expresan la proteína verde fluorescente, GFP, (*Green Fluorescent Protein*) en poblaciones específicas de células que facilita el análisis de sus mensajeros. En ese estudio, los patrones de expresión génica fueron analizados usando RNA de cinco diferentes tipos celulares que hibridan contra un micro arreglo de 22,000 genes. Los autores demuestran que 5,717 genes (correspondientes al 54%) presentan expresión diferencial e identifican la expresión de 884 genes de la cofia lateral en lo que llaman dominios de expresión localizados. Asimismo, establecen dominios de expresión para respuestas hormonales involucradas en el desarrollo de la raíz, así como un complejo patrón de regulación de genes. El mapa de expresión génica que proponen correlaciona grupos de genes a destinos celulares específicos, demostrando que la expresión no depende de las diferencias anatómicas, datos que constituyen el primer análisis de patrones de expresión de genes específicos de un tipo celular en raíz.

Otro estudio de genes en raíz es el trabajo de Fizames y colaboradores (2004), en el cual caracterizan el transcriptoma de la raíz de *Arabidopsis* utilizando un análisis serial de expresión génica, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) para identificar un gran número de transcritos presentes en raíz. En este caso, les permitió identificar 270 genes con expresión diferencial entre raíces y tallos y algunos genes con alta expresión en raíz, pero sin representación significativa en librerías SAGE de hojas y polen descritas en trabajos anteriores (Lee y Lee, 2003; Jung et al., 2003). Este resultado es una importante contribución a los estudios de expresión específica y análisis del transcriptoma (Fizames et al., 2004).

Más recientemente, Jiang y colaboradores (datos no publicados), analizan el perfil de expresión génica en la cofia de raíz sobre un micro arreglo de genes de arroz, comparando el meristemo proximal, el centro quiescente y la cofia de maíz, reconociendo un total de 677 genes expresados preferentemente en la cofia, de los cuales 238 pudieron ser relacionados con una función ya establecida. Dentro de la distribución funcional de los genes de la cofia, destacan por su abundancia aquellos relacionados con estrés biótico y abiótico así como algunos transportadores. El trabajo revela nuevos genes y vías asociadas con transducción de señales, regulación pos-transcripcional, respuestas mediadas por etileno y auxinas. Ejemplos de los resultados obtenidos por estos autores se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Genes con patrones de expresión específicos en la cofia de la raíz de *Zea mays* (tomado de Jiang et al., datos no publicados).

Categorías	Ejemplos
Metabolismo de carbohidratos	Sacarosa sintasa, genes de la vía de manosas
Estrés oxidativo	Glutación reductasa, tiorredoxina <i>h</i>
Estrés abiótico y biótico	Poliubiquitinas, proteínas de choque calórico, inhibidores de cisteínproteasas,
Pared celular	Cinamoil-CoA-reductasa
Regulación hormonal	Genes de vías de respuesta a etileno, genes estimulados por giberelinas
Transportadores	Transportadores de prolina, de poliamina, de histidina, de fosfatasa, de nitratos y de azúcares, ATPasa de protones en membrana
Regulación pos-transcripcional	Protein disulfido isomerasa

El polen de maíz: el tubo polínico

El gametofito masculino de las angiospermas, conocido como grano de polen, contiene toda la información genética requerida para su unión con el gametofito femenino durante la fertilización y la formación de un nuevo esporofito. En plantas superiores, el polen es haploide, bi o trinucleado y termina su desarrollo en la antera, una estructura esporofítica.

Estructuralmente el grano de polen se distingue por tener doble pared celular compuesta por una capa interna llamada intina y una externa llamada exina

(Mauseth, 1991). La intina generalmente se diferencia por sus microfibrillas celulósicas y zonas ricas en pectinas. A su vez, la exina se divide en una parte externa, la sexina, y una parte interna, la nexina. La pared celular del grano de polen presenta características químicas y morfológicas muy particulares, principalmente por la presencia de la esporolenina que es un polímero de naturaleza terpenoide que no se encuentra en ninguna otra estructura de la naturaleza. La esporolenina está compuesta por subunidades de carotenoides y es extremadamente resistente a la degradación, ya sea por enzimas o químicos, incluyendo los ácidos fuertes. Es gracias a la estabilidad que le confiere este polímero que los granos de polen pueden sobrevivir a largos períodos manteniendo su morfología y en algunos casos, su viabilidad (Esau, 1977).

En estados tardíos o avanzados del desarrollo del polen (cuando la capa del tapetum de la pared de la antera se desintegra) los contenidos celulares son depositados en la superficie del grano formando la capa llamada trifina (Taylor y Hepler, 1997). La composición de éste material es heterogénea e incluye ceras, lípidos, proteínas y pequeñas moléculas aromáticas como carotenoides, flavonoides, jasmonatos, fenoles y brasinosteroides (Mandava, 1988; Guyon et al., 2000).

El desarrollo del polen ocurre en el interior de la antera llamado lóculo. Al igual que en animales, el desarrollo de los gametos en plantas también ocurre bajo el cuidado de células somáticas "cuidadoras", las células del tapetum, que forman la pared interna del lóculo de la antera. Existen evidencias citológicas, genéticas y moleculares que confirman el papel central del tapetum en el desarrollo del polen (Twell et al., 1989; Bedinger, 1992). Por ejemplo, un gen citotóxico expresado en tabaco transgénico bajo el control de un promotor específico del tapetum, lo destruye causando que el polen no se desarrolle (Bedinger et al., 1994).

En la antera se produce una tétrada de microsporas haploides después de que la meiosis se ha completado. La división de la microspora requiere de dos días en el maíz. Al final de este período, el núcleo de la microspora se divide para formar dos células, la célula vegetativa y la célula generativa con diferentes cantidades de citoplasma.

En la planta de maíz la célula generativa se divide una vez más formando dos células espermáticas. El período para que se complete la mitosis de la microspora hasta la dehiscencia de las anteras, será de seis a siete días. Una vez liberado el grano de polen maduro, éste será libre hasta antes de ser depositado en el estigma de la flor. Allí comienza otra fase de su desarrollo, cuando se hidrata, germina y, a través de un poro, emerge el tubo por donde el esperma es transportado al gametofito femenino (Bedinger, 1992; Mascarenhas, 1993). En la Figura 3 se observa una representación esquemática de un tubo polínico(maíz).

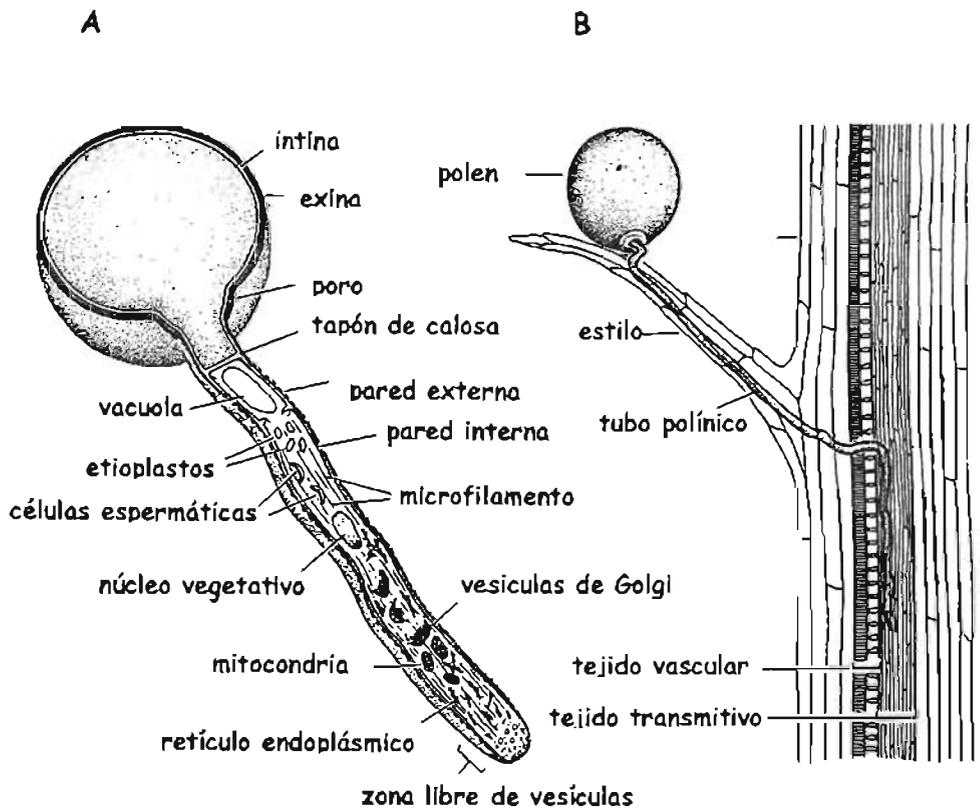


Figura 3. Representación esquemática de un grano de polen de maíz germinando. A) Dentro del citoplasma los organelos, células espermáticas y núcleo vegetativo, mantienen una posición relativa respecto a la punta conforme migran. Los tapones de calosa se forman detrás del citoplasma una vez que éste se desplaza alejándose del grano de polen. B) se muestra una parte del estilo, la posición del tejido de transmisión y el tejido vascular. Se esquematiza sobre el estilo un grano de polen de maíz y el tubo polínico llegando hasta el tejido de transmisión (tomado de Bedinger et al., 1994).

El grano de polen maduro contiene RNAs mensajeros (mRNA) sintetizados a lo largo de todo su desarrollo, cuyos productos serán utilizados durante la germinación y el crecimiento inicial del tubo polínico (Mascarenhas, 1990; Frankis, 1990), así que cuando el grano de polen cae sobre un estigma receptivo, el RNA almacenado, las proteínas y las moléculas bioactivas, permiten una germinación rápida y la formación de un tubo que penetra y crece en el estilo

(Taylor y Hepler, 1997). La pared del tubo polínico además tiene una cubierta interna de calosa cubierta por una capa fibrilar externa compuesta de pectinas con hemicelulosa y celulosa (en el polen no germinado, la pectina se encuentra acumulada en los poros por los que emerge el tubo polínico). La calosa está ausente en la punta del tubo polínico. La pared de éste es químicamente diferente a las paredes celulares de células somáticas, principalmente por la presencia de calosa ($\beta(1-3)$ glucano) y $\alpha(1-3)$ arabino)(Esau, 1977).

El tubo polínico crece de manera descendente a lo largo del estilo y hacia el saco embrionario que contiene el óvulo. El tubo polínico debe penetrar la superficie del estigma lo cual logra mediante la secreción de enzimas, por ejemplo cutinasas. Crece por elongación debida a la deposición de material de pared celular (pectinas, calosa y pequeñas cantidades de celulosa) entre las células del estilo, inclusive algunas veces a través de canales especiales. A lo largo de su recorrido, es capaz de reconocer estímulos que le permiten alcanzar el gameto femenino y es protegido y alimentado por el tejido esporofítico. Las secreciones del tejido estilar son las que se encargarán de guiar y nutrir al tubo polínico hasta su llegada al óvulo. Casi todo el citoplasma es localizado en la punta del tubo polínico, el resto del tubo y el grano de polen, contienen una vacuola (Frankling-Tong, 1999).

Este tipo de crecimiento (llamado crecimiento en punta) es poco usual y así como sucede en los pelos radicales de las raíces (Schiefelbein et al., 1993) y en las hifas de los hongos, consiste principalmente en la elongación de la punta, más que por extensión longitudinal de las paredes o división celular, que es el patrón normal de crecimiento en las plantas superiores.

Cuando el tubo polínico entra al micrópilo del óvulo, alcanza el saco embrionario en donde las células espermáticas son descargadas, una de ellas migra hacia la célula huevo estableciendo el cigoto. El segundo núcleo espermático liberado migra desde la sinérgida hasta la célula central, formando el endospermo (Mauseth, 1991). Entonces, el propósito final del largo crecimiento del tubo polínico es la deposición de dos células espermáticas en el saco embrionario, permitiendo la doble germinación, por lo que su crecimiento se considera esencial en la reproducción sexual del saco embrionario (Hepler et al., 2001).

Además de su participación en la reproducción sexual, con un importante efecto biológico, el tubo polínico es un atractivo sistema de estudio para el crecimiento celular y la morfogénesis (considerando que no existe división celular), así como para el reconocimiento célula-célula, comunicación y señalización intra e intercelular (Bedinger, 1992; Feijó et al., 2001). Su crecimiento es un proceso con características importantes y únicas: alcanza tasas de crecimiento hasta de 1

cm/hora en maíz; es altamente polarizado, concentrado en la punta y posee un mecanismo para guiarse que determina su dirección (Bedinger, 1994).

Dado que el tubo polínico tiene un papel importante dentro del ciclo reproductivo de las plantas, los estudios bioquímicos y moleculares que lo describen han incrementado, principalmente aquellos encaminados a la caracterización de genes específicos del polen. A pesar de su estructura considerada algunas veces tan simple, la producción de un grano de polen funcional involucra una serie de procesos paralelos regulados por desarrollo y requiere de la expresión de un gran número de genes esporofíticos, como aquellos del tapetum de la pared de la antera y gametofíticos del núcleo vegetativo y generativo muchos de ellos órgano o tejido específicos (McCormick et al., 1981; Mascarenhas et al., 1984; Sari-Gorla et al., 1997; Taylor y Hepler, 1997).

Los estudios de fisiología y bioquímica del polen clásicos realizados en la década pasada (principalmente por el grupo de Mascarenhas y colaboradores) y actualmente reforzados con avances a nivel genético, ya hablaban de un grupo reducido de genes involucrados en el desarrollo del polen, su crecimiento y las funciones de interacción con el tejido femenino (Pina et al., 2005).

En angiospermas la diferenciación y el desarrollo del gametofito masculino dependen de la expresión del genoma haploide después de una meiosis. Los granos de polen maduros contienen RNA cuyas proteínas funcionan durante los estados de maduración del tubo polínico y su germinación. Cuando el grano de polen sale de la antera contiene mRNAs ya sintetizados. La complejidad del mRNA en polen de maíz es de 2.4×10^7 nucleótidos, es decir, 24,000 diferentes mRNAs. Se ha estimado además que el 10% de las secuencias expresadas en polen son específicas para éste, por lo que se propone que el programa genético del polen en desarrollo es extensivo y con gran coincidencia (90%) entre la actividad de genes en el gametofito masculino y el esporofito (Mascarenhas y Frankis, 1980; Mascarenhas, 1990).

Así, dentro de los trabajos enfocados a reconocer aquellos genes que se expresan específicamente durante la germinación del polen, se han encontrado poligalacturonasas, extensinas, cinasas e inhibidores de proteasas, por mencionar algunos que se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Ejemplos de genes de polen expresados durante la germinación del tubo polínico (Modificada de Taylor y Hepler, 1997).

Gen	Función	Localización	Determinado por
<i>CDPK</i>	Proteína cinasa dependiente de Ca^{2+}	Polen en germinación	Northern blot, Western blot y supresión por oligonucleótidos antisentido
<i>Pex1</i>	Quimera semejante a extensina	Pared celular del tubo polínico, capa de calosa	Inmunolocalización
<i>PGc9</i>	Poligalacturonasa	Pared celular del tubo polínico	Inmunolocalización, plantas transgénicas (tabaco), actividad del gen reportero GUS
<i>W2247</i>	Poligalacturonasa	Punta del tubo polínico	Plantas transgénicas (tabaco), detección de expresión transitoria del gen reportero GUS
<i>Zm13</i>	Inhibidor de proteasas (homólogo a <i>LAT52</i>)	Citoplasma de la célula vegetativa	Hibridación <i>in situ</i>
<i>ZmPRK1</i>	Receptor cinasa	Pared celular del tubo polínico	RT-PCR con oligonucleótidos degenerados
<i>Rop1</i>	GTPasa	Punta del tubo polínico en germinación	Obtención de líneas transgénicas en <i>Arabidopsis</i> que sobreexpresan <i>Rop1</i>

Algunas abreviaturas: *CDPK* (calcium-dependent protein kinase), *Pex1* (pollen extensin-like protein), *PGc9* (cytoplasmic polygalacturonase), *Zm13* (*Zea mays*, inhibidor de proteasas), *ZmPRK1* (*Zea mays* serine-threonine protein kinase), *LAT* (late pollen-specific protein).

La posibilidad de convergencia en el patrón de expresión génica entre la cofia de raíz y el polen de maíz

Durante años se han identificado genes que se expresan de manera específica en un órgano o en un tejido. Un ejemplo eran las nodulinas en leguminosas, cuya expresión se relacionaba exclusivamente con la presencia de nódulos, órgano donde las bacterias llevan a cabo la fijación de nitrógeno. Actualmente, se ha comprobado que muchas nodulinas se expresan también en otros órganos de las plantas y participan en otros eventos distintos a la simbiosis. Por ejemplo, la expresión de la leghemoglobina, nodulina encargada del transporte de oxígeno, se ha detectado en raíz. La uricasa II, una nodulina tardía encargada de producir ureidos que el nódulo simbiótico transporta hacia la parte aérea, ha sido

detectada en los cotiledones, raíz e hipocótilo de frijol en desarrollo y en raíces, tallos y hojas de plantas adultas de *Leucaena*, sugiriendo una nueva función en el metabolismo y desarrollo de la planta no simbiótica (Capote-Mainez y Sánchez, 1997). Este tipo de resultados resalta la importancia de los análisis de expresión génica y su posible convergencia, aún de transcritos ya caracterizados.

A pesar de que la regulación de la expresión génica es más complicada de entender que la estructura misma de un gen (Rubin, 2001), los perfiles de expresión de distintos genes han sido determinados y comparados por distintos métodos experimentales. Fue en estudios con isoenzimas que se sugirió la posibilidad de coincidencia en los patrones de expresión esporofítica y gametofítica. En maíz, centeno y tomate, del 60 al 72% de las isoenzimas analizadas se expresan tanto en tejidos gametofíticos como esporofíticos (Tanksley et al., 1981; Sari-Gorla et al., 1986; Pedersen et al., 1987).

