

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
DE PLANTAS**

**CARACTERIZACIÓN DEL GEN *OsWuschel*
Y SU FAMILIA EN *Oryza sativa*.**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias y
Biotecnología de Plantas presenta:

JULIA DEL SOCORRO CANO SOSA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN, A.C.**

Mérida, Yucatán, México

2009



Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



Julia del Socorro Cano Sosa

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna a quien agradezco el apoyo y la confianza brindada durante la realización de este trabajo de tesis.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca de Doctorado (185748) para Julia del Socorro Cano Sosa por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente,

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna por su apoyo, aportaciones y dirección durante la realización de esta tesis.

A los Doctores Ileana Echevarría Machado, Nina Valadez González, Felipe Sanchez Teyer, Oscar Moreno Valenzuela, Víctor Manuel Suárez Solís, Luis Carlos Rodríguez Zapata y Enrique Castaño de la Serna por sus valiosas aportaciones en la revisión de este escrito.

A la Q. I. Ángela Ku González por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A mi hermosa familia; por su apoyo, amor y comprensión en todo momento. Mama, Papa y Hermana, los amo.

A mi esposo; por su apoyo, comprensión y amor. Gracias Daniel.

Al grupo del Dr. Enrique Castaño de la Serna por todas las facilidades prestadas durante la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio, Rocío, Ángela, Citlali, Anely, Diana, Fátima, Nancy, Gorety, Juan, Miguel.

A todos mis profesores, por que fueron parte de mi formación.

Y a todos los que de alguna forma u otra ayudaron o estuvieron presentes durante la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
BIBLIOGRAFÍA	2
JUSTIFICACIÓN	3
CAPÍTULO I	5
1. Antecedentes	
1.1 El meristemo	5
1.1.2 Arquitectura del meristemo	6
1.1.3. Origen y mantenimiento del meristemo	7
1.2 WUSCHEL	
1.3 Genes Wox	12
1.4 transcripción	13
1.4.1 Regulación de la transcripción	14
1.4.2 Factores de Transcripción	14
1.5 Proteínas con homeodominio	15
1.6 Evolución molecular y filogenética	15
1.7 Bibliografía	17
1.8 Objetivo general	21
1.9 Objetivos particulares	21
1.10 Diseño experimental	22

CAPÍTULO II	23
2.1 Meristemas: Fuente Inagotable de Vida Vegetal	23
2.1.1 ¿Qué son los Meristemas?	23
2.1.2 Arquitectura	24
2.1.3 Formación	25
2.1.4 algo más	26
2.1.5 Anexo	27
2.1.5.1 Funciones principales de los Meristemas	27
2.1.6 Entretextos	27
2.1.7 Bibliografía	28
CAPÍTULO III	29
3. Phylogenetic Analysis of WUSCHEL and WOX Members in <i>Oryza sativa</i>	29
3.1 Summary	29
3.2 Introduction	30
3.3 Methods	32
3.3.1 Sequence data	32
3.3.3 Multiple sequence alignments	33
3.3.4 Phylogenetic Analysis	33
3.4 Results	34
3.4.1 Sequence Alignments	34
3.4.2 Conserved regions and typical motifs in the sequences of family WOX	35
3.4.3 Phylogenetic Relationships-WOX	36
3.5 Discussion	40
3.6 Reference	43

CAPÍTULO IV	47
4. Clonación del promotor del gen OsWuschel de <i>Oryza sativa</i>	47
4.1 Introducción	47
4.2 Materiales y métodos	48
4.2.1 Análisis de sitios de unión al promotor de OsWus	48
4.2.2 Diseño de oligonucleótidos	48
4.2.3 Análisis de restricción	48
4.2.4 Desinfección y germinación de semillas de <i>O. sativa</i>	48
4.2.5 Extracción de ADN de <i>O. sativa</i>	49
4.2.6 Reacciones de PCR	49
4.3 Resultados	50
4.3.1 Sitios de Unión a la secuencia del posible promotor OsWus	50
4.4 Clonación de un segmento del posible promotor de OsWus	51
4.5 Discusión	59
4.6 Bibliografía	60
CAPÍTULO V	
5.1 Discusión general	63
5.2 Bibliografía	66
CAPÍTULO VI	
6.1 Perspectivas	67

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AG	Agamous (Gen involucrado en la floración)
ANT	Antenapedia (Gen de desarrollo)
ARR5	Gen 5 de respuesta a auxinas
ARR6	Gen 6 de respuesta a auxinas
ARR7	Gen 7 de respuesta a auxinas
ARR15	Gen 15 de respuesta a auxinas
BLAST	Programa de alineamiento local básico
Clv1	Clavata 1 (Receptor tipo cinasa)
Clv2	Clavata 2 (Proteína de unión tipo cinasa)
Clv3	Clavata 3 (Proteína Activadora tipo cinasa)
CZ	Zona Central
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E2F1	Factor que activa el promotor viral E2
GAA	Gen de respuesta a Giberelinas
GUS	Gen de Glucoronidasa
HD-Zip	Proteína con homeodominio y motivos tipo cierre de leucina
Knox	Genes que regulan la función del meristemo
LEAFY	Gen que controla la identidad floral
MYB	Activadores transcripcionales
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
OsWus	Homologo del gen Wuschel en arroz
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PZ	Zona Periférica
PVP	Polivinilpirrolidona