Twell y colaboradores (1989), caracterizan tres genes de expresión tardía (*LAT56*, *LAT52* y *LAT59*, llamados así por late expression) expresados en polen de tomate que muestran secuencias similares a proteínas degradadoras de pectinas. Por medio de un análisis tipo Northern blot, encuentran que *LAT59* es expresado en la pared celular de la antera y mediante una fusión *LAT-GUS* en plantas transgénicas, observa también expresión en cofia de raíz y en el endospermo de jitomate.

Mediante estudios de cinética de hibridación tipo Northern blot, se confirmó la convergencia de patrones de expresión gametofítica-esporofítica, antes mencionado, así como la complejidad de la expresión génica haploide. Estos resultados permitieron sugerir, por ejemplo, que el polen de *Tradescantia paludosa* y *Zea mays* contienen aproximadamente de 20,000 a 24,000 secuencias diferentes de mRNA (Willing y Mascarenhas, 1984; Willing et al., 1988). Para estas especies, la coincidencia entre los mensajeros presentes en la raíz y en el polen es de 65%.

En otros trabajos de hibridación con bancos de cDNA, se sugiere que la mayoría de los mRNAs expresados en polen muestran coincidencia en el esporofito y en el gametofito y que sólo el 10% de los mensajeros expresados en polen pueden ser considerados como específicos de polen (Stinson et al., 1987; Mascarenhas, 1990; Honys y Twell, 2003). Sin embargo, en estas estimaciones no se consideran las hibridaciones-cruzadas entre genes miembros de familias relacionadas.

Debido a que el crecimiento del tubo polínico puede compararse al descrito en pelos radicales de la raíz, existen numerosos estudios que describen mecanismos similares para ambas estructuras, por ejemplo, evidencias del control de

crecimiento por actina y gradientes de calcio localizados en la punta mediados por GTPasas. El trabajo de Jones et al. (2002), consistió en la caracterización de un gen polen-específico de *Arabidopsis* que se habían descrito como involucrado en controlar el crecimiento polar de tubos polínicos. El interés consistía en determinar si esas proteínas denominadas Rops tenían un papel análogo en las células de los pelos radicales. El crecimiento de punta en pelos radicales y tubos polínicos, está dirigido por gradientes de iones de calcio de la punta a la base (Joss et al., 1994). Sin embargo, el crecimiento de los pelos radicales es además dirigido por una polaridad endógena que no se encuentra en los tubos polínicos (Bibikova et al., 1997). De manera similar, la polaridad en el crecimiento de los pelos radicales está mediada por microtúbulos, mientras que la elongación del tubo polínico es casi independiente de éstos (Joos et al., 1994). Pero a pesar de las diferencias establecidas entre los pelos radicales y los tubos polínicos, muchos aspectos del papel de Rop2 en el control del crecimiento en punta de los pelos radicales, son similares a aquellos de Rop1 en los tubos polínicos. Hay evidencias que sugieren que Rop1 controla el crecimiento de punta de los tubos polínicos a través de sus efectos en F-actina localizada en la punta y los gradientes de calcio en ese mismo lugar. Rop2 parece regular el crecimiento de punta de pelos radicales mediante un mecanismo similar (Joss et al., 1994).

Otro ejemplo para tratar de determinar si el polen y la cofia tienen algún punto de convergencia génica, es *ZmMADS2*, el cual, a pesar de ser definido como un gen expresado en polen y durante la germinación del tubo polínico, Heuer y colaboradores (2000), también detectan una baja expresión en las puntas de la raíz y falta de expresión en otros tejidos meristemáticos, cuando tamizaban una librería de cDNA de maíz en búsqueda de clonas codificantes para factores de transcripción. Así como *ZmMADS2*, la expresión en polen y en raíces también se ha descrito para una proteína dedos de zinc en petunia, RhoGTPasa de chícharo y STP4, un transportador de monosacáridos en *Arabidopsis*. Como perspectivas de su trabajo, Heuer propone el aislamiento de genes blancos y el análisis de mutantes de genes como *ZmMADS2* por knock-out, para obtener más información sobre regulación por proteínas MADS-box y posibles procesos comunes entre el polen y las raíces.

Actualmente, con el uso de métodos experimentales más avanzados, entre los que se encuentran la cuantificación de hibridaciones DNA-RNA, hibridaciones sustractivas, elaboración de bancos sustractivos de cDNA, *differential display*, macro y micro arreglos, SAGE y MPSS (*Massive Parallel Signature Sequencing*), se pueden medir de manera simultánea la abundancia de miles de transcritos, su expresión génica y los cambios en ésta, permitiendo realizar estudios a gran escala (Kaufman et al., 1995; Lockhart, 2000). Sin embargo, la mayoría de estos

trabajos se han hecho solamente utilizando algunos modelos como *Arabidopsis thaliana*, tanto para órganos reproductivos (estambres, pistilos, silicuas y semillas), como para los vegetativos (raíz, tallo y hoja), aprovechando que su genoma ha sido totalmente secuenciado.

Estudios recientes con hibridaciones RNA-DNA han revelado mucho sobre la complejidad del mRNA en seis tipos de órganos de tabaco (*Nicotiana tabacum*), sugiriendo que aproximadamente de 24,000 a 27,000 especies de mensajeros están presentes en hoja, raíz, tallo, pétalos, anteras y ovarios (Ligeng et al., 2005). Sin embargo, estos datos proveen muy poca información sobre las identidades y la abundancia relativa de las especies de mensajeros individuales expresados en cada tejido. Otros estudios para determinar los patrones de expresión de genes en plantas, incluyen análisis Northern blot e hibridaciones *in situ* y a pesar de que estos métodos nos dan más detalles sobre dónde y cuándo se expresa un gen, sólo se han aplicado para un grupo reducido de genes.

Honys y Twell (2003), presentan un extenso estudio del transcriptoma de polen de *Arabidopsis*, basado en análisis de micro arreglos, considerado como el primer intento para caracterizar el transcriptoma del gametofito sobre todo el genoma. En comparación con el transcriptoma del tejido esporofítico durante el desarrollo, el de polen no resulta ser tan complejo, pero si presenta una composición muy peculiar. Los autores identifican 992 mRNAs expresados en polen, que corresponde al 40% de los descritos como específicos de éste. Un análisis de la composición funcional del transcriptoma de polen, muestra sobre-expresión de mRNAs que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo de pared celular, citoesqueleto y señalización y, por otra parte, una baja representación de mRNAs involucrados con la transcripción, síntesis de proteínas y metabolismo. Con este tipo de estudios además se confirma la convergencia en expresión génica, pues 61% de los genes son expresados en el esporofito-gametofito, que otros autores ya habían descrito para tres especies. Otro antecedente del análisis del transcriptoma en el tejido esporofítico, son los trabajos descritos para epidermis de la hoja y células del mesófilo de *Arabidopsis* (Honys y Twell, 2003).

En el mismo año, Lee y Lee caracterizan los patrones de expresión de polen de *Arabidopsis* utilizando un análisis tipo SAGE. De acuerdo a sus resultados, los autores concluyen que los perfiles de transcripción del polen confirman la función reproductiva de éste. Una clasificación funcional de los genes expresados en el gametofito masculino, revelan que el 40% de los transcritos están involucrados en biogénesis de pared celular (pectina metilesteras, poligalacturonasas y pectato liasas). Nuevamente, como lo habían descrito Honys y Twell (2003), los

genes con menor expresión son los relacionados con energía y síntesis de proteínas (cuya expresión se observa preferentemente en hojas).

En el trabajo de Lee y Lee se determina la expresión de genes de polen bajo una condición de estrés, tratamiento en frío. A pesar de que la gran mayoría de transcritos no se alteran bajo condiciones extremas (0°C), el crecimiento del tubo polínico y la producción de semillas si se reducen, así como los niveles de expresión de algunos genes involucrados en la aclimatación al frío, confirmando que el polen sea catalogado como sensible al frío. Uno de los datos novedosos que presentan en este trabajo es la comparación de transcritos de células de polen con aquellos identificados en otros tejidos. Como datos importantes, se muestran que el número de transcritos únicos en polen compartidos con plántulas y semillas fue de 42 y 54% respectivamente, porcentaje que coincide con evidencias anteriores para *T. paludosa*, maíz y *Arabidopsis* (Willings y Mascarenhas, 1984; Willing et al., 1988; Honys y Twell, 2003). Entre los transcritos que se observaron dos o más veces en polen, solamente el 10% son comunes con hojas y 12% con plántulas. Por otro lado, entre los dos tejidos vegetativos, plántulas y hojas, encontramos una afinidad del 40%. Con base en estos porcentajes, los autores concluyen que esto implica que el sistema de regulación génica en el polen es diferente a la de los otros dos tejidos vegetativos (Lee y Lee, 2003). Aún cuando los datos arrojados por este estudio parecen reducir la posibilidad de convergencia en expresión génica entre polen y cofia (que es la hipótesis de este trabajo) tampoco la descartan en su totalidad.

Trabajos de Ligeng y colaboradores en 2005, concluyen que cada órgano o tipo de tejido tienen un patrón de expresión génica definido y que es posible hablar de una convergencia de expresión génica entre órganos, el cuál está muy relacionado con la analogía biológica de los tipos de tejidos.

Pero ¿qué funciones pueden tener en común la cofia de la raíz y el polen o el tubo polínico? Mencionaremos a continuación algunas de las posibles coincidencias entre estas dos estructuras, principalmente, durante el desarrollo de sus principales funciones biológicas, que son asegurar la reproducción y el crecimiento que permitan, a un largo plazo, la continuidad de la especie.

Tanto el polen como la cofia de raíz son estructuras que responden a estímulos trópicos, como gradientes de humedad (hidrotropismo) o sustancias químicas (quimiotropismo). El grano de polen es capaz de reconocer estímulos que le permitan al tubo polínico alcanzar el gameto femenino a través del estilo; esto es, muestra un comportamiento quimiotrópico. Por su parte, la raíz reconoce estímulos que le permiten un crecimiento en un medio favorable. Por ejemplo, ante el fenómeno de gravedad se han identificado células con amiloplastos

situadas en la región central de la columela como las células gravireceptoras. Los estímulos químicos y/o físicos percibidos por ambas estructuras promueven respuestas trópicas reguladas.

En angiospermas la interacción entre el estigma y el grano de polen es el primer evento de reconocimiento para iniciar la fertilización. El grano de polen, a través del tubo polínico se comunica de manera directa con el estigma de la flor con lípidos, polisacáridos y glicoproteínas de la superficie estigmática. Esta interacción polen-estigma es dirigida por exudados en el caso de los estigmas húmedos o por la cubierta del grano de polen para aquellas especies con estigmas secos, como el maíz.

Ahora se conoce más acerca de cómo ocurre la atracción del tubo polínico hacia el saco embrionario. Se han descrito los factores esporofíticos que se expresan en el estigma y en el estilo y que pueden ser claves para que el tubo polínico llegue e ingrese por el micrópilo para descargar las células espermáticas, por ejemplo, proteínas específicas del tejido de transmisión-TTS-, ácido gama-amino butírico en *Arabidopsis* y quemocianina en lili (McCormick y Yang, 2005), incluso, existen mutantes como *magatama*, en *Torenia fournieri*, *feronia* y *sirena* en *Arabidopsis thaliana*, cuyos estudios concluyen que la señal guía puede provenir de las células sinérgicas del óvulo. Marton y colaboradores describen un péptido pequeño como la posible molécula involucrada en el inicio de la doble fertilización, sin embargo, McCormick y Yang, descartan esta idea argumentando que este proceso ocurre de manera más integral y su explicación no debe reducirse a una única molécula (Marton et al., 2005).

Por otra parte, tanto la cofia como el tubo polínico, pasan por procesos de desecación ya sea naturales o debidos al medio externo.

Cuando el polen es liberado de la antera está parcialmente deshidratado, con un contenido de agua de 6 a 60% (el grado de deshidratación varía según la especie), pero a pesar de esta pérdida de agua, éste será viable si los cambios que ocurren son reversibles durante la rehidratación (Taylor y Hepler, 1997). Durante una primera fase habrá intercambio de señales entre el polen y el estigma. Posteriormente se presenta una invaginación de la intina por la zona de colpos y la formación de una extensión que llegará a las papilas del estigma. Si la superficie del estigma está humectada, es posible una rápida difusión de proteínas y glicoproteínas del grano de polen cuando éste se deposita en la superficie femenina (materiales difundidos provenientes de la exina y de la intina). También en las papilas del estigma se han identificado glicoproteínas encargadas del reconocimiento e hidratación del grano de polen. Cuando el agua se mueve desde el estigma hasta el grano de polen, éste requiere de la síntesis

de proteínas, como pectinas de la exina que rodean el área del sitio de emergencia del tubo polínico. Evidencias recientes sugieren que la hidratación puede estar mediada por acuaporinas (Mu et al., 1994; Ikeda et al., 1997; Tung et al., 2005).

La ornamentación de la exina permite tener una superficie idónea para almacenar sustancias solubles que son importantes para la interacción del tubo polínico con el estigma. La superficie del estigma generalmente es húmeda, lo que permite que haya una buena difusión de proteínas y glicoproteínas desde la exina (de la cual son liberados en segundos) y de la intina (de la cual salen en minutos) a través de las aperturas. Estos materiales que interactúan en la superficie del estigma incluyen probables glicoproteínas. Este tipo de interacciones afectan las cualidades adhesivas del estigma permitiendo que el grano del polen se adhiera de manera casi permanente, son estas mismas interacciones las que facilitan la germinación e hidratación del grano de polen con el subsecuente crecimiento del tubo polínico.

Asimismo, todos estos procesos pueden ser impedimentos de germinación en caso de que en la superficie existan granos de polen incompatibles. La difusión de materiales desde la pared celular a la superficie del estigma es un ejemplo del reconocimiento célula-célula. En las gramíneas, la inhibición de la hidratación de los granos de polen es un paso importante en la reacción de incompatibilidad.

La raíz también tiene la capacidad de prevenir desecación en la planta. Una de las funciones del mucílago, con ayuda de las células que se desprenden del borde de la cofia, es la de disminuir la resistencia ocasionada por la fricción durante el crecimiento en el suelo y proteger a la raíces en crecimiento de la posible abrasión por las partículas del suelo (Matsuyama et al., 1999). Las arabinogalactanas (componentes del mucílago) se unen a las partículas del suelo y aseguran que se mantenga las capas o películas de agua, confiriendo una gran capacidad de retención de ésta dentro y alrededor de la raíz.

Otro aspecto en común puede ser a nivel de estructura de la pared celular. Para que el tubo polínico y las células de la cofia puedan migrar y alargarse en el interior de estructuras o en el medio externo respectivamente, se debe pensar en células con cierta flexibilidad de pared celular para un rápido crecimiento. En el caso del tubo polínico se requieren paredes celulares flexibles en las que se han observado expansinas y extensinas que les permiten ser suficientemente sólidas para poder penetrar la cutícula del estigma de la flor, atravesar varias capas celulares disolviendo la lamela media, alcanzar el tejido transmisor y alargarse hasta llegar al saco embrionario (Brett y Waldon, 1990). Incluso desde el momento en que el grano de polen es depositado en el estigma, existe una

barrera para la hidratación y germinación del polen que debe ser eliminada por acción de cutinasas (esterasas) presente en la capa más externa del estigma y de la superficie del grano de polen (Tung et al., 2005; Edlund et al., 2004).

La polinización segura implica la expansión o relajamiento de la pared celular de las papilas del estigma y del tejido de transmisión de la matriz extracelular para que el tubo polínico pueda crecer. Sin embargo, se sabe poco sobre la expansión de esta pared y las señales implicadas en esta interacción. Imágenes de microscopía electrónica han demostrado que cuando el tubo polínico crece, invade las paredes celulares expandidas de las papilas estigmáticas creciendo entre las capas internas y externas de éstas (Tung et al., 2005) lo que implica un previo reconocimiento.

Por su parte, la cofia responde a señales externas mediante la activación de enzimas que degradan la pared celular hidrolizando los polímeros presentes en éstas, ocasionando la separación de las células del borde (Hawes et al., 2003). En el desarrollo del grano de polen se conocen genes que codifican para estas mismas enzimas proteolíticas de las cuales aún no se conoce su función.

Finalmente, un aspecto también importante que nos puede acercar a explicar la posible convergencia entre patrones de expresión génica en polen germinado y la cofia de la raíz, es que en ambos casos podemos hablar de "desplazamiento celular", en el caso del polen germinado, recordemos que su crecimiento es por elongación de una misma célula que traslada núcleos que deben llegar al gametofito femenino. En el caso de la cofia de raíz existe la diferenciación de células desplazadas por su propio meristemo que las aleja del punto original, donde fueron producidas.

Como antecedentes del presente trabajo consideramos que en el laboratorio se han caracterizado cinco clonas genómicas obtenidas de un banco de cDNA de cofia de maíz: ZmC103, ZmC106, ZmC109, ZmC123 y ZmT101T (Ponce et al., 2000). Después del análisis de secuencia de cada una de ellas, se determinó que la clona ZmC109 codifica para una proteína arabinogalactana, que es un proteoglicano abundante en secreciones vegetales importante para la comunicación intercelular, el desarrollo de órganos reproductores, la embriogénesis somática, la defensa de la planta y la adhesión entre estructuras. Sirve también como lubricante, humectante y controladora del crecimiento del tubo polínico en algunas especies como tabaco (Fincher et al., 1983; Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000).

La secuencia de aminoácidos para la clona ZmC106 presenta alta identidad con GDP-D-manosa-4,6-dehidratasa de *Arabidopsis* (77%), *Escherichia coli* (57%),

células HL-60 (55%) y cerebro de humano (54%), enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de novo de GDP-L-fucosa (Ponce et al., 2000).

La clona ZmC123 codifica para una posible proteína rica en glicina (GRP), una clase de proteína estructural de la pared celular que participan en el desarrollo del tejido vascular (Cassab, 1998) que también se han localizado en tejidos no vasculares como la cofia (Ponce et al., 2000) sugiriendo que pueden participar en otros procesos; por ejemplo, se han relacionado con la acumulación de almidón y diferenciación de amiloplastos durante el desarrollo de la antera y la formación del polen (Mousavi et al., 1999).

Una de las más recientemente caracterizada es la clona ZmC103 que codifica para una proteína UDP-galactosa-4-epimerasa (83% de identidad), enzima que cataliza la conversión reversible de UDP-D-glucosa a UDP-D-galactosa utilizada en la biosíntesis de polímeros de la pared celular y en semillas de algunas leguminosas, estas moléculas funcionan como reserva energética y para la absorción de agua. La secuencia de la última clona, ZmT101T, tiene similitud con una proteína de cofia de raíz de arroz, de la cual aún se desconoce su función, representando un gen no caracterizado.

JUSTIFICACIÓN

Es durante los últimos años y con el uso de técnicas avanzadas de biología molecular, que se han descrito más genes con expresión específica en polen, generalmente asociados con el crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, el número de éstos y los patrones de expresión génica comparados con genes expresados en otros tejidos aún no es muy claro y existen pocos trabajos que analicen este tipo de convergencias.

Continuando con el trabajo del laboratorio sobre caracterización de genes con patrones de expresión en la cofia, se podrán establecer nuevas funciones para éste tejido y explorar su probable coincidencia en la expresión génica con otras estructuras de la planta que presentan necesidades similares como por ejemplo el tubo polínico.

El estudio de la convergencia en el patrón de expresión entre genes, puede acercarnos a proponer mecanismos involucrados en el crecimiento celular y morfogénesis en células, tejidos u órganos con respuestas muy específicas a necesidades ambientales, como aquellas que parecen compartir el polen y la cofia de maíz.

células HL-60 (55%) y cerebro de humano (54%), enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de novo de GDP-L-fucosa (Ponce et al., 2000).

La clona ZmC123 codifica para una posible proteína rica en glicina (GRP), una clase de proteína estructural de la pared celular que participan en el desarrollo del tejido vascular (Cassab, 1998) que también se han localizado en tejidos no vasculares como la cofia (Ponce et al., 2000) sugiriendo que pueden participar en otros procesos; por ejemplo, se han relacionado con la acumulación de almidón y diferenciación de amiloplastos durante el desarrollo de la antera y la formación del polen (Mousavi et al., 1999).

Una de las más recientemente caracterizada es la clona ZmC103 que codifica para una proteína UDP-galactosa-4-epimerasa (83% de identidad), enzima que cataliza la conversión reversible de UDP-D-glucosa a UDP-D-galactosa utilizada en la biosíntesis de polímeros de la pared celular y en semillas de algunas leguminosas, estas moléculas funcionan como reserva energética y para la absorción de agua. La secuencia de la última clona, ZmT101T, tiene similitud con una proteína de cofia de raíz de arroz, de la cual aún se desconoce su función, representando un gen no caracterizado.

JUSTIFICACIÓN

Es durante los últimos años y con el uso de técnicas avanzadas de biología molecular, que se han descrito más genes con expresión específica en polen, generalmente asociados con el crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, el número de éstos y los patrones de expresión génica comparados con genes expresados en otros tejidos aún no es muy claro y existen pocos trabajos que analicen este tipo de convergencias.

Continuando con el trabajo del laboratorio sobre caracterización de genes con patrones de expresión en la cofia, se podrán establecer nuevas funciones para éste tejido y explorar su probable coincidencia en la expresión génica con otras estructuras de la planta que presentan necesidades similares como por ejemplo el tubo polínico.

El estudio de la convergencia en el patrón de expresión entre genes, puede acercarnos a proponer mecanismos involucrados en el crecimiento celular y morfogénesis en células, tejidos u órganos con respuestas muy específicas a necesidades ambientales, como aquellas que parecen compartir el polen y la cofia de maíz.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si se considera que existen funciones similares para el grano de polen y la cofia de maíz, entonces es posible que exista convergencia en patrones de expresión génica entre ambas estructuras.

OBJETIVOS

Como objetivo general se propone determinar si existen patrones comunes de expresión génica y convergencia funcional entre el polen y la cofia de *Zea mays*. Los objetivos específicos que se proponen son:

- Determinar si algunos genes previamente caracterizados en cofia de maíz se expresan en el polen
- Identificar genes con convergencia en expresión entre el polen y la cofia de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se dividió con base en los dos objetivos planteados. Por un lado, usando transcripción reversa acoplada a una reacción en cadena mediada por una polimerasa (RT-PCR), se intentó detectar si genes previamente aislados de cofia existentes en el laboratorio también se expresaban en polen. Por otra parte y de manera paralela, mediante la construcción de un banco de cDNA de polen germinado *in vitro*, se trató de identificar y aislar algunas clonas

con expresión específica en polen y cofia para el análisis de su secuencia y eventual asociación con alguna función. Para ambos casos, se inició con la obtención del material biológico necesario y la extracción de RNA.

Material vegetal

Las plantas de maíz (*Zea mays* L. cv Merit, Asgrow Seed Company) se crecieron en condiciones controladas de invernadero a temperatura de 28°C con ciclos de 12h luz/12h oscuridad. Después de la anthesis de las plantas (aproximadamente 120 días después de sembradas) y durante los siguientes tres días, se colecta el polen para ser germinado en un medio que contiene 2mM CaCl₂, 1.6mM H₃BO₃ y 18% de sacarosa (Rubistein et al., 1995) durante dos horas o hasta obtener más del 70% de emergencia de tubos polínicos. El exceso de medio de germinación se decanta y el restante sólido es triturado en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido y hielo seco. La destrucción completa de los granos de polen se verifica observando alícuotas de 10 µL del homogenizado bajo un microscopio de disección (Leica, Alemania).

Para obtener cofias de la raíz, se utilizaron semillas de maíz de la misma variedad. Las semillas son lavadas con agua estéril durante cuatro horas a temperatura ambiente para quitar el exceso de fungicida. Después de ser embebidas, se germinan en la oscuridad durante tres o cuatro días a 28°C, sobre una capa de toallas de papel saturadas con agua. Cuando las raíces primarias miden de dos a tres centímetros de longitud, el mucílago de la cofia es eliminado con un lavado de agua tetradestilada y la cofia de la raíz se remueve con ayuda de una navaja bajo un microscopio de disección (Leica, Alemania). Inmediatamente después de separarlas de la raíz primaria, las cofias se congelan sobre un cubreobjetos de vidrio colocado sobre un bloque de hielo seco. Si no se usan inmediatamente, se guardan a -70°C.

Extracción de RNA

La extracción de RNA total de polen, cofia y hoja, se realiza siguiendo el protocolo reportado por Rochester y colaboradores (1986), con modificaciones resultado de la revisión de otros protocolos (Sambrook y Russell, 2001; Frankis y Mascarenhas, 1980; Kaufman et al., 1995):

Extracción de RNA (modificado de Rochester et al., 1986)

Añadir 347 μ L de β -mercaptoetanol a 100 mL de solución de extracción RGB: 1% ácido tris-iso-propilnaftalensulfónico (TNS), 6% ácido p-aminosalicílico (PAS), 100mM TRIS pH 7.6, 50mM EGTA y 1% SDS. Pulverizar el tejido en un mortero con nitrógeno líquido. Transferir el material pulverizado a un tubo de plástico con tapa y agregar dos volúmenes de la solución de extracción (que ya contiene β -mercaptoetanol) y dos volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (FCI) preparado en proporción 25:24:1 respectivamente y enfriado a 4°C. Mezclar 15 minutos por inversión homogénea. Centrifugar durante 10 minutos a 6,000 rpm y eliminar el FCI (fase superior). Repetir la adición de FCI y centrifugación un par de veces o lo necesario hasta la completa eliminación de la fase proteica. Precipitar los ácidos nucleicos por seis horas con una mezcla de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 7.6 y dos volúmenes de etanol 100% en 4°C. Centrifugar (a 0°C y 10,000 rpm durante 15 minutos) y resuspender la pastilla en 500 μ L de agua libre de RNAsas. Eliminar el DNA añadiendo 83 μ L de LiCl 12M preenfriado a 4°C y precipitar por un período mínimo de ocho horas a -20°C. Transcurrido el tiempo, centrifugar a velocidad de 10,000 rpm a 0°C durante 15 minutos y eliminar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 500 μ L de agua libre de RNAsas. Se repite la precipitación con acetato de sodio 3M (50 μ L) y etanol al 100% (1 mL) durante ocho horas a 4°C. Después de centrifugar (a 0°C a 10,000 rpm durante 15 minutos), lavar la pastilla con etanol al 70%. Centrifugar 30 segundos para eliminar el etanol por decantación y resuspender la pastilla final en un volumen de 30 μ L de agua libre de RNAsas.

El rendimiento de RNA extraído se determina mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) de una dilución de cada muestra, utilizando un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BIO-RAD) y considerando que:

$$\text{Rendimiento de RNA } (\mu\text{g/mL}) = (40 \times A_{260} \times \text{factor de dilución})$$

y con la lectura de la absorbancia a 280 nm (A_{280}) de la misma dilución, podremos determinar la pureza de la muestra: un resultado del cociente $A_{260}/A_{280} = 1.8$ significa que la muestra tiene poca probabilidad de contaminación por proteínas. Finalmente, la integridad del RNA se reconoce por electroforesis en un buffer MOPS 10x (0.2M ácido 3-[*N*-Morfolino] propanesulfónico, 0.5M CH_3COONa pH 7.0 y 0.01M EDTA) usando un gel desnaturizante de agarosa 1% (0.3 gr. de agarosa, 26.1 mL de agua tetradestilada, 3 mL de buffer MOPS 10x y 0.9 mL de formaldehído) (Kaufman et al., 1995; Sambrook y Russell, 2001).

I. Determinación de expresión de transcritos aislados de cofia de raíz de maíz

Análisis de patrones de expresión (RT-PCR y análisis Southern blot)

Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR son diseñados en el programa Oligo v.4 (Molecular Biology Insights) con base en las secuencias codificantes de las cinco clonas de cofia de maíz obtenidas previamente en el laboratorio de la Dra. Cassab (Ponce et al., 2000).

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en reacciones de RT-PCR, obtenidos a partir de la secuencia codificante de cada una de las clonas aisladas de cofia de raíz de maíz (pb = pares de bases).

Clona	Oligonucleótidos	Tamaño esperado (pb)
ZmC103	5'-CGGGATCCATGGTGTCCGCCGTGCTCCG-3' 5'-CCGGTACCTGGGTGGTTCAATTTGCTGTT-3'	1,076
ZmC106	5'-TCCGCTCCTCCAAC TTCAAC-3' 5'-CGTGATCGACCATCATCTCC-3'	850
ZmC109	5'-CAGCAACTACACCACGTC-3' 5'-CATAGTTTACCCAATTA ACT-3'	250
ZmC123	5'-TCTTCTAATGCTGGGGTACT-3' 5'-TCAAGTTCATGGGTAGGCACT-3'	300
ZmT101T	5'-TGGTGCTCCTGCTTCTCT-3' 5'-ATCGAAGGGCACAAA ACT-3'	380

Para la amplificación de cDNA a partir de 1 μg de RNA total de diferentes tejidos (polen germinado *in vitro*, cofia de raíz y hoja) usamos una reacción de transcriptasa reversa acoplada a una reacción de amplificación: RT/Platinum Taq mix, 0.4mM de cada dNTPs, 2.4mM MgSO_4 (PCR Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq, Invitrogen, Carlsbad CA) y 20pM de cada oligonucleótido

diseñado cuya secuencia se muestra en la Tabla III. Previamente a la amplificación, la transcripción reversa ocurre cuando las muestras se hibridan a 50°C durante 30 minutos y a 94°C por cinco minutos. Posteriormente y utilizando los oligonucleótidos diseñados, se someten a distintas condiciones del PCR, dependiendo de la temperatura de alineamiento para cada par y el tamaño del fragmento esperado (Tablas III y IV).

Previamente, cada muestra de RNA se incubó durante 30 min a 37°C con una enzima DNasa I, libre de RNasa, con una actividad específica 10U/μL (Roche, Alemania) eliminando la posible contaminación con DNA genómico, lo que se comprueba al sustituir la RT/Taq mix por una Taq DNA polimerasa para cada una de las condiciones de reacción que se llevan a cabo.

Como control interno de amplificación y control del templado utilizamos un par de oligonucleótidos de tubulina (5'-CTTGATCGCATCAGGAAGC-3' y 5'-TCAGCAGAGATGACTGGAGC-3') diseñados a partir de un alineamiento de secuencias de esas proteínas descritas en arroz, trigo, maíz y heliantus (Montoliu et al., 1989).

Tabla IV. Programas de RT-PCR diseñado para el análisis de expresión de cada una de las clonas aisladas de cofia.

Clona	No. de ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Polimerización	
		Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
ZmC103	40	94°C	1 m	59°C	1 m	72°C	1 m 30 s
ZmC106	30	94°C	1 m 30 s	60°C	1 m 30 s	72°C	1 m 30 s
ZmC109	29	94°C	45 s	52°C	45 s	72°C	45 s
ZmC123	36	94°C	1 m	52°C	1 m	72°C	1 m 30 s
ZmT101T	30	94°C	45 s	52°C	45 s	72°C	45 s
<i>TUA</i>	17	94°C	1 m	60°C	30 s	72°C	2 m

Los productos amplificados son separados por electroforesis en un gel 1% de agarosa/EtBr y transferidos a una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences) para ser hibridados con los fragmentos de cDNA respectivos (análisis Southern blot), siguiendo un protocolo estándar (Sambrook y Russell, 2001).

Las sondas para la hibridación de los productos de PCR e identificación de los transcritos, se obtienen mediante la purificación de DNA del plásmido vector (Plasmid Mini Purification, Qiagen) y una posterior digestión con enzimas de

restricción (*EcoRI/XbaI*) para liberar el inserto deseado para su purificación (GeneClean II, BIO101).

Las sondas son marcadas con un isotópo radiactivo [$\alpha^{32}\text{P}$]- dCTP utilizando el sistema de marcaje Rediprime II Random Prime Labelling System™ (Amersham, Biosciences). Las membranas se incuban a 65°C por dos horas en una solución de prehibridación (2M NaH₂PO₄ pH 7.2, SDS 10% y agua tetradestilada) y posteriormente durante 12 h a la misma temperatura, con cada una de las sondas marcadas. Los lavados se realizan en condiciones de alta astringencia (tres lavados de 20 minutos con tres diferentes soluciones: 2xSSC-0.1%SDS, 1xSSC-0.1%SDS y 0.1xSSC-0.1%SDS). Las membranas se mantienen en casetes de exposición (Amersham, Biosciences) con películas Kodak X-Omat, desde 30 minutos a una hora a -70°C. Después de su revelado, los tamaños obtenidos se determinan por comparación con el marcador de peso molecular (Sambrook y Russell, 2001).

II. Búsqueda de genes con convergencia en expresión entre el polen y la cofia de maíz

Construcción de un banco de cDNA de polen germinado *in vitro*

Dado que el rendimiento de RNA de polen germinado *in vitro* fue de menor concentración (comparado con otros tejidos de la planta) y considerando que nos interesaba obtener clonas de cDNA completas para la elaboración del banco, utilizamos un sistema SMART™ cDNA Library Construction Kit (catálogo K1051-1, CLONTECH), cuya principal ventaja es que permite iniciar la síntesis de cDNA inclusive a partir de 50 nanogramos (ng) de RNA total de cualquier organismo. El banco se construyó siguiendo un protocolo (PR15738, CLONTECH) que se describe a continuación.

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA se utiliza una transcriptasa reversa "powerscript" y dos oligonucleótidos modificados: para el extremo 3', un oligo (dT) -CDSIII- que permite la síntesis de la primera cadena y el oligonucleótido SMART IV que servirá como un templado corto en el extremo 5' del mensajero. Cuando la reversa transcriptasa llega a este último extremo, la actividad transferasa terminal de la enzima, añade algunos nucleótidos adicionales, dCTP, al extremo 3' del cDNA. El oligo SMART IV, el cual contiene una secuencia oligo (G) en su extremo 3', se unirá a la cola dCTP para formar un templado que utiliza la enzima. Al tener un cDNA de cadena sencilla, sólo aquellos transcritos que tengan una secuencia ancla del oligo SMART IV en el extremo 5', serán templados para la amplificación por PCR a "larga distancia" (LD-PCR), evitando la amplificación de cDNA incompletos, cDNAs transcritos de poliA⁻ y

DNA genómico. A continuación se muestran la secuencia de los oligonucleótidos descritos.

SMART IV

5'-AAGCAGTGGTATCTTCGCAGAGTCGCCATTA↓CGGCCGGG-3'
Sitio *Sfi* IA

CDS III

5'-ATTCTAGAGGCCGAG↓CGGCCGACATG-d(T)₃₀N₁N-3'
Sitio *Sfi* IB

N = A, G, C o T y N₁ = A, G o C. ↓ = sitio de corte de la enzima de restricción

Estos oligonucleótidos modificados contienen en su secuencia, sitios de restricción asimétricos *Sfi*IA y *Sfi*IB para los extremos 5 y 3' respectivamente, que permiten una clonación orientada en un vector como el mostrado en la Figura 4.

Después de una digestión con la enzima *Sfi*I, el cDNA se fracciona por columna (CHROMA SPIN 400) para remover productos de bajo peso molecular (oligonucleótidos no incorporados, aquellos productos incompletos durante la síntesis del cDNA y/o los oligos mismos). Las fracciones resultantes se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (EtBr) en buffer TAE 1x (TrisOAc pH 7.9, EDTA 1mM).

El cDNA se liga a λ TriplEx2, un vector digerido con *Sfi* I y desfosforilado, quedando los insertos clonados de manera orientada respecto al promotor de *lacZ*. Finalmente, se lleva a cabo un empaquetamiento *in vitro* siguiendo el protocolo descrito en el manual del kit Gigapack III Gold Packing Extract de Stratagene™ (<http://www.stratagene.com/manuals/200201.pdf>). Los fagos empaquetados se guardan en buffer SM pH 7.5 (NaCl 0.1M, Tris-Cl 50mM, MgSO₄ 8mM y gelatina 0.01%) a 4°C.