QC	Centro Quiescente
QE	Elemento cuantitativo
RACE	Amplificación rápida de los extremos de cADN
RAM	Meristemo de Ápice de la Raíz
RE1	Elemento de respuesta 1
RE2	Elemento de respuesta 2
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido Ribonucleico
RNApol II	RNA polimerasa II
RZ	Zona de Reborde
SAM	Meristemo del ápice del tallo
SDS	Dodecil Sulfato de sodio
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TIGR	Instituto de Investigación Genómica
Wus	Gen Wuschel
Wox	Genes con homeobox relacionados con Wuschel
Wox1	Gen 1 de la familia de WUSCHEL
Wox2	Gen 2 de la familia de WUSCHEL
Wox3	Gen 3 de la familia de WUSCHEL
Wox4	Gen 4 de la familia de WUSCHEL
Wox5	Gen 5 de la familia de WUSCHEL
Wox6	Gen 6 de la familia de WUSCHEL
Wox7	Gen 7 de la familia de WUSCHEL
Wox8	Gen 8 de la familia de WUSCHEL
Wox9	Gen 9 de la familia de WUSCHEL
Wox10	Gen 10 de la familia de WUSCHEL
Wox11	Gen 11 de la familia de WUSCHEL
Wox12	Gen 12 de la familia de WUSCHEL
Wox13	Gen 13 de la familia de WUSCHEL

Wox14

Gen 14 de la familia de WUSCHEL

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Number of sequences obtained in GeneBank and TIGR for phylogenetic analysis.	32
Tabla 2. Accession numbers sequences selected of family WUS Orthologs in rice.	35
Tabla 4.1. Oligonucleotidos diseñados para la clonación del promotor de Xp_474234.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Planta de <i>Arabidopsis</i> .	5
Figura 1.2. Histología el meristemo apical de tallo (SAM).	6
Figura 1.3. Esquema de una sección longitudinal de la raíz.	7
Figura 1. 4. Formación de SAM durante la embriogénesis en <i>Arabidopsis</i> .	7
Figura 1.5. Localización nuclear de WUS.	9
Figura 1.6. Sobre expresión de WUS en <i>Arabidopsis</i> .	10
Figura 1.7. Meristemos ectópicos en plantas de <i>Arabidopsis</i> , que sobreexpresan WUS.	11
Figura 1.8. Arquitectura del promotor del gen <i>Wus</i> en <i>Arabidopsis</i> .	12
Figura 1.9. Comparación de aminoácidos entre los miembros de la familia de WUS.	13
Figura 2.1. La planta y sus meristemos.	24
Figura 2.2. Meristemo de la raíz.	25
Figura 2.3. Origen de los meristemos en la planta.	26
Figure 3.1. Phylogenetic test of WOX 1.	37
Figure 3.2. Phylogenetic test of WOX 2 to WOX14 in rice.	38
Figure 3.3. Phylogenetic tree of Wuschel.	39
Figura 4.1. Sitios de unión para factores de transcripción en la secuencia del posible promotor OsWUS (XP_474234).	51
Figura 4.2. Posible promotor OsWus.	52
Figura 4.3 Clonación de un fragmento de 536pb del posible promotor de OsWus.	52
Figura 4.4 Clonación de un fragmento de 743pb del posible promotor de OsWus.	53
Figura 4.5 Clonación de un fragmento de 877pb del posible promotor de OsWus.	54

RESUMEN

El gen *Wuschel* (*Wus*) codifica para un factor de transcripción que se expresa en células precursoras del meristemo. Su función radica en la regulación celular que determina la formación del meristemo embrionario, además de que indirectamente mantiene indiferenciadas las células pluripotenciales del mismo. Este gen fue reportado por primera vez en *Arabidopsis thaliana* y posteriormente en otras plantas como *Petunia hybrida*, *Lycopersicon esculentum*, *Antirrhinum majus* y *Zea mays*.

La familia a la que pertenece el gen *Wus* en *Arabidopsis* está conformada por 14 genes denominados "Wox". Homólogos de algunos de ellos han sido reportados en plantas de arroz (*Wox 5*) y de maíz (*Wox 3*). Los factores *Wox* están implicados en diversos procesos en plantas, incluyendo la embriogénesis y el desarrollo.

Las plantas en las cuales se han reportado los genes *Wox*, son principalmente dicotiledóneas, en el caso de monocotiledóneas no se han realizado estudios de la mayoría de los miembros de esta familia. En este estudio se utilizó de la información del genoma de *Oryza sativa* para determinar la filogenia de esta familia de factores transcripcionales.