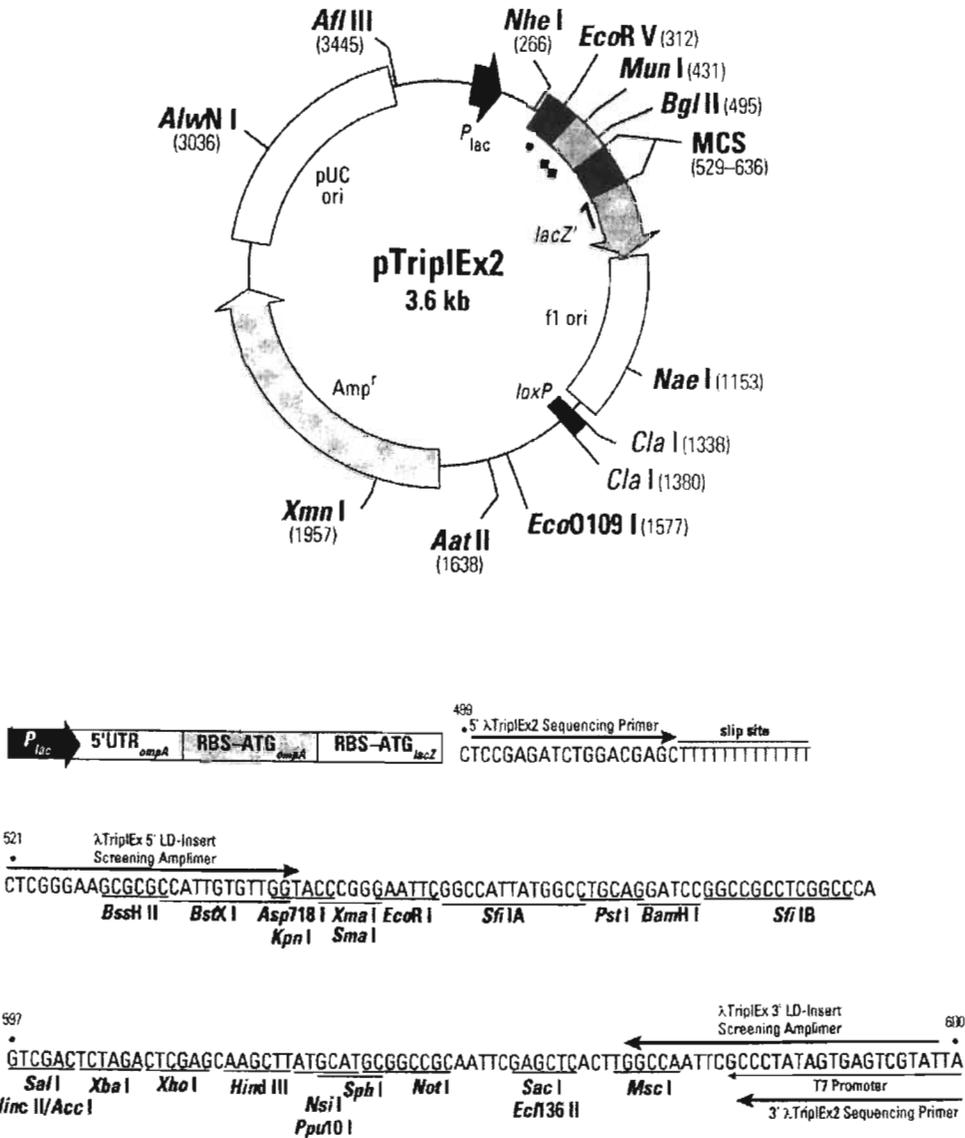


Figura 4. Esquema del vector de clonación λ TriplEx2, mapa de restricción y sitio de clonación múltiple.

Para conocer la eficiencia de ligación y por lo tanto el número de clonas independientes que hay en el banco, se determina el título del banco primario utilizando diferentes diluciones (con tres repeticiones de cada una) de los fagos y una cepa de *E. coli* (XL1-Blue) que permite su adsorción y por lo tanto la

formación de placas de lisis en un medio de selección Luria-Bertrani (LB) con ampicilina (100 µg/mL) (Sambrook y Russell, 2001).

$$\text{Título del banco de cDNA (ufp/mL)} = \frac{(\text{no. de placas})(\text{factor de dilución})(10^3 \mu\text{L/mL})}{\mu\text{L de fago diluido plaqueado}}$$

ufp = unidad formadora de placa

El porcentaje de clonas recombinantes, se determina aprovechando que el sitio de clonación múltiple del vector se encuentra dentro de la región del gen *lacZ* que codifica para el fragmento α de la β -galactosidasa, lo cuál permite la selección de fagos recombinantes. Si se interrumpe el marco de lectura de la β -galactosidasa en un medio con el inductor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y un sustrato cromogénico como el Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido) que es un compuesto incoloro que al descomponerse libera un derivado azul indol, obtendremos placas incoloras (recombinantes). Las placas azules (no recombinantes) son aquellas que no tienen inserto y deben representar menos del 30% para considerar una buena eficiencia del banco de cDNA (Suzuki et al., 1997; Sambrook y Russell, 2001).

Después de contar las placas obtenidas y calcular el porcentaje de recombinantes considerando que:

$$\% \text{ de clonas recombinantes} = \frac{\text{no. de placas incoloras (recombinantes)}}{\text{no. de placas totales}} \times 100$$

se seleccionaron 33 placas al azar (30 incoloras y 3 azules) crecidas durante 10 horas en una caja con medio LB/ampicilina (100µg/mL), IPTG/Xgal (100mM/100mM) para determinar el tamaño de los insertos, las placas de lisis son resuspendidas en un volumen de 500 µL de buffer SM pH 7.5. Utilizamos 5 µL para una reacción de PCR, en un volumen final de 50 µL al cual se le adicionó además 1.25mM dNTP, 20pM de oligonucleótidos 3' TriplEx2 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') y 5' TriplEx2 (5' TCCGAGATCTGGACGAGC 3') - diseñados a partir de la secuencia del vector- 2.5 unidades de Taq Polimerasa, 50 mM MgCl₂ y buffer para PCR 1X (Invitrogen, Carlsbad). La reacción de

amplificación inicia con un ciclo de 94°C 3 min, seguido por 35 ciclos de 94°C 1 min; 55°C 1 min, 72°C 1.5 min y una extensión final de 72°C durante 10 min en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc). Los productos de la reacción fueron separados en geles 0.8% de agarosa/EtBr junto a un marcador de peso molecular 1 Kilobase (Kb) (Invitrogen, Carlsbad).

Para incrementar la estabilidad del banco, se combinan las reacciones de empaquetamiento y se amplifica el banco como se detalla en el manual del sistema (CLONTECH). El título del banco amplificado se determinó de igual manera que para el banco primario. Para su posterior uso, el banco de cDNA se guarda en pequeñas alícuotas a -70°C en dimetil sulfóxido (DMSO) 7%.

Tamizado del banco de cDNA de polen germinado *in vitro*

Las sondas que se usan para el tamizado se sintetizan a partir de RNA total de hoja, cofia y polen de maíz germinado *in vitro*, usando una enzima reversa transcriptasa (Superscript, GIBCO BRL, Life Technologies, NY, USA), un oligo dT y un isótopo radiactivo [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP como lo describen Sambrook y Russell (2001), pero con algunas modificaciones que se mencionan a continuación:

Síntesis de cDNA a partir de RNA (modificado de Sambrook y Russell, 2001)

En un tubo eppendorf libre de RNasas mezclar 300 ng de mRNA y aforar a 20 μL con agua libre de RNasas. Colocar el tubo a 70°C durante cinco minutos e inmediatamente después colocar en hielo. Añadir, en un volumen final de 50 μL : DTT 0.1M, RNAsin 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, oligonucleótido dT 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, buffer RT 5x, dGTP, 50mM, dATP 50mM, dTTP 50mM, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ^{32}P dCTP 50mM y transcriptasa reversa con actividad específica de 2000U/ μL .

Centrifugar para eliminar burbujas. Incubar una hora a 42°C. Añadir 1 μL de 50mM dCTP frío. Incubar 30 min a 42°C. Poner la reacción con 2 μL de 0.5M EDTA pH 8.0 + 1 μL SDS 10% (éste último para evitar que el DNA de cadena sencilla se pegue a cualquier superficie). Mezclar bien. Añadir 25 μL de 150mM NaOH. Incubar una hora a 65°C. Enfriar a temperatura ambiente.

Añadir 25 μL de 1M Tris-HCl pH 8.0 (para neutralizar) y 3.75 μL de 1N HCl. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 10 μL de "stop mix" (20 mg/mL xilen-cianol, 0.1% SDS, 50mM EDTA). Tomar 1 μL de la sonda marcada y colocarlo sobre un papel DE-81 dentro de un

tubo de plástico con tapa y 3mL de líquido de centelleo (muestra "previa"). Pasar el resto de la sonda (aprox. 118 μ L) por una columna de Sephadex-50* (para purificar DNA mayores de 80 nucleótidos, los menores se quedan en los poros, por ejemplo nucleótidos libres). Centrifugar a 1,800rpm a 4°C durante tres minutos. Medir el volumen de la sonda colectada en el tubo eppendorf. Tomar 1 μ L del volumen total y colocarlo sobre un papel DE-81 dentro de un tubo de plástico con tapa y 3mL de líquido de centelleo. ("muestra posterior" que se usa para determinar el porcentaje de oligo 32 P dCTP incorporado cuando se compara con la muestra previamente separada). Tapar el tubo eppendorf. La sonda está lista para colocarse en los tubos de hibridación junto con las membranas.

Nota: Si la sonda no se utiliza de inmediato, guardar a -20°C y antes de usarse, descongelar y calentar a 98°C durante cinco minutos antes de colocar en los tubos de hibridación.

* Preparación de la columna de Sephadex-50:

Esta columna se utilizará para purificar la sonda y eliminar oligonucleótidos pequeños que puedan hibridar con las membranas de manera inespecífica. Usar una jeringa estéril de 1mL, quitar aguja y émbolo incluyendo la goma. Tapar la punta. Empacar la jeringa con Sephadex-50 usando una pipeta Pasteur. Centrifugar la jeringa (dentro de un tubo falcon) a 1,800rpm a 4°C durante tres minutos. La resina debe ocupar máximo 1mL. Repetir la centrifugación hasta que la columna quede debidamente empacada y sin burbujas.

Cortar la tapa de un tubo eppendorf y colocarlo entre la columna y un tubo de ensaye de plástico. Rotular los tubos. Meter dentro de un tubo falcon.

El banco de cDNA de polen germinado *in vitro* fue plaqueado sobre medio LB en dos cajas cuadradas (25x25 cm) con una densidad de 5×10^4 placas por caja. Los fagos del banco de cDNA de polen germinado *in vitro* fueron adheridos e inmovilizados en membranas de nitrocelulosa (Hybond N+, Amersham, Biosciences) cargadas positivamente, siguiendo métodos tradicionales. Se prepararon membranas por duplicado (original y réplica) y se hibridaron en condiciones de alta astringencia (Sambrook y Russell, 2001), asegurando hibridación con secuencias altamente homólogas. Una de las membranas (original)

se pone en contacto con la sonda de cDNA de cofia y la segunda membrana (réplica) con aquella sintetizada a partir de cDNA de hoja (control). El banco se somete a tres tamizados, para asegurar la obtención de clones independientes.

Selección de clones con patrón expresión convergente en cofia de raíz y polen. Análisis de secuencias

Finalmente, se seleccionan clones que en el tercer tamizado presentaban mayor expresión en la hibridación contra la sonda de raíz que con la sonda de hoja. Se obtienen las placas y se guardan en buffer SM (200µL) y cloroformo (10µL) toda la noche a 4°C.

La región de inserción en el DNA del fago lambda de cada clona seleccionada fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos 3' TriplEx2 y 5' TriplEx2 usando las mismas condiciones en que se determinaron los tamaños de insertos del banco primario (descrito anteriormente).

Los productos de PCR se separan por electroforesis en un gel 1% de agarosa/EtBr y se transfieren por capilaridad a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences) usando 10x SSC como acarreador. El cDNA se fija en la membrana por radiación usando luz ultravioleta (Stratalinker-UV) durante 30 segundos. Las membranas son colocadas en la solución de prehibridación al menos durante 30 minutos a 65°C.

Las sondas marcadas radiactivamente, [$\alpha^{32}\text{P}$]- dATP, se sintetizan a partir de RNA de cofia, de hoja y de polen siguiendo el mismo protocolo para las sondas empleadas en los tamizados (descrito previamente). La hibridación con las sondas marcadas se realiza por 12 h. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavan durante 20 minutos a 65°C, con dos diferentes soluciones (2x SSC-0.1% SDS, 1x SSC-0.1% SDS) y finalmente con 1xSDS. La exposición del filme se realizó durante 24 y 48 horas a -70°C.

Otra característica del vector λ TriplEx2 es que el sitio de clonación múltiple está localizado dentro de un plásmido flanqueado por sitios *loxP*. La transducción de λ TriplEx2 a la cepa BM25.8 de *E coli*, que expresa la proteína recombinasa Cre, promueve la escisión y circularización del plásmido mediante recombinación específica en los sitios *loxP*. Para las clones seleccionadas (12 con tres réplicas, es decir, 36 clones), el plásmido recombinante se escindió del vector y algunas de esas clones fueron secuenciadas de manera automatizada para posterior análisis. (Secuenciado en la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología-UNAM, con el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de varias pruebas se lograron optimizar las condiciones para obtener de un 50 a 70% de germinación de los granos de polen en el medio y condiciones descritas.

Se hicieron extracciones de RNA con diferentes protocolos, y se encontró que el descrito por Rochester y colaboradores, 1986, fue el más óptimo para la extracción a partir de todo tipo de tejidos de maíz. Aún cuando el rendimiento del RNA de polen germinado *in vitro* (30 $\mu\text{gRNA/gr}$ ó 1 $\mu\text{gRNA}/\mu\text{L}$) no fue tan alto comparando con otras partes de la planta (posiblemente debido a un alto contenido de polisacáridos) se obtuvo lo suficiente y de buena calidad para hacer las reacciones de RT-PCR, el banco de cDNA y las sondas para las tres rondas de tamizado que permitió obtener las clonas de interés. Por otra parte, para el aislamiento de 3 μg de RNA total, deben ser colectadas aproximadamente 1,000 cofias.

La pureza y contenido del RNA extraído se determina por electroforesis utilizando geles desnaturizantes de agarosa al 1% en buffer MOPS 1x y lectura de la absorbancia en el espectro. Una fotografía del RNA obtenido a partir de hoja, cofia y polen se muestra en la Figura 5.

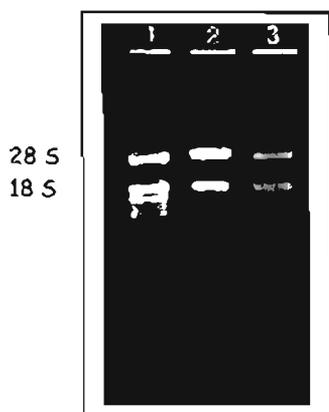
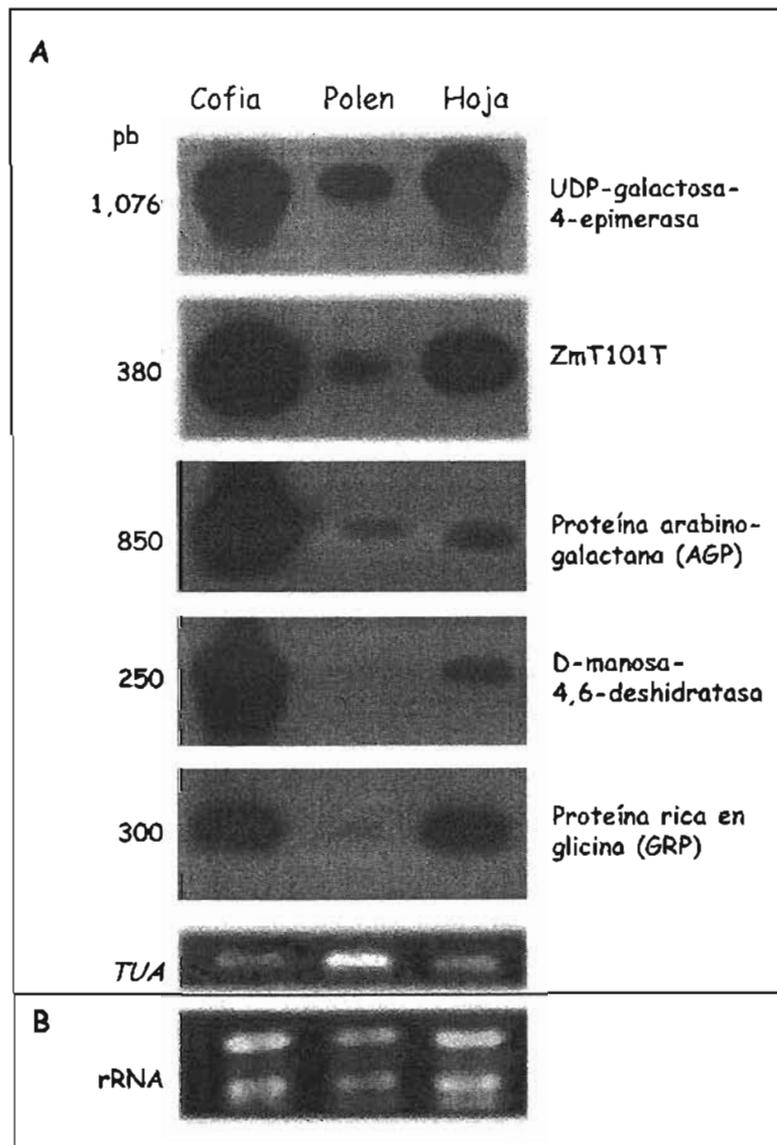


Figura 5. RNA de maíz extraído de 1) hoja 2) cofia y 3) polen. Gel desnaturizante de agarosa al 1% en MOPS 1x, para determinar la integridad del RNA. 3 μL de muestra por carril. Se muestra el tamaño de los RNA ribosomales característicos de plantas (28S y 18S).

I. Detección de expresión en polen de transcritos aislados de cofia de raíz de maíz

Los resultados demuestran que las clonas ZmC103, ZmC106, ZmC109, ZmC123 y ZmT101T están presentes tanto los genes en polen como en tejido vegetativo, pero con diferentes niveles de expresión, que refleja los diferentes niveles de abundancia de cada transcrito. La amplificación del RNA de α -tubulina, indica que cantidades similares de cDNA fueron usadas para cada muestra (Figura 6).

Figura 6. Acumulación de mRNA aislado de cofia de raíz en polen y hoja de *Zea mays*. A) Autorradiografía de geles utilizando como sonda las clonas de cofia con productos de RT-PCR usando como templado cofia, polen y hoja de maíz. B) Gel 1% de agarosa Et/Br en MOPS 1x mostrando la misma cantidad de RNA usado como templado para el RT-PCR. El gen de α -tubulina (*TUA*) fue utilizado como control positivo. El control negativo (muestra sin transcripción reversa) no se muestra. pb= pares de bases rRNA= RNA ribosomal.



Con estos resultados, se puede hablar de genes con expresión preferencial pero no específicas de cofia.

Cabe mencionar que como parte del trabajo de caracterización de las clonas, éstas se habían descrito como específicas de cofia, a través de un análisis tipo Northern blot (Ponce et al., 2000). Los resultados aquí descritos podrían parecer contradictorios, sin embargo, conviene resaltar dos diferencias importantes entre los análisis realizados. Primero, para el análisis tipo Northern blot, no se utilizó RNA de polen, por lo que no se puede descartar la presencia de los cinco transcritos en ese tejido y segundo, un análisis por RT-PCR es más sensible y podría explicar la detección de transcritos en las muestras de hoja.

Conociendo el tipo de proteína para la cual codifica cada uno de los genes de las clonas analizadas, creemos que es probable que haya expresión en el polen. Por ejemplo, en el gametofito masculino se ha descrito la presencia de proteínas arabinogalactanas (AGPs) en las aperturas por donde emergerá el tubo polínico que están principalmente involucradas en el reconocimiento entre el grano de polen y el estigma (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Por otra parte, debido a la velocidad de crecimiento del tubo polínico, hasta de 1 cm/h en maíz (Vasil, 1987; Gass et al., 2005) se requiere la presencia de enzimas involucradas en la conversión y biosíntesis de carbohidratos que permitan una buena reconstrucción de la pared celular, como galactosa.

En cualquier caso debe ser claro que los genes anteriores no pueden ser considerados con patrones de expresión preferencial para polen y cofia, por lo que para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, se continuó con la elaboración del banco de cDNA y su tamizado diferencial, para detectar posibles genes con patrones de expresión específica en el gametofito masculino y la cofia de la raíz de maíz.

Sin embargo, sería interesante ampliar este resultado haciendo un análisis de expresión más detallado, por ejemplo, con oligonucleótidos más específicos e incluyendo más tejidos de la planta de maíz y profundizar en el estudio de la regulación de cada uno de los genes a fin de replantear sus posibles funciones.

II. Identificación de genes con convergencia en el patrón de expresión entre el polen y la cofia de maíz

Obtención de un banco de cDNA de polen germinado *in vitro*

La síntesis de la primera cadena para el banco de cDNA de polen germinado *in vitro*, se inicia con 0.55µg de RNA total ($A_{260}/A_{280} = 1.8$). A partir de 2µL de la reacción anterior y usando los oligonucleótidos adecuados, se amplifica por LD-PCR (Long Distance Polymerase Chain Reaction) para obtener un cDNA completo de doble cadena (Figura 7).

El cDNA de doble cadena amplificado se observa como un barrido que muestra tamaños desde 500 pb hasta 2 kb, con mayor intensidad en la región con mRNAs más abundantes, que corresponde a un tamaño de 800 pb. En el control positivo de amplificación utilizado, se observa una banda de 900 pb característica que corresponde al mRNA de placenta de humano.

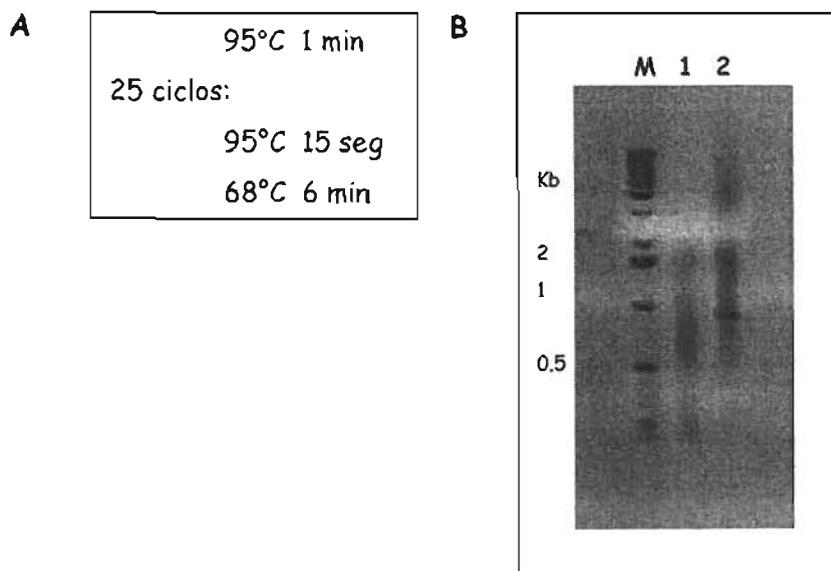


Figura 7. cDNA de polen de maíz germinado *in vitro* amplificado por LD-PCR.

A) Programa de LD-PCR usado para la amplificación del cDNA de polen germinado *in vitro*. B) Gel de 1% de agarosa/EtBr en TAE 1x. Electroforesis a 90 voltios durante 40 min. M) 3µL de marcador peso molecular 1Kb. 1) 5µL de cDNA de polen germinado *in vitro* amplificado por LD-PCR, 2) 5µL de cDNA de placenta de humano amplificado por LD-PCR (control). Los tamaños del marcador usados como referencia se expresan en kilobases (Kb).

Para inactivar la enzima Taq polimerasa e incrementar la eficiencia de clonación, el cDNA se trató con proteinasa K (20µg/µL).

La muestra se digiere con *SfiI* y se tiñe con 2µL de colorante xilen-cianol 1% para poder identificar el cDNA durante su fraccionamiento por una columna. Se colectaron 16 muestras y se verificó su perfil (distribución por tamaños) en un gel 1% de agarosa/EtBr (en la Figura 8, se muestran 11 de las 16 fracciones analizadas).

Se determinaron las fracciones picos observando la intensidad de las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta.

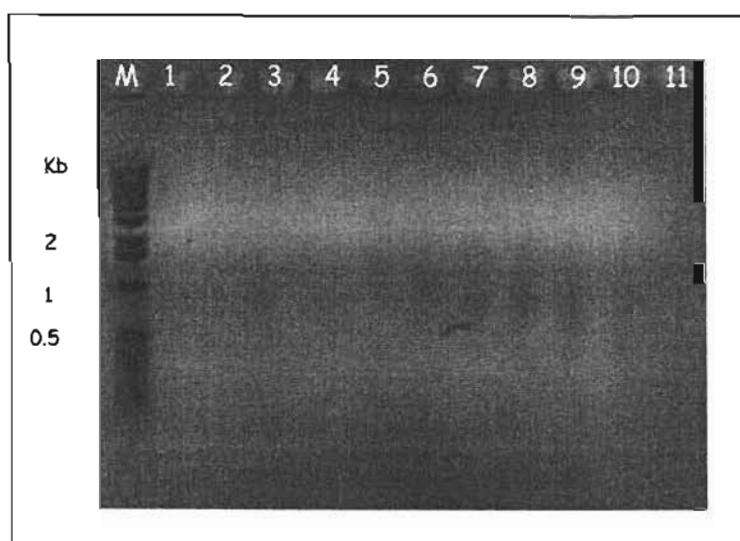


Figura 8. cDNA de polen de maíz germinado *in vitro* fraccionado por columna. Gel de agarosa/EtBr al 1% en TAE 1x. Electroforesis a 150 voltios durante 20 min. M) 3µL de marcador peso molecular 1Kb. 1 a 11) 3µL de cDNA fraccionado por columna CHROMA-SPIN 400. Las fracciones seleccionadas se ubican en los carriles 6 al 10. Los tamaños del marcador usados como referencia se expresan en kilobases (Kb).

Las cinco fracciones seleccionadas (6, 7, 8, 9 y 10), que muestran tamaños de 500 pb a 2 Kb, se colectan en un tubo, precipitan y resuspenden en agua deionizada. Con el fraccionamiento se eliminan aquellos fragmentos de cDNA pequeños (≤ 400 pb) que generalmente tienen mayor posibilidad de ligarse al vector.

Considerando que la proporción de DNA (que contienen el inserto que se requiere clonar) y del vector en una reacción de ligación, es un factor crítico que determina la eficiencia de transformación y el número de clones independientes en el banco, se realizaron tres ligaciones paralelas con diferentes relaciones DNA/vector (0.5:1, 1:1 y 1.5:1) en un volumen final de 5µL.

La eficiencia de empaquetamiento se determina conociendo el porcentaje de clonas recombinantes, aquellas que tengan un inserto en el sitio de clonación múltiple interrumpiendo el marco de lectura de la β -galactosidasa, en un medio con un sustrato cromogénico, Xgal, y con un inductor, IPTG.

Los fagos son empaquetados *in vitro* (aprox. 0.5 μ g de DNA ligado) durante 2 horas.

Las reacciones de empaquetamiento se combinan dando como resultado un título del banco primario de 8.6×10^5 ufp/mL (ufp= unidades formadoras de placas).

Para determinar si este valor era adecuado y hablar de un banco bien representado, se compararon con algunos valores teóricos ya reportados (Sambrook y Russell, 2001). Otra manera de corroborar lo anterior fue considerando los análisis de cinética de hibridación de cDNA con mRNA en exceso y con mRNA del polen, mediante los cuales se ha determinado que el mRNA de polen de *Zea mays* consta de 2.4×10^7 nucleótidos correspondientes a 24,000 diferentes secuencias, valores muy cercanos a los descritos para polen de *Tradescantia paludosa*, el mRNA de polen de esta planta es de 2.3×10^7 nucleótidos, que corresponden a aproximadamente 24,000 diferentes secuencias (Mascarenhas, 1990). A manera de comparación, se sabe que una célula animal típica contiene entre 10,000 y 30,000 diferentes secuencias transcritas (Sambrook y Russell, 2001). La complejidad de los mRNAs de polen tanto de *T. paludosa* como de maíz es aproximadamente 60% del total correspondiente a los mRNAs de la parte aérea. (Frankis et al., 1980; Mascarenhas, 1989 y Willing et al., 1984).

Para el caso de *Zea mays*, los mensajeros abundantes corresponden al 35% y comprenden aproximadamente 240 secuencias cada una presente en promedio 32,000 copias por grano. La clase de abundancia media (49%) consiste en aproximadamente 6,000 diferentes secuencias cada una presente en 1,700 copias por grano. La fracción menos abundante (15%) consiste en aproximadamente 17,000 secuencias cada una presente en 200 copias por grano. Es interesante mencionar que la fracción menos abundante en polen contiene mayor número de copias de cada secuencia por grano que para esa misma fracción del tejido vegetativo, donde sólo existen de 5 a 10 copias por célula.

Por lo tanto, considerando la fracción menos abundante de transcritos de polen en maíz, el número mínimo de clonas requeridas para obtener una representación completa de los mRNAs debería ser $17,000/0.15$, es decir, 113,333 clonas. Sin embargo, debido a la variación de las muestras y a que algunas secuencias se insertarán al vector más fácilmente que otras, es mejor obtener un número mayor de clonas para asegurar que cualquier gen de polen esté representado al

menos una vez en el banco. Así, el número de clonas necesarias para tener una buena probabilidad de que un mRNA de baja abundancia estará representado en un banco de cDNA se puede determinar mediante la relación

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - 1/n)$$

Donde N = número de clonas necesarias, P = la probabilidad deseada, (generalmente 0,99) y 1/n = la proporción del total del mRNA que está representado por un tipo de mRNA poco abundante. Por lo que para alcanzar una probabilidad de 99% de obtener una clona de mRNA presente en polen a una frecuencia de aproximadamente 200 moléculas por célula:

$$N = \ln(1 - 0,99) / \ln(1 - 1/113,333) = 5.2 \times 10^5$$

y comparando este dato con el valor obtenido experimentalmente para el banco de cDNA de polen germinado *in vitro* (8.6×10^5 ufp/mL), se puede considerar una buena representación del transcriptoma, adecuada para continuar con el tamizado y la selección de genes con expresión génica convergente.

El porcentaje de clonas recombinantes fue 84%. A pesar de la determinación de este porcentaje por métodos colorimétricos, era importante comprobar este dato mediante un análisis por PCR que a la vez permitiera establecer el tamaño promedio de los insertos. Este tipo de análisis es necesario ya que la inserción de DNA no siempre inactiva la complementación del fragmento α de la β -galactosidasa, por ejemplo cuando el inserto es muy pequeño (≤ 0.1 Kb). También existía la posibilidad de que no todas las placas recombinantes (incolores) tuvieran un inserto, por ejemplo por una mutación en las secuencias *lac*, en la que el vector pierde la capacidad de expresar el fragmento α .

Los tamaños de los insertos de las placas seleccionadas están entre 300 y 2,000 pb, con un tamaño promedio de 750 pares de bases (Figura 9), que resultó adecuado si lo comparamos con tamaños de insertos clonados en otros bancos de cDNA reportados (Hodge et al., 1992).

Dado que todas las clonas incolores (30) contienen inserto que no se encuentra en ninguna de las azules (4), se puede decir que el porcentaje de clonas recombinantes deducido es confiable.

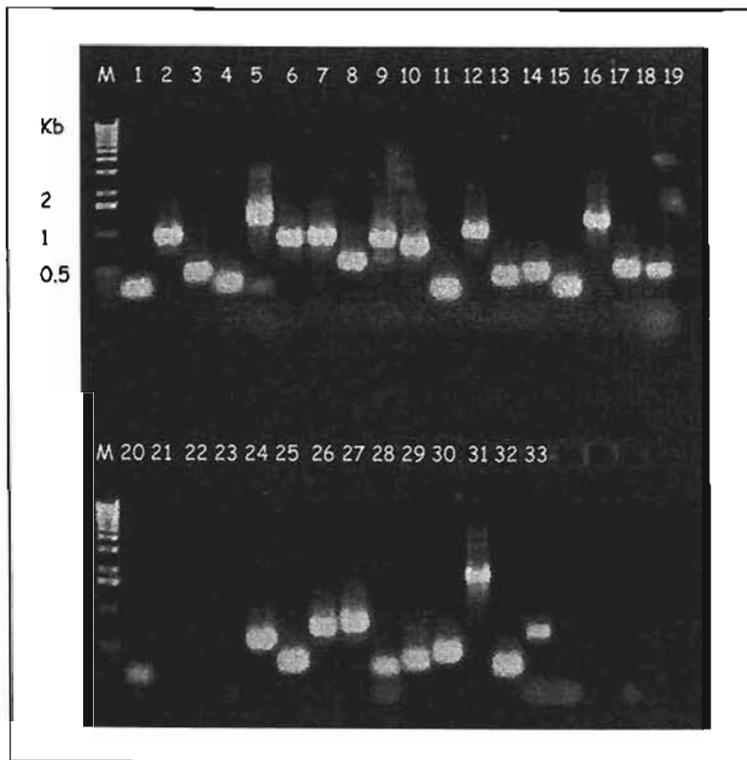


Figura 9. Insertos de cDNA de polen de maíz germinado *in vitro* amplificados por PCR para determinar su tamaño. Gel de 1% de agarosa/EtBr en TAE 1x. Electroforesis a 90 voltios durante 1 hora. M) 3 μ L de marcador peso molecular 1Kb. 1 al 33) 10 μ L del producto de PCR usando como templado cDNA de clonas incoloras (1 a 20 y 24 a 33) y azules (21-23). Los tamaños del marcador usados como referencia se expresan en kilobases (Kb).

Después de una ronda de amplificación, el banco se estableció el título empleando tres diluciones con tres repeticiones cada una, obteniéndose 1.65×10^9 ufp/mL. Un buen banco amplificado puede alcanzar un título de 10^{10} ufp/ml, aunque aquél que conste de 5×10^7 clonas independientes, es aceptable (Sambrook y Russell, 2001).

De manera aleatoria, se seleccionaron algunas placas del banco plaqueado en un medio IPTG/Xgal para distinguir clonas que contenían inserto, hacer la conversión a plásmido y purificar el DNA. Utilizando los mismos oligonucleótidos de amplificación diseñados para los análisis de insertos por PCR, se secuenció el DNA de las clonas se determinó su identidad. Los datos obtenidos muestran, por ejemplo, que una de las secuencias, en su tercer marco de lectura, tiene similitud considerable con un alérgeno del grupo 3 de polen de maíz (89% de identidad), que además de ser un cDNA completo, soporta la utilidad y confiabilidad del banco de cDNA obtenido (Figura 10).

```

gi|33188338|gb|AAP97894.1| Grupo 3 de alergenos de polen [Zea mays]
Longitud = 120
Score = 219 bits (558), Expect = 6e-56
Identidad = 107/120 (89%), Positivas = 107/120 (89%)
Marco de lectura = +3

Query: 90 MASRYSELLAXXXXXXFAFGSCTTPLTFQVGRGSKPGHLVLT PNIATISDVEIKEHGGD 269
MASRYSELLA-----FAFGSCTTPLTFQVGRGSKPGHLVLT PNIATISDVEIKEHGGD
Sbjct: 1 MASRYSELLATTALAMLF AFGSCTTPLTFQVGRGSKPGHLVLT PNIATISDVEIKEHGGD 60

Query: 270 DFSFTLKEGPAGTWLDTKAPLKYPLCIRFATKSGGYRIADDVIPADFKAGTTYKTLSI 449
DFSFTLKEGPAGTWLDTKAPLKYPLCIRFATKSGGYRIADDVIPADFKAGTTYKTLSI
Sbjct: 61 DFSFTLKEGPAGTWLDTKAPLKYPLCIRFATKSGGYRIADDVIPADFKAGTTYKTLSI 120

```

Figura 10. Identidad de una clona de cDNA (13A) obtenida del banco de cDNA de polen de maíz germinado *in vitro* utilizando un algoritmo NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Los mensajeros de los eucariotes tienen una estructura llamada cap en el extremo 5' y una cola de A (poli A) en el 3'. La información de la secuencia entre estos dos límites es importante para la identificación de regiones codificante y no codificante que controlan la estabilidad del mRNA y la eficiencia de traducción. Generalmente, la transcriptasa reversa, que se usa para sintetizar cDNA, termina antes de transcribir la secuencia completa ocasionando que los extremos 5' no queden representados en las poblaciones de cDNA al ser 5-30 nucleótidos más cortos que en el mRNA original. De tal manera, el aislamiento de cDNAs completos, es decir, aquellos que contengan en una copia de las secuencias entre el cap y el poliA del mRNA, es un paso importante para el análisis confiable de la estructura de un gen y su función. Esto se facilita si se tienen clonadas las secuencias en vectores adecuados, como cuando se elabora un banco de cDNA.