Para esto, se utilizaron dos bancos de genes (Gen Bank y TIGR) y el programa Blast. Usando las secuencias de aminoácidos, la de nucleótidos y la del homeodominio del gen *Wus* y su familia en *Arabidopsis*, se obtuvieron más de 3000 secuencias relacionadas con la familia de genes *Wox*, posteriormente estas secuencias fueron utilizadas para realizar alineamientos en el programa CLUSTAL W y escrutinio visual, mediante lo cual se seleccionó la secuencia con el número de accesión XP_474234 como el posible ortólogo de este gen en *Oryza*. Para el resto de la familia se determinó un menor número que el reportado para *Arabidopsis*, debido a la repetición de secuencias en algunos miembros de la familia, por lo que es necesario realizar análisis funcionales para determinar las secuencias homólogas posibles para cada *Wox* en *Oryza sativa*.

De la secuencia seleccionada para el ortólogo del gen *Wus* en *Oryza* se diseñaron oligonucleótidos, para obtener por medio de PCR la secuencia del promotor de *OsWus*.

ABSTRACT

Wuschel (Wus) gene encodes a transcription factor that is expressed in meristem precursor cells. Its function is based in the cellular regulations that specify meristem formation of the embryo and keeps pluripotential undifferentiated cells. The gene was reported for the first time in *Arabidopsis thaliana* plants and later in *Petunia* hybrid *Lycopersicon esculentum*, *Antirrhinum majus* and *Zea mays*. The family belongs to the Wus gene in *Arabidopsis* has 14 genes called Wox. Orthologs of them have been reported in plants like rice (Wox 5) and zeamays (Wox 3). The Woxes are implicated in embriogenic processes and development.

Plants in which Wox genes have been reported are mainly dycots, in the case of monocots the members to this family have a few reports. In this study we made use of the genome information of *Oryza sativa* to determine the phylogeny of this family to transcription factors.

I used two gene banks (Gen Bank and TIGR) and the Blast program to gather primary sequence information.

Using amino acids, nucleotides and Homeodomain sequences to the Wus gene reported in *Arabidopsis*. We obtained more than 3000 sequences, which were used for alignments in CLUSTAL W and visual screening, later selecting the sequence with accession number XP_474234 as possible ortholog of Wus gene in *Oryza*. For the rest of the family we determined smaller number of Wox genes compared with the reported for *Arabidopsis*. Due to the repetition of sequences from some family members it is necessary to make a functional analysis to determine the possible ortholog sequence for each Wox.

To the sequence selected for the Wus ortholog in *Oryza* was designed oligonucleotides to obtain by PCR sequencing of the gene and its promoter.

INTRODUCCIÓN

El gen *Wuschel* (*Wus*) codifica para una proteína que actúa como un factor transcripcional. Este gen tiene una función importante en la regulación celular durante la formación del meristemo embrionario, manteniendo indiferenciadas las células del meristemo. (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998). Fue reportado primeramente en *Arabidopsis thaliana* y posteriormente en otras plantas como *Petunia hybrida*, *Licopersicum esculentum*, *Antirrhinum majus* y más recientemente en *Zea mays* (Nardmann *et al.*, 2006).

Se ha observado que la sobreexpresión del gen *Wus* promueve la transición del estado vegetativo al estado embrionario en explantes de *Arabidopsis*, lo cual provee un modelo para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas (Zuo *et al.*, 2002).

La familia a la que pertenece el gen *Wus* en *Arabidopsis* está conformada por 14 genes denominados "Wox". Se han reportado homólogos en arroz (*Wox 5*) y en maíz (*Wox 3*) (Kamiya *et al.*, 2003) (Nardmann *et al.*, 2007). Los factores *Wox* están implicados en diversos procesos de desarrollo en plantas, incluyendo la embriogénesis.

Estos genes codifican proteínas a con homeodominios (secuencias específicas de unión a ADN, de aproximadamente 60 a.a. y que determinan diferenciación celular tanto en plantas como en animales). El gen *Wus* contiene un homeodominio de 66 aminoácidos y los miembros de la familia *Wox* poseen uno de 65 aminoácidos. Además, contienen una caja consenso, conocida como caja *WUS* (TLPLFPMH) la cual se conserva en la mayoría de los miembros de esta familia (Haecker *et al.*, 2004).

En el presente trabajo utilizando como modelo de estudio a *Oryza sativa*, se definieron los genes *Wox* y *Wuschel* a través de análisis filogenéticos de secuencias reportadas en el Gene Bank y en una base específica de arroz (TIGR), ya que se tiene la ventaja de que el genoma de *Oryza* está reportado.

BIBLIOGRAFÍA

Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. and Laux T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 657-668.

Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y. and Matsuoka M. (2003). Isolation and characterization of rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal*, 35, 429-441.

Laux T., Mayer K. F., Jurgens G. and Berger J. (1996). The Wuschel gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122, 87-96.