De acuerdo a los resultados anteriores, se puede decir que el método utilizado para la construcción del banco de polen de maíz germinado *in vitro*, resultó eficiente.

Selección de clonas con patrón expresión convergente en cofia de raíz y polen. Análisis de secuencias

Dado que se pretendía hacer una comparación entre transcritos con expresión en polen y cofia, el éxito del tamizado dependía en gran medida de la complejidad de la sonda, es decir, era necesario contar con una sonda en la cual estuviesen bien representados transcritos alta, media y escasamente expresados. Generalmente

en la literatura se señala que las sondas usadas en estudios de expresión diferencial deben elaborarse a partir de 5 a 50 µg de RNA total (Poirier et al., 1997), considerando que se crean a partir de poblaciones completas de RNA y no de una sola molécula, existe la posibilidad de perder aquellos transcritos menos abundantes y más pequeños que no sean un buen templado para la enzima durante la síntesis de cDNA. Otro paso en que pudieron perderse algunos transcritos en las sondas, es durante su utilización repetida en diferentes tamizados.

Inicialmente se tamizaron 50,000 placas recombinantes que se imprimieron en papel Hybond N+ (Amersham, Biosciences) por duplicado. La membrana original se hibrida con la sonda de cofia y la réplica con la sonda de hoja.

Al revelar las películas de exposición (que estaban en contacto con las membranas hibridadas con cada una de las sondas) y colocar la membrana original sobre la réplica, se detectan tres tipos de clonas. Las primeras, con expresión (señal) en polen, cofia y hoja; las segundas con fuerte expresión en polen y hoja y mínima o nula en cofia y las últimas con mayor expresión en polen y cofia que en hoja. Aún cuando durante la selección no se observaron clonas con expresión exclusiva en polen y cofia, que eran el tipo de clonas que se pretendía aislar, el análisis posterior se enfocó a las del último grupo.

De tal manera, los resultados discutidos a continuación se refieren a clonas con patrón de expresión preferencial en polen y cofia, con baja expresión en hoja de maíz.

Durante el primer tamizado por hibridación diferencial se obtuvieron aproximadamente 30 clonas con patrones de expresión preferencial polen y cofia. Cada una de ellas se seleccionó por triplicado, por lo que el primer análisis se realizó sobre 90 placas. Durante el segundo tamizado, debido a que las sondas provenían de una nueva población de cDNA, se identificaron 15 nuevas placas, consideradas como posibles candidatas. Finalmente, en el tercer tamizado las clonas seleccionadas se redujeron a 36 y dado que cada una de ellas está representada tres veces, en total se seleccionaron 12 clonas consideradas con patrones de expresión preferencial en polen y cofia.

Para verificar la identidad de las clonas seleccionadas, se realizó un PCR utilizando oligonucleótidos (3' TriplEx2 y 5' TriplEx2) que flanquean el sitio de clonación del vector e hibridando los productos con sondas elaboradas a partir de cDNA de cofia y hoja e incluyendo una nueva sonda de polen (datos no mostrados).

En la Figura 11 se muestra la hibridación contra el cDNA de las 36 clonas analizadas. Aquellas del mismo tamaño se consideraron como repeticiones, lo que

se comprobó por secuencia, así, el grupo de clonas para ser analizadas se limitó a cuatro denominadas C8C2, IH2B2, C17C1 e IHI4.

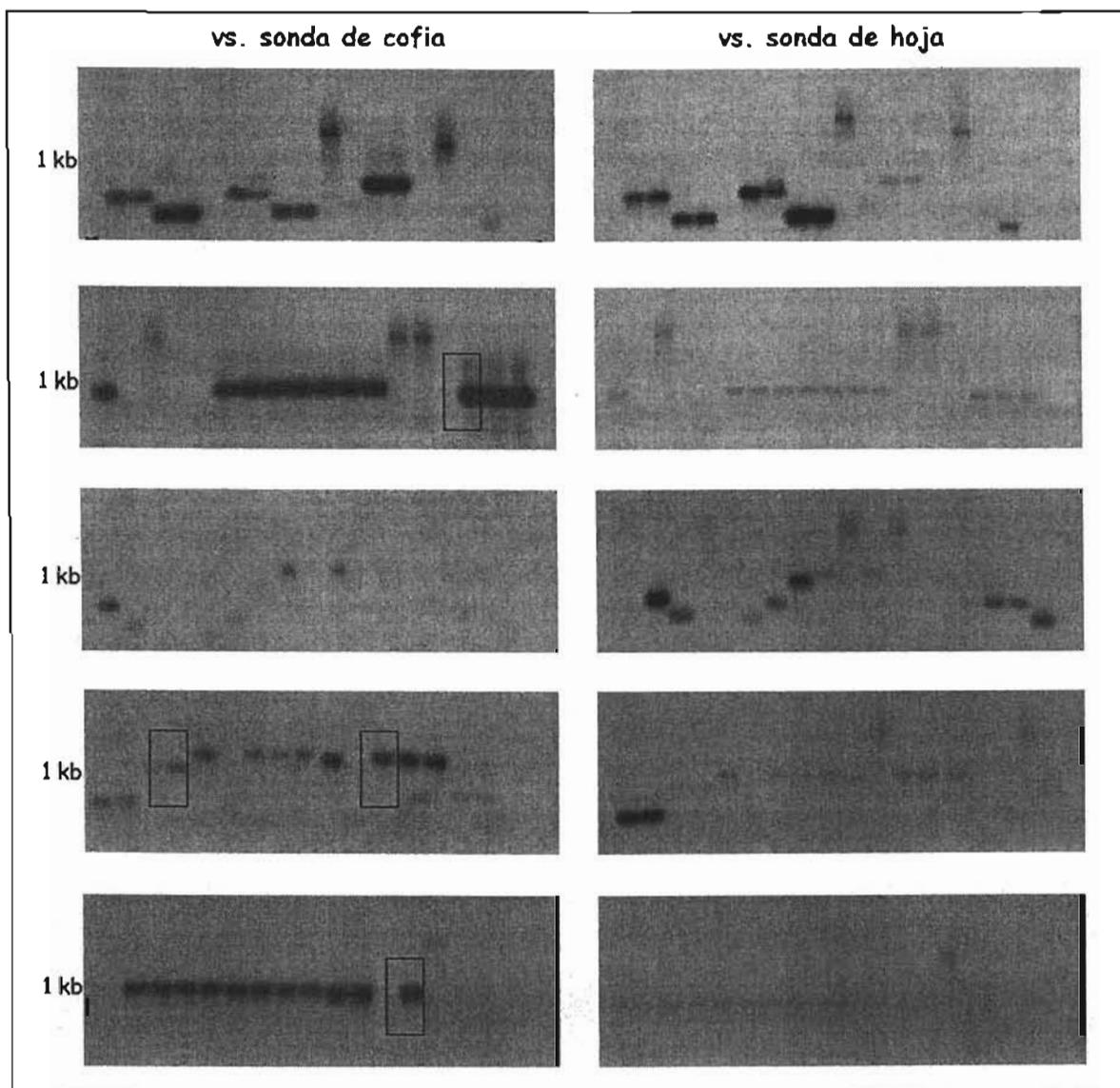


Figura 11. Análisis tipo Southern blot de clonas seleccionadas durante el tercer tamizado de un banco de cDNA de polen germinado *in vitro*.

En la columna izquierda se muestran el resultado de membranas hibridadas contra una sonda de cofia y del lado derecho una réplica de las mismas membranas hibridadas contra una sonda de hoja. Con un recuadro se muestran las clonas que fueron seleccionadas por su expresión preferencial en polen-cofia.

En cada carril se colocaron 5 μ L del producto de amplificación de 36 placas seleccionadas en un tamizado diferencial (12 placas, cada una con tres réplicas) En el margen izquierdo se muestra el marcador (peso molecular) 1Kb como referencia para conocer el tamaño de los insertos.

Para la selección final de clonas se consideraron aquellas que se acercaran más a la definición de clonas con patrones de expresión preferencial en polen y cofia.

Aún cuando el análisis tipo Southern se consideró únicamente como un prueba de validación de la selección por tamizado diferencial, cabe mencionar que algunas de las clonas antes seleccionadas fueron descartadas al presentar hibridación contra la sonda de hoja que pudo ser debida al uso de sondas de cDNAs sintetizadas para esta parte, lo que supone una mínima, pero posible diferencia en la representación y abundancia de los transcritos.

Para el análisis tipo Southern blot, se utilizaron reacciones de PCR sin templado (agua y el producto de amplificación por PCR de placas azules seleccionadas) como control negativo y el cDNA de la sonda correspondiente como control de hibridación positivo.

Una vez que se obtuvo el DNA de plásmido de las cuatro clonas seleccionadas, se procedió al análisis de secuencia.

La determinación de la identidad de las clonas se estableció por comparación de secuencias utilizando el algoritmo "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los datos obtenidos muestran que las secuencias tienen similitud considerable con algunas proteínas ya descritas que se resumen en la Tabla V.

Tabla V. Clonas con patrón de expresión preferencial en polen y cofia. Para cada una de ellas se muestra la(s) proteína(s) con mayor similitud en secuencia (aa = aminoácidos)

Clona	Similitud a nivel de secuencia con proteínas conocidas	No. Acceso en Genbank y similitud a nivel de aa (%)
1 CBC2	Tiorredoxina <i>h</i> de arroz	XP_476912 (66%)
	Tiorredoxina de trigo	Q86VD3 (60%)
2 IH2B2	Cistatinas de maíz	JC4882 (82%)
	Inhibidores de cisteinproteasas	P93627 (85%)
3 C17C1	Poliubiquitina de tomate	CAA51679 (98%)
	Poliubiquitina de arroz	XP_464194 (93%)
	Poliubiquitina <i>de Arabidopsis</i>	Q9FHQ6 (72%)
4 IHIA4	α -2 tubulina de maíz de tejidos radicales	CAA33734 (98%)

El análisis de secuencia de las clonas obtenidas, se enfocó a C8C2 e IH2B2, por ser las que mostraron señales mas claras y reiterativas durante el tamizado.

Considerando el marco de lectura abierto más probable, la clona C8C2 codifica para una proteína de 146 aminoácidos con alta homología con una tiorredoxina *h* reportada en plantas (Figura 12). En la posición 39-43 se distingue un sitio catalítico putativo descrito para este tipo de proteínas. No presenta ningún tipo de péptido señal u otro motivo conservado (software PSORT). Tampoco presenta algún otro dominio característico de tiorredoxinas, ni se detectan los sitios MAAEE y RKDD, que permiten el transporte de la proteína vía plasmodesmata, por lo que de manera hipotética se puede decir que la proteína identificada es citosólica (Ishiwatari et al., 1998).

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas (aprox. 12 kDa o 105-120 aa) con un par de cisteínas en un sitio activo con la secuencia Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (WCGPC) muy conservado que le confiere una actividad disulfuro reductasa. La tiorredoxina *h* es reducida por NADPH en una reacción catalizada por la enzima NADP-tiorredoxina reductasa (NTR). Una característica de plantas es la presencia de varios tipos de tiorredoxinas y múltiples genes para cada tipo.

Existen tres tipos de tiorredoxinas consideradas como clásicas: *m*, *f* y *h*. Las dos primeras, fueron aisladas del cloroplasto. El tercer tipo, que fue aislado de tejidos no fotosintéticos de espinaca, primero se le llamó tiorredoxina *c* por su localización en el citosol y más tarde se renombró como *h* (heterotrópica). Puede localizarse en el citosol, retículo endoplásmico y mitocondria (Meyer et al., 2002). En *Arabidopsis* se han detectado ocho genes que codifican para tiorredoxinas *h* y dentro de este grupo, cinco proteínas tienen la secuencia clásica en el sitio activo, WCGPC, mientras que las demás tienen un sitio WCPC (Gelhaie et al., 2004; Meyer et al., 1999; Rivera-Madrid et al., 1995).

La función de la tiorredoxina *h* se ha estudiado en varios sistemas vegetales, como la semilla, floema y polen. En cereales, como el maíz, se ha visto que promueve la movilización de carbono y nitrógeno del endospermo en germinación temprana del grano. La tiorredoxina *h* aparentemente actúa 1) reduciendo proteínas de almacenamiento mediante el aumento de su sensibilidad a proteasas, 2) activando a una proteasa ligada a calcio (tiocalasina) y 3) neutralizando por reducción de puentes de disulfuro, proteínas de bajo peso molecular que inhiben enzimas que degradan almidón. Además por su presencia en el citosol, se relacionan con procesos como movilización de reservas en semillas durante la germinación o tolerancia a estrés oxidativo (Cho et al., 1999; Laloí et al., 2004; Mouaheb et al., 1998 en Meyer et al., 2002).

Mediante estudios de eliminación de la actividad de genes, la tiorredoxina *h* ha sido identificada como requerimiento para el desarrollo de la auto-incompatibilidad en polen y por ser un componente del floema. La tiorredoxina ligada a NADP, funciona en células animales en procesos como transcripción y desarrollo de la respuesta inmune (Balmer y Buchanan, 2002).

En un alineamiento múltiple, la secuencia de la clona *C8C2* presenta un alto grado de homología (75%) con una proteína tiorredoxina localizada en el floema de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Kantou). Los autores proponen que la presencia de una proteína de este tipo, a la cual llamaron RPP13-1, puede estar involucrada en la transferencia de nutrientes y en la transducción de señales. En ese trabajo concluyen que la tiorredoxina activa es una proteína translocante en tejidos vasculares de arroz.

Otra de las proteínas con una alta homología a nivel de aminoácidos es la llamada THL-1 (descrita por Bower et al., 1996) que junto con la THL-2, interacciona de manera específica con SRK-910, un dominio de una protein-cinasa. Los autores pretendían determinar los sustratos potenciales del locus *S* receptor cinasa (*SRK*) durante la respuesta de auto-incompatibilidad en *Brassica napus*. THL-1 tiene una actividad tiorredoxina determinada mediante un ensayo de reducción de insulina. THL-1 y THL-2 están presentes en varios tejidos de la planta, pero presentan expresión preferencial en tejidos florales. Los resultados proponen nuevas funciones para este tipo de proteínas además del papel que tienen como moléculas efectoras en la cascada de señalización de auto-incompatibilidad.

De los resultados de este trabajo, se pueden proponer hipótesis sobre las posibles funciones de la tiorredoxina, en el crecimiento del tubo polínico y en cofia: 1) degradación de almidón de amiloplastos para respuestas trópicas percibidas por la cofia y como fuente de energía para el crecimiento del tubo polínico, 2) neutralización de proteínas de bajo peso molecular que inhiben enzimas que degradan almidón y 3) posible participación en eventos de incompatibilidad con patógenos, para el caso de la cofia y auto-incompatibilidad del tubo polínico durante la polinización.

Por otro lado, la otra clona con relativa abundancia seleccionada durante el tamizado, *IH2B2*, traducida es una proteína de 134 aminoácidos con un alto grado de identidad (90%) con una cistatina, un inhibidor de cistein proteasas previamente caracterizado en maíz

Mediante el análisis de la secuencia de esta proteína se distingue un residuo de glicina en la región N-terminal, una secuencia *QVVAG* en la posición 82-86, así como un residuo de Trp en la región C-terminal, características de este tipo de

inhibidores. Existe además una probable secuencia señal en la región N-terminal (Figura 12).

Estas proteínas pueden actuar como reguladores endógenos de la proteólisis en semillas, pero también, se ha sugerido que los inhibidores de proteasas en plantas representan un sistema generalizado de defensa frente a cualquier tipo de estrés. Las cistatinas son proteínas que inhiben proteasas del grupo de las cistein proteasas. Estas enzimas, abundantes en el tracto digestivo de los insectos y en algunos virus fitopatógenos, son responsables del procesamiento de algunas proteínas virales (Kuroda et al., 2001; Solomon et al., 1999; Rzychon et al., 2004).

De acuerdo a su función, se podría pensar que tanto en polen, como en cofia, las cistatinas participan en algunas formas de senescencia y respuesta a patógenos (estrés biótico), así como modificando y previniendo el programa de muerte celular programada (MCP) que se activa durante estrés oxidativo y en ataque por patógenos.

La muerte celular programada es una parte integral del desarrollo y defensa de la planta (van Doorn y Woltering, 2005). Ésta ocurre en plantas como consecuencia del desarrollo. La MCP es un proceso conservado y ya se han descrito varios ejemplos en plantas. Durante el desarrollo del microgametofito (polen) ocurre la muerte de algunas células cuando éstas se colapsan alrededor del esporangio. Una vez maduro el polen, su germinación depende en gran medida de la degeneración de células de la superficie del estigma receptor, mismas que además intervienen previniendo la autopolinización mediante MCP. En el caso de polinización compatible, los tubos polínicos pueden causar MCP en las células del estilo para poder nutrirse durante su camino hasta el óvulo.

Para el caso de las raíces de algunas especies, las células de la periferia que rodean a la cofia sufren MCP después de ser desprendidas y convertirse en células del borde. Sin embargo, Jiang y colaboradores (datos no publicados) descartan que para el caso de la cofia de maíz, el desprendimiento de la última fila de células suceda como consecuencia de este proceso.