Mayer K. F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G. and Laux T. (1998). Role of Wuschel in regulating stem cell fate in *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95, 805-815.

Nardmann J., Ji J., Werr W. and Scanlon M. J. (2004). The maize duplicate genes narrow sheath1 and narrow sheath2 encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development*, 131, 2827-2839.

Nardmann J. and Werr W. (2006). The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of *WUS* orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 2492-2504.

Zuo J., Niu Q.W., Frugis G. and Chua N.H. (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The plant Journal*, 30(3), 349-359.

JUSTIFICACIÓN

Las plantas en las cuales están reportados los genes *Wox* y el gen *Wuschel*, son principalmente dicotiledóneas, en el caso de monocotiledóneas aún es muy poco el conocimiento de estos genes.

Oryza sativa es una monocotiledónea cuya ventaja es que su genoma está reportado. El genoma de arroz sirve como modelo para uno de los grupos de plantas, las monocotiledóneas, de la misma manera que lo es *Arabidopsis* para el grupo de las eudicotiledóneas.

Además es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, su valor nutritivo varía según las variedades, la mayoría de las cuales se han obtenido por selección de la especie *Oryza sativa*. Y los periodos de germinación que requiere esta planta son cortos, lo que también la hace ser un buen modelo.

Debido a lo anterior se escogió como modelo de estudio para la realización de este proyecto a *Oryza sativa*. El conocimiento sobre genes que regulan el desarrollo de la planta es de suma importancia, por lo cual la caracterización del gen *Wuschel* y los genes *Wox* en esta planta aportaría nuevos datos acerca de la conservación y la posible función de esta familia de genes en monocotiledóneas, al igual que en eudicotiledóneas.

CAPITULO I

1. Antecedentes

1.1 EI MERISTEMO

Las plantas tienen la capacidad de producir órganos y tejidos a lo largo de toda su vida, esto es posible debido a que poseen una zona o tejido embrionario denominado meristemo (Steeves and Sussex., 1989).

El meristemo es una población de células localizadas en el ápice del tallo (SAM), de la raíz (RAM) como se observa en la figura 1.1 y ocasionalmente a lo largo de toda la planta (meristemos axilares). Produce órganos laterales, tejidos y se regenera así mismo (Fletcher., 2002).

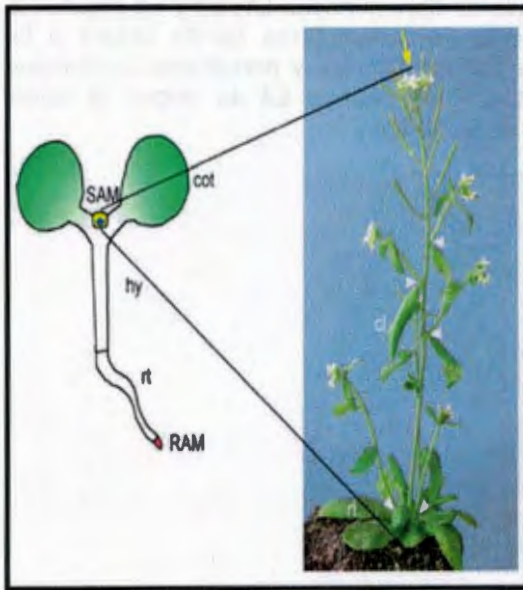


Figura 1.1. Planta de *Arabidopsis*. Observamos en amarillo el meristemo del ápice del tallo y en rojo el meristemo de la raíz. SAM: meristemo del ápice del tallo, Cot: cotiledón, hy: hipocotilo, rt: raíz y RAM: meristemo del ápice de la raíz (Bäurle *et al.*, 2003).

Los meristemos contienen una población de células indiferenciadas o pluripotenciales, las cuales al dividirse y diferenciarse originan órganos y tejidos, al mismo tiempo que reemplazan las células pluripotenciales perdidas por diferenciación.

1.1.2 ARQUITECTURA DEL MERISTEMO.

El meristemo del ápice del tallo (SAM) puede dividirse de dos diferentes formas. Primero, tres zonas distintas que se definen por la densidad y rango de división celular (figura 1.2 a):

- 1.- **Zona central (CZ):** contiene las células indiferenciadas y pluripotenciales y se caracteriza por una de división celular baja.
- 2.- **Zona periférica (PZ):** es el sitio de la producción de órganos primordios laterales y se caracteriza por una mayor división celular.
- 3.- **Zona de reborde (RZ):** se encuentran células diferenciadas que permiten el crecimiento del tallo (Clark., 1997).

Segundo, se divide en capas celulares denominadas L1, L2 y L3 (figura 1.2 b). En la L1 las células se dividen anticlinalmente dando origen a la epidermis, en la L2 las divisiones son anticlinales y periclinales creándose células subepidérmicas y gametos, finalmente la L3 da origen al tejido vascular y fundamental (Bowman *et al.*, 2000).

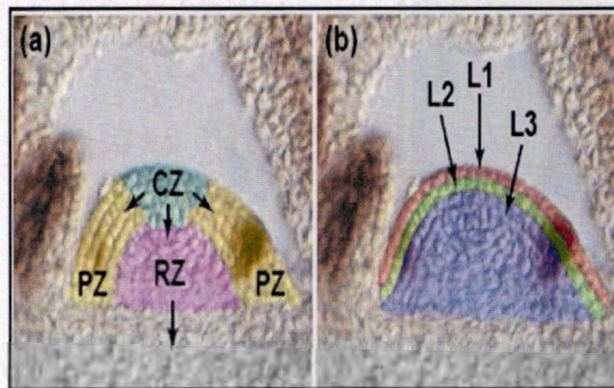


Figura 1.2. Histología el meristemo apical de tallo (SAM).

a) División en zonas del meristemo: zona central (CZ), zona periférica (PZ) y zona de reborde (RZ). b) Capas celulares en las que se divide el meristemo: L1, L2 y L3 (Bowman *et al.*, 2000).

El meristemo de la raíz (RAM) tiene una función y arquitectura comparable al del tallo, a diferencia de que las capas de tejido tienen una disposición

concéntrica (figura 1.3). De igual forma posee un grupo de células indiferenciadas y pluripotenciales localizadas en una zona denominada centro quiescente (QC). El meristemo de la raíz tiene la función de mantener constante su grupo de células pluripotenciales.

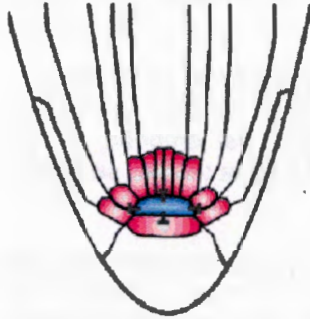


Figura 1.3. Esquema de una sección longitudinal de la raíz. En color rosado podemos observar la localización del meristemo de la raíz (RAM) y en color azul el lugar que ocupan las células madre pluripotenciales (Bäurle *et al.*, 2003).

1.1.3. ORIGEN Y MANTENIMIENTO DEL MERISTEMO.

Tanto el meristemo del tallo como el de la raíz se establecen durante la embriogénesis (Taylor, 1997). En plantas dicotiledóneas SAM se forma entre los dos primordios cotiledonares. SAM se deriva de una serie de células apicales del estadio globular y se hace evidente en el estadio torpedo (figura 1.4) (Takada *et al.*, 2002).

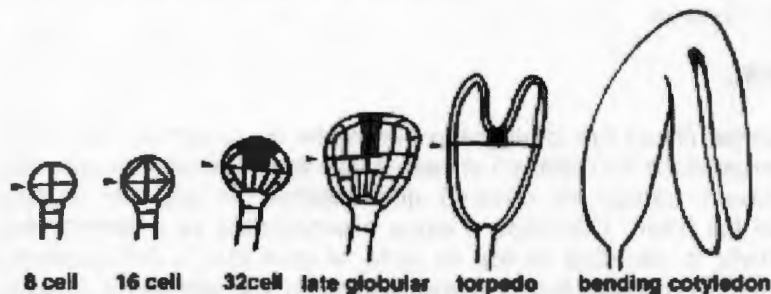


Figura 1. 4. Formación de SAM durante la embriogénesis en *Arabidopsis*. Las cabezas de flecha indican la línea de separación del hemisferio apical y basal. SAM deriva de las células del hemisferio apical en el estadio de 8

células del embrión. Las células que dan origen al meristemo se muestran en color negro (Takada *et al.*, 2002).

En monocotiledóneas SAM también se establece durante la embriogénesis y éste origina la mayoría de los órganos que conforman a la planta, ya que su sistema radicular está compuesto principalmente de raíces adventicias (Itho *et al.*, 2006).

El proceso de embriogénesis en monocotiledóneas difiere un poco del que encontramos en dicotiledóneas. Este se puede dividir en tres etapas: la primera corresponde al establecimiento de los ejes del embrión, en la segunda se dan las señales para posicionar a SAM y en la tercera se forma SAM (Itho *et al.*, 2006).

El meristemo cumple tres funciones primordiales: 1) mantener el grupo de células madre pluripotenciales localizadas en su zona central, 2) amplificación de las células pluripotenciales y 3) formación de órganos primordiales. Existen diversos genes con homeodominio, como los genes *Knox* y *Wox*, que son los responsables de regular la formación y función del meristemo (Takada *et al.*, 2002).

El mantenimiento del meristemo involucra una ruta de señalización en la que intervienen genes llamados *Clavata* (*Clv1*, *Clv2* y *Clv3*). Estos genes actúan en conjunto para limitar la expansión de las células indiferenciadas. El estudio acerca de estos genes mediante mutantes ha permitido identificar que *Clv1* y *Clv2* codifican para proteínas tipo cinasa. *Clv3* codifica para un péptido de 96 aminoácidos y los tres juntos forman un complejo activo (Carles *et al.*, 2003).