Los alineamientos múltiples realizados con las secuencias de aminoácidos de las clonas C8C2 e IH2B2 se muestran en las Figuras 13 y 14. Este análisis se realizó utilizando el programa T-Coffe (Notredame et al., 2000). Para resaltar las similitudes e identidades en las secuencias de las proteínas seleccionadas, el alineamiento se introdujo al programa BOXShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

A

```
GPKVSCNHNEQKLSXSPTPRKKRSMASEQGVVIACHSKAEFDAHMTKAQEAGKL  
VVIDFTAAWCGPCRAFAPLFVEHAKKFTQVVFLKVDVDEVKEVTAAYEVEAMPTF  
HXVKNGKTVATIVGAKRDELLALIEKHAAPA PAFASA Stop
```

B

```
GRKHRIVSLVAALLILLALAVSSTRNAQEDSMADNTGTLAGGIKDVPGNENDLHL  
QELARFAVDEHNKKANALLGFELVKAKTQVVAGTMYYLTIIEVKDGEVKKLYEAKV  
WEKPWEKFKELQEFKPVEEGASA Stop
```

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de las clonas A) C8C2, una tiorredoxina *h*, mostrando el sitio catalítico característico de estas proteínas (WCGPC) y B) IH2B2, que codifica para un inhibidor de cistein proteasas en plantas, mostrando algunos residuos propios de este tipo de inhibidores (QVVAG, G y W) así como una secuencia señal en la región N-terminal (secuencia subrayada). En cada recuadro se indica el ATG (M) y la posición del codón de término (stop).

De manera muy general, se propone que las dos proteínas identificadas y analizadas (C8C2 e IH2B2) están involucradas en procesos mediados por desarrollo. Por ejemplo, Lee y Lee, en 2003 ya habían detectado una secuencia genómica de una posible tiorredoxina *h* dentro de un grupo de genes expresados diferencialmente, cuando el polen es sometido a tratamiento por frío.

Dentro del estudio del patrón de expresión de cofia de maíz elaborado por Jiang et al., (datos no publicados) mediante el análisis de micro arreglos, se detecta expresión en este tejido tanto de cistatinas como de tiorredoxina *h*, lo cual apoya la presencia de estas dos proteínas en cofia como se describe en este trabajo. Los autores clasifican a la cistatina dentro del grupo de genes que responden a estrés, principalmente encargados de compensar mecanismos para sobrevivir en su medio, lo que es aplicable para las condiciones en las que se desarrolla la cofia y para el crecimiento del tubo polínico.

Por otra parte, la presencia de genes de tiorredoxina en la cofia puede atribuirse a la necesidad de mantener el estatus redox. En la cofia, el gran nivel de expresión de la ruta de tiorredoxinas es consistente con la necesidad de activación de vías de glicosilación, que incluyen enzimas que dependen de la capacidad reductora de la tiorredoxina. La presencia de tiorredoxina en la cofia puede también ser necesaria para contrarrestar la excesiva acumulación de auxinas y la continua degradación de pared celular durante la liberación de las células del borde (Jiang et al., datos no publicados). Durante el crecimiento del

tubo polínico ocurre un proceso de degradación similar en la pared celular, que se ha demostrado por la presencia de pectina metil esterasas que desmetilan pectinas para su posterior degradación por poligalacturonasa y pectato liasas (Hanson et al., 1989; Hall et al., 1994; Wakeley et al., 1998; Bosch et al., 2005).

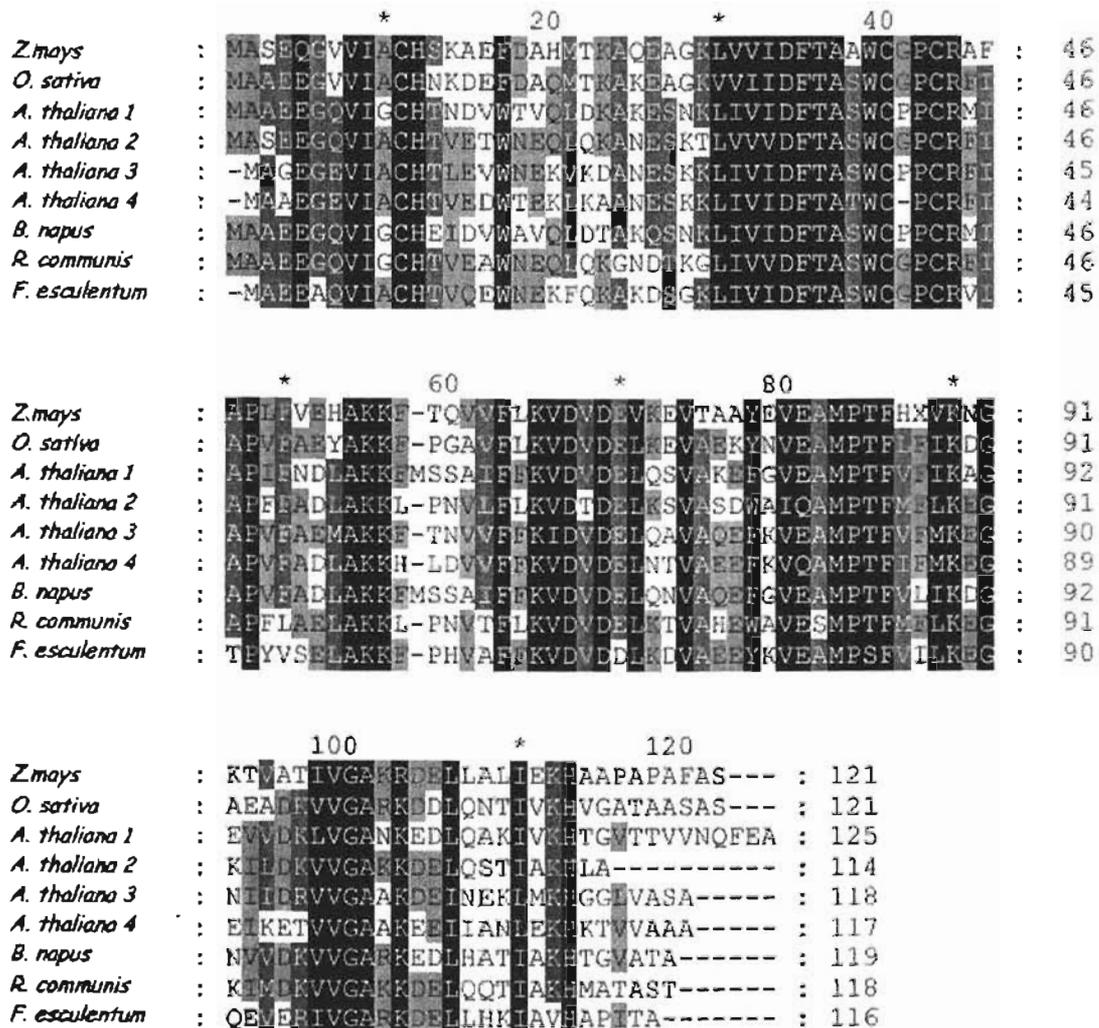


Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de C8C2 (*Z. mays*) con algunas tioredoxinas h descritas en plantas (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Ricinus communis* y *Fagopyrum esculentum*). Aún cuando los porcentajes de identidad y similitud son altos entre ellas, por ejemplo de 70%, se observan diferencias en el carboxilo terminal.

Los recuadros negros indican 100% de conservación a nivel de aminoácidos, blanco en gris es 80%, negro en gris es 60% y los aminoácidos no sombreados indican menos del 60% de similitud.

```

                *           20           *           40
Z.mays 1       : GRKHRIVSLVAALLVLLALA-VSSTRNA-QEDSMADNTCTLAGGIKD : 45
Z.mays 2       : MRKHRIVSLVAALLVLLALA-VSSTRNA-QEDSMADNTCTLAGGIKD : 45
Z.mays 3       : MRKHRIVSLVAALLVLLALA-VSSTRNA-QESVADNAGMIAGGIKD : 46
C.lacrima      : MRKHRIVSLVAALLVLLALA-VSSTRNAREEESMADDAGMIAGGIKD : 46
S.bicolor      : ---ARVPLVAALLVLLALA-VSSTRNR-NAQE-GEESMADGGIKD : 41
T.aestivum     : -----LLAIVVFFFTQ-TRTQSARDKAAMAEADAGPIVGGIKD : 35
O.sativa       : -----MSSDGGPFVLGGVEP : 14
H.vulgare      : -----MAEAAHGGGLRGRGVLLGGVQD : 22
V.unguiculata : -----MAALGCNRL : 9

```

```

                *           60           *           80           *
Z.mays 1       : VE-CNENDLHLOELARFAVDEHNKKANALLGFELVVKAKTQVVAGTM : 91
Z.mays 2       : VE-CNENDLHLOELARFAVDEHNKKANALLGFELVVKAKTQVVAGTM : 91
Z.mays 3       : VE-ANENDLHLOELARFAVDEHNCKANALLGFELVVKAKTQVVAGTM : 92
C.lacrima      : VE-ANENDLHLOELARFAVDEHNKKANALLGFELVVKAKTQVVAGTM : 92
S.bicolor      : VE-ANENDLHLOELARFAVDEHNKKANALLGFELVVKAKTQVVAGTM : 87
T.aestivum     : SEMGCENLDLIALARFAVSEHNKKANALLEFENVVRLKKTIVAGTM : 82
O.sativa       : S---CNENDLHIVDLARFAVDEHNKKANSLLEFELVSVKQOVVAGTL : 59
H.vulgare      : AHAGRENDLETIELARFAVAEHNKAKANALLEFELVVKVRQOVVAGCM : 69
V.unguiculata : VA-CNONSLETIDSLARFAVDEHNKKANALLEFGRVVSACCQVVSGLT : 55

```

```

                100           *           120           *
Z.mays 1       : YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVEGASA : 134
Z.mays 2       : YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVEGASA : 134
Z.mays 3       : YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVEGASA : 135
C.lacrima      : YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVEGASA : 135
S.bicolor      : YYLTVEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVEGASA : 130
T.aestivum     : HYITIRVTEGGAKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVEDA-IA : 125
O.sativa       : YYFTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVDASANA : 102
H.vulgare      : HHTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVAA----- : 107
V.unguiculata : YTIPLKADGGQKKVYEAKVWEKFWENFKELQEFKPVVDGAPA- : 97

```

Figura 14. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de IH2B2 (*Z. mays* 1) con inhibidores de proteasas descritos en otras plantas (*Zea mays*, *Coix lacrima*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* y *Vigna unguiculata*).

Los recuadros negros indican 100% de conservación a nivel de aminoácidos, blanco en gris es 80%, negro en gris es 60% y los aminoácidos no sombreados indican menos del 60% de similitud.

Recientemente, en los trabajos de Tung y colaboradores (2005) se buscaron genes expresados en el pistilo de *Arabidopsis* cuando el tubo polínico va creciendo, aún cuando la mayoría de los genes que obtuvieron no los clasifican en un grupo por desconocer su función, reconocieron algunos que están involucrados en la modificación de la matriz extracelular, principalmente en la degradación de pared celular, proponiendo que las pectinesterasas putativas y las peroxidasas pueden estar involucradas en el aflojamiento o rigidez de la pared celular. Por ejemplo, las peroxidasas pueden causar un aumento en la extensibilidad de la pared celular, mediante la generación de radicales hidroxilo que degradan polisacáridos de la pared celular, o incrementar la rigidez de la misma, mediando la velocidad con que se entrecruzan (insolubilizan) proteínas estructurales como extensinas ricas en prolinas que se acumulan en respuesta a daño físico, elicitores de hongos o infección por patógenos (Tung et al., 2005; Liskay et al., 2004).

La presencia de peroxidasas en la superficie del estigma, ha sido utilizada como indicativo de la receptividad del estigma para polinización en varias especies, implicando a las peroxidasas en el aflojamiento de la pared celular durante la polinización o maduración del estigma. Sin embargo, Tung y colaboradores, se atreven a especular que la actividad de una peroxidasa específica de las papilas, puede estar funcionando para el estiramiento de la pared celular epidermal, posiblemente entrecruzando proteínas estructurales, por ejemplo extensinas de alta expresión (Tung et al., 2005).

Para el caso de polen, se puede pensar que tanto la tiorredoxina *h* como la cistatina, podrán considerarse como genes de expresión tardía, dado que provienen de clones de un banco de polen maduro germinado *in vitro*, es decir, cuando ya hubo crecimiento del tubo polínico y debe continuarlo en coordinación con su medio a través del estigma.

Sin embargo, con los resultados obtenidos, sólo podemos especular cuando hablamos de proteínas y sus posibles funciones, pues éstas fueron determinadas basándonos en una estructura primaria de aminoácidos y se desconoce más sobre su verdadera función *in vivo*. La presencia de mRNA no es una evidencia conclusiva de la presencia de la proteína y de su función (puede ser que haya inhibición de la traducción o que la proteína este almacenada en la célula en alguna forma inactiva).

Aún cuando el polen expresa de manera específica muy pocos genes, comparado con los tejidos del resto de la planta, éstos son suficientes para tener mecanismos propios y bien organizados para la regulación de crecimiento, siendo este un ejemplo de cómo un pequeño grupo de genes es necesario para asegurar

un éxito evolutivo. Partiendo de que una proporción de 10% de genes tienen expresión específica en polen, suponíamos que en la búsqueda de clonas con expresión convergente en polen y cofia nos enfrentaríamos a pensar en resultados por debajo de ese porcentaje.

Los análisis de ontología de genes (GO) demuestran que la expresión de genes del gametofito masculino tiende a estar relacionada con señalización, tráfico de vesículas, metabolismo de la pared celular, transporte a través de membranas, citoesqueleto y por lo tanto, de manera indirecta, con la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Pina et al., 2005). Con base en el trabajo de Becker et al., (2003), se sabía que la posibilidad de encontrar genes involucrados en síntesis de proteínas, metabolismo o canales de agua, sería menor, comparando con aquellos genes que se han descrito como preferentemente expresados en tejidos que requieren de una alta velocidad de crecimiento y una gran capacidad regenerativa. El polen respira 10 veces más rápido que el tejido vegetativo y el desarrollo de polen en la antera y el crecimiento del tubo polínico es un proceso que necesita de mucha energía; el polen contiene 20 veces más mitocondrias por células que los tejidos vegetativos en maíz (Gass et al., 2005).

Por otra parte, Jiang y colaboradores (datos no publicados) en su análisis del perfil de expresión génica en raíz por micro arreglos, agrupan aquellos genes expresados preferentemente en la cofia y en la cofia lateral de maíz, detectando, por ejemplo la presencia de un gene específico de estigma (STG1) y algunas proteínas específicas de polen.

Las otras dos secuenciadas (C17C1 e IHI4) codifican para una proteína poliubiquitina y una α -2-tubulina, respectivamente. La presencia de α -2-tubulina resultó paradójico debido, a que estas proteínas siempre han sido consideradas como genes constitutivos, inclusive, en los análisis de expresión de este trabajo se uso como control positivo en el ensayo de RT-PCR.

Sin embargo, también se han encontrado isotipos muy divergentes con expresión preferencial en tejidos florales, con mínima expresión en hojas y raíces, como *TUAI*, considerado como específico de polen pero con bajos niveles de expresión en otros tejidos (Carpenter et al., 1992). La posible función de una tubulina en polen se entiende mejor si se relaciona con el crecimiento del tubo polínico. Cuando el tubo crece, el núcleo vegetativo y los núcleos espermáticos viajan a través del junto con muchas vesículas y otros organelos haciendo necesaria la formación de una red de actina. La identificación de una proteína kinesina en tubos polínicos, sugiere que los microtúbulos pueden tener el mismo papel en

transporte de núcleos espermáticos, organelos y vesículas. Específicamente el isotipo *TUA1* está en el núcleo vegetativo, pero no en los microtúbulos de los núcleos espermáticos. Debido a que no se detectó su expresión en pelos radicales, se descarta su participación en el crecimiento en punta. *TUA1* podría estar participando en algún proceso muy característico del polen, por ejemplo durante la fertilización, pero no se puede considerar como una función única del polen, pues aunque a niveles mínimos, si existe expresión en otros tejidos. Esta ligera expresión en tejidos esporofíticos puede ser expresión "remanente" de un gen con tendencia a ser polen-específico durante la evolución (Carpenter et al., 1992). En todo caso, este tipo de genes deben ser analizados más en detalle. En nuestro escrutinio, IHIA4, fue una clona seleccionada pero no la que presenta mayor diferencia entre los niveles de expresión con hoja ni con expresión estrictamente específica de polen y cofia.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se lograron identificar cuatro transcritos de genes expresados de manera preferencial en polen germinado *in vitro* y en cofia la raíz de *Zea mays*, resultado que nos permitiría afirmar de manera preliminar, que si existe convergencia en patrones de expresión génica entre cofia de raíz y polen germinado *in vitro* en esta planta monocotiledónea.

Aún cuando las clonas obtenidas corresponden a transcritos que no se expresan únicamente en polen y en cofia, la expresión preferencial en estas estructuras, pueden ser interesantes si se analizan de manera mas detallada.

Las estrategias para mejorar o profundizar en los resultados de éste trabajo se mencionan a continuación.

Un análisis tipo Northern blot utilizando otras partes del maíz (embriones, plántulas, pelos radicales, anteras, estigmas entre otros), indicaría de manera más certera que las clonas seleccionadas presentan patrones de expresión preferenciales en polen maduro germinado *in vitro* y en cofia, permitiendo descartar aquellas con expresión constitutiva.