Otro factor importante en el mantenimiento del meristemo es el gen **Wuschel (Wus)**, el cual se encarga de mantener indiferenciadas las células madre del meristemo.

1.2 WUSCHEL

El gen *Wuschel* (*Wus*) fue identificado por medio de mutantes, las cuales presentaban defectos en SAM (en el caso de las mutantes estaba ausente). En este mismo trabajo se observó que además se perdían órganos centrales en las flores. Con base a estos experimentos se determinó que *WUS* promovía la identidad central de SAM, al igual que la del meristemo floral manteniendo de esta forma íntegra la función y la estructura de estos tejidos (Laux *et al.*, 1996).

Posteriormente, este gen fue aislado por medio de técnicas como Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y

Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). El sitio de inicio de ese gen se determinó por Amplificación rápida de los extremos de cADN (5' RACE). Este gen codifica para una proteína de 291 aminoácidos y posee dos dominios. Una región entre los residuos 33-98 que es similar a homeodominios y un dominio ácido entre los residuos 234-241. Mediante análisis computacionales se determinó que el dominio ácido era similar a dominios de transactivación presentes en reguladores transcripcionales (Mayer *et al*, 1998).

La proteína codificada por el gen *Wuschel* de *Arabidopsis* juega un papel importante en la especificidad de las células indiferenciadas en SAM. Esta proteína contiene un homeodominio atípico con residuos extra en las regiones de tipo lazo y vuelta. (Kamiya *et al*, 2003). También se expresa por debajo de las células madre pluripotenciales en la capa L3 (Jönsson *et al.*, 2005).

Estudios de localización subcelular de la proteína WUS utilizando ensayos de expresión transitoria, entre WUS y el gen reportero Glucoronidasa (GUS), revelaron que WUS se expresa dentro del núcleo de células de epidermis de cebolla. Esta localización de expresión nuclear de WUS es consistente con su función como regulador transcripcional (Varagona *et al*, 1992; Mayer *et al*, 1998).

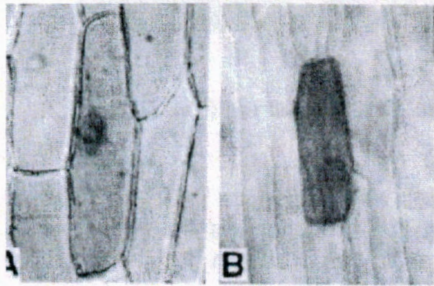


Figura 1.5. Localización nuclear de WUS.

a) Localización nuclear de la proteína WUS-GUS. b) control negativo: proteína GUS se distribuye a través de la célula (Mayer *et al.*, 1998).

Mediante estudios realizados en *Arabidopsis* se ha observado que WUS además de mantener indiferenciadas las células madre del meristemo cumple otras funciones. En *Arabidopsis* el desarrollo vegetativo se puede dividir en dos fases una juvenil y otra adulta, las cuales están asociadas con cambios morfológicos en las hojas que están dispuestas en roseta. Las hojas en la fase juvenil tienen forma globular, no poseen tricomas y poca

reticulación. Cuando éstas pasan a la fase adulta aparecen tricomas, incrementa la reticulación y la forma es lanceolada. En plantas mutantes del gen *Wuschel* no se observa la fase juvenil de las hojas, ya que desde el inicio poseen características de hojas adultas. Esto sugiere que *WUS* controla directa o indirectamente la morfología de las hojas durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* (Hamada *et al.*, 2000).

Zuo *et al.*, (2002) encontraron que *WUS* es capaz de promover la transición del estado vegetativo al embriogénico en explantes de raíces de plantas transformadas de *Arabidopsis*, las cuales sobreexpresaban este gen. Esto se observó sin la presencia de auxinas, que son las que disparan las señales para iniciar la embriogénesis, figura 1.6. En el mismo año Hardt *et al.*, reportan que *WUS* es expresado en tejido perteneciente al óvulo indicando que tiene una función durante el desarrollo del óvulo.

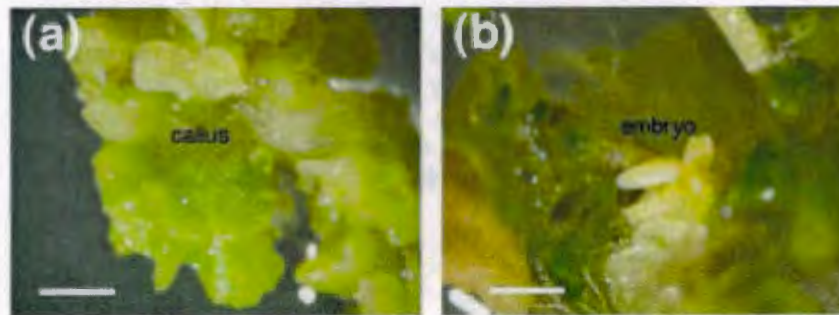


Figura 1.6. Sobre expresión de *WUS* en *Arabidopsis*.
a) Callo embriogénico. b) Embriones somáticos, Zuo *et al.*, (2002).

En el 2005 Xu *et al.*, reportaron que la sobreexpresión de *WUS* en plantas de *Arabidopsis* induce la aparición de meristemos florales ectópicos en la superficie del tallo, lo que posibilita una mejor comprensión de la función de *WUS* durante el desarrollo floral, figura 1.7.

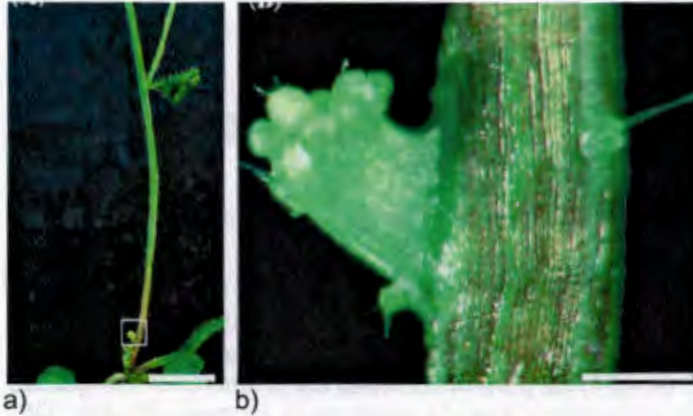


Figura 1.7. Meristemos ectópicos en plantas de *Arabidopsis*, que sobreexpresan WUS.

a) Meristemo ectópico de tallo. b) Acercamiento de área marcada en a) (Xu *et al.*, 2005).

Una de las preguntas principales acerca de la función de WUS es ¿cómo mantiene indiferenciadas las células del meristemo?. Leibfried *et al.*, (2005) nos abren el camino para poder entender y contestar esta pregunta. Ya se sabía que el destino de las células madre del meristemo era controlado por un mecanismo de retro alimentación negativa que incluye a genes denominados *Clavata* y al gen *Wuschel* (Schoof *et al.*, 2000), Leibfried *et al.*, (2005) mediante análisis de microarreglos en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban WUS, encuentran que este reprime genes reguladores de respuesta en *Arabidopsis* (ARR5, ARR6, ARR7 y ARR15) los cuales son inducidos por citocininas, indicando que estos podrían influenciar negativamente el tamaño del meristemo y que WUS es necesario para una apropiada función del meristemo. Con esto entra a la ruta de mantenimiento del meristemo, el control hormonal.

También se ha realizado un estudio acerca de la regulación transcripcional de *Wus* en *Arabidopsis*. Entre los resultados que se obtuvieron se muestra que el promotor del gen *Wus* contiene distintas regiones regulatorias que controlan su actividad tejido específica, así como sus niveles de expresión. Existe una región regulatoria de 57pb que es la requerida para regular la transcripción de *Wus* en sitios cercanos a las células pluripotenciales. Además, existen otras regiones necesarias para la expresión de WUS en el óvulo y en el meristemo floral, figura 1.8 (Bäurle *et al.*, 2005).

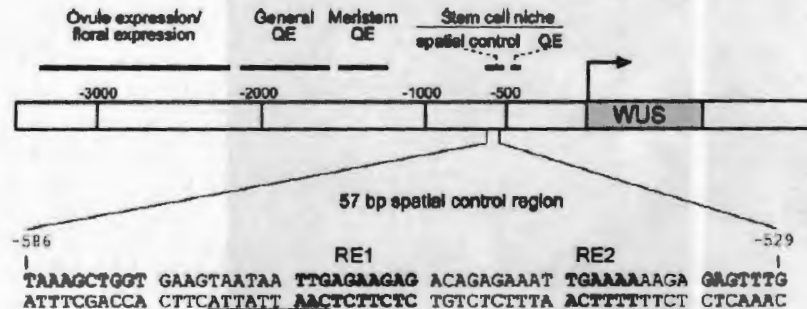


Figura 1.8. Arquitectura del promotor del gen *Wus* en *Arabidopsis*.

Una región de 57pb es esencial para la actividad del promotor en las células madre. RE1 y RE2, probables sitios de unión para factores HD-ZIP. QE, elementos cuantitativos requeridos para aumentar los niveles de expresión (Bäurle *et al.*, 2005).

1.3 GENES WOX

Durante la embriogénesis se establece la disposición apical-basal de lo que será el cuerpo de la planta, así como el destino que tendrán las células durante el desarrollo. En plantas el mecanismo fundamental de la embriogénesis es desconocido, pero se sabe que los genes denominados *Wox* (WUSCHEL RELATED HOMEOBOX) juegan un papel importante en este proceso.