De acuerdo a la clasificación de genes expresados en polen como tempranos y tardíos (Mascarenhas, 1990) y para confirmar la hipótesis de que tanto la tiorredoxina *h* como la cistatina podrán considerarse como genes de "expresión tardía", sería interesante hacer un análisis de expresión espacio-temporal tipo Northern blot utilizando RNA de polen de maíz obtenido de varios estadios de

transporte de núcleos espermáticos, organelos y vesículas. Específicamente el isotipo *TUA1* está en el núcleo vegetativo, pero no en los microtúbulos de los núcleos espermáticos. Debido a que no se detectó su expresión en pelos radicales, se descarta su participación en el crecimiento en punta. *TUA1* podría estar participando en algún proceso muy característico del polen, por ejemplo durante la fertilización, pero no se puede considerar como una función única del polen, pues aunque a niveles mínimos, si existe expresión en otros tejidos. Esta ligera expresión en tejidos esporofíticos puede ser expresión "remanente" de un gen con tendencia a ser polen-específico durante la evolución (Carpenter et al., 1992). En todo caso, este tipo de genes deben ser analizados más en detalle. En nuestro escrutinio, IHIA4, fue una clona seleccionada pero no la que presenta mayor diferencia entre los niveles de expresión con hoja ni con expresión estrictamente específica de polen y cofia.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se lograron identificar cuatro transcritos de genes expresados de manera preferencial en polen germinado *in vitro* y en cofia la raíz de *Zea mays*, resultado que nos permitiría afirmar de manera preliminar, que si existe convergencia en patrones de expresión génica entre cofia de raíz y polen germinado *in vitro* en esta planta monocotiledónea.

Aún cuando las clonas obtenidas corresponden a transcritos que no se expresan únicamente en polen y en cofia, la expresión preferencial en estas estructuras, pueden ser interesantes si se analizan de manera mas detallada.

Las estrategias para mejorar o profundizar en los resultados de éste trabajo se mencionan a continuación.

Un análisis tipo Northern blot utilizando otras partes del maíz (embriones, plántulas, pelos radicales, anteras, estigmas entre otros), indicaría de manera más certera que las clonas seleccionadas presentan patrones de expresión preferenciales en polen maduro germinado *in vitro* y en cofia, permitiendo descartar aquellas con expresión constitutiva.

De acuerdo a la clasificación de genes expresados en polen como tempranos y tardíos (Mascarenhas, 1990) y para confirmar la hipótesis de que tanto la tiorredoxina *h* como la cistatina podrán considerarse como genes de "expresión tardía", sería interesante hacer un análisis de expresión espacio-temporal tipo Northern blot utilizando RNA de polen de maíz obtenido de varios estadios de

desarrollo (microsporas, polen después de la dehiscencia, las últimas etapas de germinación y fertilización) con sondas de las clonas con patrón de expresión preferencial en polen germinado *in vitro* y cofia.

De igual manera, para acercarnos a una mejor interpretación de sus posibles funciones, se debe considerar: 1) la futura caracterización bioquímica e inmunolocalización de los productos de los genes identificados 2) El evaluar la capacidad de la tiorredoxina (al catalizar la reducción de enlaces disulfuro de alguna proteína en presencia de un agente reductor) y de la cistatina como inhibidor de proteasas.

Para continuar con la caracterización molecular de las clonas, sería interesante obtener clonas genómicas mediante un tamizado en un banco genómico de *Zea mays*. Esto nos ayudaría, por ejemplo, a saber si en las regiones no traducidas de los transcritos (en el promotor) se localizan secuencias que confieren mayor expresión en un tejido en particular o dominios responsables de la expresión órgano-específica, o si existen regiones de regulación (posibles cajas de regulación) que controlen la expresión bajo diferentes condiciones (estrés, hormonas, etc.) y/o en diferentes etapas de desarrollo, tanto de polen, como de cofia.

Siguiendo con el análisis de expresión, se podría determinar la correspondencia de patrones de acumulación de transcrito-proteína, para buscar si existe algún mecanismo que establezca al mRNA o si existe algún tipo de control post-transcripcional en algunos tejidos de la planta.

Otro enfoque sería la obtención de plantas transgénicas para reprimir la expresión de los genes identificados. Por ejemplo, usando ablación genética mediante la expresión de una citotoxina bajo el control de un promotor regulado y específico para una célula en particular.

A mediano plazo, sería interesante continuar con la búsqueda de clonas con expresión específica de polen germinado *in vitro*-cofia. Una primera idea es tamizar el banco de cDNA de polen con sondas sustractivas para eliminar transcritos presentes, por ejemplo, en hojas.

El hecho de que el número de genes obtenidos no es abundante y de que no se encontraron algunos genes que se suponían como posibles, puede deberse principalmente a factores experimentales que en un futuro deben ser controlados. Por ejemplo, en el banco pueden no estar representados aquellos genes necesarios para la interacción del polen con el estigma porque el banco

proviene de polen germinado *in vitro*, sin la presencia del estigma o del tejido de transmisión, lo cual se puede solucionar obteniendo polen germinado *in vivo* y aumentar el número de posibles pectinesterasas, extensinas y algunas proteasas que facilitan al tubo polínico su paso por el tejido de transmisión.

Posteriormente, aprovechando los recientes análisis del transcriptoma de polen y la posibilidad de hacer análisis Northern blot virtuales, se podría determinar si otros genes de cofía ya descritos tienen un papel análogo en polen y tubo polínico mediante RT-PCR.

En estudios posteriores de este tipo, deberán considerarse algunos otros aspectos como la organización del genoma y su influencia en la coexpresión de algunos genes. Por ejemplo, considerar que una gran fracción de los genes de *Arabidopsis* están organizados en dominios de cromatina y presentan patrones de coregulación en respuesta a señales de desarrollo o ambientales (Ligeng et al., 2005), podría darnos una idea de que tan probable es la convergencia génica entre dos tipos celulares.

Finalmente la continuidad de este proyecto, con algunas de las estrategias planteadas, podría resultar en el aislamiento y caracterización de otros genes con patrones de expresión específica, ya sea del esporofito o del gametofito de *Zea mays*, que podría aplicarse como herramienta de selección para el desarrollo de plantas que respondan a diversos estímulos del medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aiken RM, Smucker AJM (1996) Root system regulation of whole plant growth. *Annu Rev Phytopathol* **34**:325-346
- Bacic A, Moody SF, Clarke AE (1986) Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L). *Plant Physiol* **80**:771-777
- Balmer Y, Buchanan B (2002) Yet another plant thioredoxin. *Trends in Plant Sci* **7**: 191-193
- Barlow P (1975) The root cap. In: Development and function of roots. Taney VG, Clarson DT (Eds.) London Academic Press, pp. 21-54.
- Becker JD, Boavida LC, Carneiro J, Haury M, Feijó JA (2003) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiol* **133**: 713-725
- Bedinger PA (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**:879-887
- Bedinger PA, Hardeman KJ, Loukides CA (1994) Travelling in style: the cell biology of pollen. *Trends in Cell Biol* **4**: 132-138
- Bibikova, T.N., A. Zhigilei, and S. Gilroy (1997) Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* **203**:495-505.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey P (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**: 1956-1960
- Bosch M, Cheung AY, Hepler P (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol* **7**:1-13
- Bower MS, Matias DD, Fernández-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ, Goring DR (1996) Two members of the thioredoxin-*h* family interact with the kinase domain of a Brassica *S* locus receptor kinase. *Plant Cell* **9**: 1641-1650
- Brett C, Waldon K (1990) Physiology and biochemistry of plant cell walls. In: Topics in plant physiology II. Black M, Chapman J (Eds)

- Brigham LA, Woo H, Wen F, Hawes M (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
- Capote-Mainez N y Sánchez F (1997) Characterization of the common bean uricase II and its expression in organs other than nodules. *Plant Physiol* **115**: 1307-1317
- Carpenter JL, Ploense SE, Snustad P, Silflow CD (1992) Preferential expression of an α -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen. *Plant Cell* **4**: 557-571
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 281-309
- van Doorn W, Woltering E (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Sci* **10**: 117-122
- Edlund AF, Swanson R, Preuss D (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* **16**: S84-S97
- Eguiarte LE, Castillo A, Souza V (2003) Evolución molecular y genómica en angiospermas. *INCI*. **28**: 141-147.
- Esau K (1977) Anatomy of seed plants. Wiley and sons (Eds). USA. pp 403-424
- Feijó JA, Sainhas J, Holdaway-Clarke T, Cordeiro MS, Kunkel JG, Hepler PK (2001) Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm. *Bioessays* **23**:86-94
- Fincher G, Stone B, Clarke A (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **34**: 47-70
- Finnegan EJ (2001) Is plant gene expression regulated globally? *Trends in Genet* **17**:361-365
- Fizames C, Muños S, Caztttes C, Nacry P, Boucherez J, Gaymard F, Piquemal D, Delorme V, Commes T, Doumas P, Cooke R, Marti J, Sentenac H, Gojon A (2004) The *Arabidopsis* root transcriptome by serial analysis of gene expression. Gene identification using the genome sequence. *Plant Physiol* **134**: 67-80
- Fosket DE (1994) Plant growth and development. A molecular approach. Academic Press Inc. USA pp 79-195

- Frankis RC (1990) RNA and protein synthesis in germinating pine pollen. *J Exp Bot* **41**:1469-1473
- Frankis RC, Mascarenhas P (1980) Messenger RNA in the ungerminated pollen grain: a direct demonstration of its presence. *Ann Bot* **45**: 595-599
- Frankling-Tong V (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* **11**: 727-738
- Gass N, Glagotskaia T, Mellema S, Stuurman J, Barone M, Mandel T, Roessner-Tunalli U, Kuhlemeier (2005) Pyruvate decarboxylase provides growing pollen tubes with a competitive advantage in petunia. *Plant Cell* **17**: 2355-2368
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot P (2004) The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol and Bioch* **42**: 265-271
- Guyon VN, Astwood JD, Garmer EC, Dunker AK, Taylor LP (2000) Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in Petunia. *Plant Physiol* **123**: 699-710
- Hall L, Bird C, Picton S, Tucker G, Seymour G, Grieson D (1994) Molecular characterization of cDNA clones representing pectin esterase isozymes from tomato. *Plant Mol Biol* **25**: 313-318
- Hanson DD, Hamilton DA, Travis JL, Bashe DM, Mascarenhas JP (1989) Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. *Plant Cell* **1**: 173-179
- Hawes M, Bengough G, Cassab G, Ponce G (2003) Root caps and rhizosphere. *J Plant Growth Regul* **21**:352-367
- Hepler PK, Vidali L, Cheung AY (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:159-187
- Heuer S, Lorz H, Dresselhaus Th (2000) The MADS box gene ZmMADS2 is specifically expressed in maize pollen during maize pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* **13**:21-27
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acid Research* **27**: 297-300

- Hodge R, Paul W, Draper J y Scott R (1992) Cold-plaque screening: a simple technique for the isolation of low abundance, differentially expressed transcripts from conventional cDNA libraries. *Plant J* 2:257-260
- Honys D, Twell D. (2003) Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiol* 132: 640-652
- Ikeda S, Nasrallah JB, Dixit R, Preiss S, Nasrallah ME (1997) An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self compatibility response. *Science* 276: 2564-1566
- Jiang K, Feldman L (2003) Root meristem establishment and maintenance: the role of auxin. *J Plant Growth Regul* 21: 432-440
- Jiang K, Zhang S, Lee S, Tasi G, Zhu G, Feldman L . Transcription profile analysis of the maize root cap reveals new and complex functions (En preparación)
- Jones M, Shen J, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson C (2002) The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both hair initiation and tip growth. *Plant Cell* 14: 763-776
- Joos U, Vanaken J, Kristen U (1994) Microtubules are involved in maintaining the cellular polarity in pollen tubes of *Nicotiana sylvestris*. *Protoplasma* 179: 5-15
- Jung SH, Lee JY, Lee DH (2003) Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress. *Plant Mol Biol* 52: 553-567
- Kaufman P, Wu W, Kim D, Cseke L (1995) Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. CRC Press
- Kuroda M, Kiyosaki T, Matsumoto I, Misaka T, Arai S, Abe K (2001) Molecular cloning, characterization and expression of wheat cystatins. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 22-28
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reicheld JP (2004) The *Arabidopsis* cytosolic *h5* gene induction by oxidative stress and its w-box mediated response to pathogen elicitor. *Plant physiol* 134: 1006-1016
- Lee JY, Lee DH (2003) Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol* 132:517-529

- Leszek D Vincent. *Zea mays* (Maize, Corn), University of Missouri, Columbia, Missouri, USA ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES/& 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net
- Ligeng Ma, Ning Un, Xigang Lu, Yuling Jiao, Hongyu Zhao, Xing Wang Deng (2005) Organ-specific expression of *Arabidopsis* genome during development. *Plant Physiol* **138**: 80-91
- Liszka A, van der Zalm E, Schopfer P (2004) Production of reactive oxygen intermediates (O_2 , H_2O_2 and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* **136**: 3114-3123.
- Lockhart D, Winzeler E (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-836
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol* **122**:3-9
- Mandava NB (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**:23-52
- Marton ML, Cordts S, Broadhvest J, Dresselhaus T (2005) Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. *Science* **307**:573-576
- Mascarenhas J (1989) Characterization of genes that are expressed in pollen. The Molecular Basis of Plant Development. Ed. Alan R. Lis Inc. pp. 99-105
- Mascarenhas J (1990) Gene activity during pollen development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**:317-318
- Mascarenhas J (1993) Molecular mechanism of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* **5**: 1303-1314
- Mascarenhas JP, Frankis R (1980) Messenger RNA in the ungerminated pollen grain: a direct demonstration of its presence. *Ann Bot* **45**: 595-599
- Mascarenhas JP, Stinson JS, Willing P, Pe ME (1984) Genes and their expression in the male gametophyte of flowering plants. Biotechnology and Ecology of Pollen. Ed. Mulcahy. Springer Verlag
- Matsuyama T, Satoh H, Yamada Y, Hashimoto T (1999) A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant Physiol* **120**: 665-674

- Mauseth J (1991) Botany. An Introduction to Plant Biology. Saunders College Publishing
- McCormick Sh, Twell D, Vancannaeyt G, Yamaguchi J (1981) Molecular analysis of gene regulation and function during male gametophyte development. Symposia of the Society for experimental biology
- McCormick Sh, Yang H (2005) Is there more than one way to attract a pollen tube? *Trends in Plant Sci* 10:260-263
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld Ph (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods in Enzimology* 347: 394-402
- Meyer Y, Verdoucq L, Vignols F (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends in Plant Sci* 4: 388-394
- Montoliu L, Rigau J, Puigdomènech P (1989) A tandem of α -tubulin genes preferentially expressed in radicular tissues from *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 14:1-15
- Mousavi A, Hiratsuka R, Takase H, Hiratsuka K, Hotta, Y (1999) A novel glycine-rich protein is associated with starch grain accumulation during anther development. *Plant and Cell Physiol* 40: 406-416
- Mu JH, Stains J, Kao T (1994) Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin-esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol Biol* 25:539-544
- Notredame C, Higgins D, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *J Mol Biol* 302: 205-217
- Pedersen S, Simonsen V, Loeschcke V (1987) Overlap of gametophytic and sporophytic gene expression in barley. *Theor Appl Genet* 75: 200-206
- Pina C, Pinto F, Feijo JA, Becker JD (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* 138: 744-756
- Poirier G, Pyati J, Wan J, Erlander M (1997) Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Res* 25: 913-914

- Ponce G, Luján R, Campos ME, Reyes A, Nieto-Sotelo J, Feldman L, Cassab G (2000) Three maize root-specific genes are not correctly expressed in regenerated caps in the absence of the quiescent center. *Planta* **211**: 23-33
- Rivera-Madrid R, Mestres D, Marinho P, Jacquot JP, Decottignies P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y (1995) Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci* **92**: 5620-5624
- 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.
- Rubin GM (2001) Comparing species. *Nature*. **409**: 820-821
- Rubinstein AL, Prata RTN, Bedinger PA (1995) Developmental accumulation of hydroxyproline and hydroxyproline-containing proteins in *Zea mays* pollen. *Sex Plant Reprod* **8**: 27-32
- Rzychon M, Chmiel D, Stec-Niemczyk J (2004) Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochimica Polonica* **51**: 861-873
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Sari-Gorla M, Frova C, Binelli G, Ottaviano E (1986) The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theor Appl Genet*. **72**: 42-47
- Sari-Gorla M, Gatti E, Villa M, Pè ME (1997) A multi-nucleate male-sterile mutant of maize with gametophytic expression. *Sex Plant Reprod* **10**:22-26
- Scheres B, McKhann H, van de Berg C, Willemsen V, Wolfenkelt H, de Vrieze G, Weisbeek P (1996) Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant soil* **187**: 97-105
- Schiefelbein J, Galway M, Masucci J, Ford S (1993) Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **103**: 979-985
- Sievers A, Braun M (1996) The root cap: structure and function. In *Plant Roots: The Hidden Half*. Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (Eds.) Marcel Dekker, Madison, WI, pp. 31-49

- Solomon M, Belenghi B, Delledone M, Menachem E, Levine A (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**:431-443
- Stinson J, Eisenberg A, Willing P, Enrico M, Hanson D, Mascarenhas J (1987) Genes expression in the male gametophyte of flowering plants and their isolation. *Plant Physiol* **83**: 442-447
- Suzuki Y, Yoshimoto-Nakagawa, K, Murayama K, Suyama A, Sugano S (1997) Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-riched cDNA library. *Gene* **200**:149-156
- Tanksley SD, Zamir D, Rick CM (1981) Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. *Science* **213**: 453-455
- Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:461-491
- Tung C, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB (2005) Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol* **138**: 977-989
- Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick Sh (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene. *Mol Gen Genet* **217**: 240-245
- Vasil IK (1987) Physiology and culture of pollen. *International Review of Cytology*. **107**: 127-174
- Wakeley PR, Rogers HJ, Rozycka M, Greenland AJ, Hussey PJ (1998) A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol Biol* **37**: 187-192
- Willing RP, Mascarenhas JP (1984) Analysis of the complexity and diversity of mRNAs from pollen and shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiol* **75**: 865-868
- Willing RP, Bashe D, Mascarenhas JP (1988) An analysis of the quantity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of *Zea mays*. *Theor. Appl Genet* **75**: 751-753
- Ying-Feig Huang, Wayne R, Jordan, Rod A. Wing, Page W. Morgan (1998) Gene expression induced by physical impedance in maize roots. *Plant Mol. Biol.* **37**: 921-930.