Haecker *et al.*, (2004) reportaron la expresión de esta nueva familia de genes en eventos tempranos de la embriogénesis de *Arabidopsis*. Los miembros de esta familia *Wox* son 14. *WOX2* y *WOX8* son coexpresados en la célula huevo o cigoto y posteriormente se confinan a las células hijas apicales y basales respectivamente. *WOX9* es expresado al inicio de la célula basal. *WOX5* se expresa en la zona conocida como centro quiescente, donde se localizan las células madre del meristemo de la raíz. *WOX1* y *WOX3* son expresados en los flancos del dominio apical del embrión, donde surgen los primordios cotiledonares. No existen reportes acerca de la función o expresión de los otros miembros de la familia.

Los genes *Wox* se caracterizan por tener un homeodominio que posee un 87% de similitud al homeodominio del gen *Wus*, además de una caja consenso (TLPLFPMH) posterior al homeodominio que también se encuentra conservada en *WUS* figura 1.9.



Figura 1.9. Comparación de aminoácidos entre los miembros de la familia de WUS.

a) Alineamiento de secuencias de homeodominio. b) alineamiento de cajas consenso WUS localizadas después del homeodominio (Haecker *et al.*, 2004). * Aminoácidos idénticos. Consensus: secuencia conservada

Ortólogos de algunos de estos genes se han identificado en otras especies de plantas. El gen *Wus* fue reportado por primera vez en *Arabidopsis* y posteriormente en *Petunia hybrida* (Stuurman *et al.*, 2002), *Licopersicum esculentum* (Reinhardt *et al.*, 2003), *Antirrhinum majus* (Kieffer, *et al.* 2006) y más recientemente en *Zea mays* (Nardmann *et al.*, 2006). Además de los genes *Wox* de *Arabidopsis* están reportados el *Wox5* en *Oryza sativa* (Kamiya *et al.*, 2003) y el *Wox3* en *Zea mays* Nardmann *et al.*, 2004), este último se encuentra triplicado en esta planta. Estos resultados sugieren que esta familia de genes está ampliamente conservada.

1.4 TRANSCRIPCIÓN

La transcripción es el proceso mediante el cual la información almacenada en el ADN se transfiere al ARN y se hace disponible para la síntesis de proteínas. La información almacenada en el ADN debe expresarse antes de poder ser utilizada por la célula. El primer paso de la expresión génica es la transcripción, proceso en el cual se sintetiza una molécula de ARN que es complementaria a una de las cadenas del ADN (Lewin, 1997).

1.4.1 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

La mayor parte de las regiones regulatorias presentes en los genes de las plantas se encuentra localizada en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción y generalmente se le llama región promotora o promotor del gen. El promotor contiene varios elementos de secuencias que funcionan en el reclutamiento de los factores proteicos que facilitan la transcripción de la región codificante del gen. Los elementos regulatorios localizados en la región cercana al sitio de iniciación se conocen como elementos cis. El elemento cis más básico es la caja TATA, que en la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra alrededor de la posición -30. La caja TATA es reconocida por el factor de transcripción TBP (Tata Binding Protein), el cual es responsable del reclutamiento de todos los factores de transcripción y del posicionamiento de la RNAPol II.

Los genes inducibles además tienen además al menos otros dos elementos cis que participan en las etapas finales de las señales de la transcripción desencadenadas por el medio ambiente. Los genes constitutivos (de mantenimiento), pueden tener menos diversidad en sus elementos cis y pueden no tener una caja TATA reconocible (Ferl and Paul, 2000).

Los promotores poseen un elemento CAAT que se encuentra a -80 pero puede funcionar a distancias que pueden variar considerablemente desde el punto de inicio y puede actuar en una u otra orientación. La susceptibilidad a las mutaciones sugiere que la caja CAAT potencia la actividad del promotor. Los elementos promotores pueden ser similares para los genes con funciones relacionadas. Una característica de todos estos promotores es el requerimiento de al menos un elemento cis adicional a la caja G para una adecuada activación transcripcional (Mckee *et al.*, 2003).

Los factores generales de transcripción incluyen a la RNA pol II y alrededor de 95 polipéptidos. Son susceptibles de ser regulados por proteínas activadoras y represoras que se unen al ADN. Los sitios de unión de proteínas al ADN constan de secuencias conservadas en las distintas especies, mientras que el extremo N-terminal se expone para la interacción con otras proteínas. El conjunto de factores de transcripción, cofactores, represores y correpresores se encargan de regular la expresión genética (Lewin, 2008).

1.4.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción son proteínas que reconocen elementos cis específicos. En plantas la mayoría de estos factores tienen cuatro dominios, un dominio de unión al ADN, un dominio de oligomerización, un dominio

regulatorio y uno de localización nuclear que se unen a secuencias específicas de ADN y que modulan la expresión de los genes (Mcknigth *et al*, 1992).

Algunas de las propiedades de los factores de transcripción son:

- Están ampliamente distribuidos en los diferentes tipos celulares y no son específicos de un gen particular.
- Sus actividades pueden ser inducidas mediante estímulos externos y pueden relacionarse con el estado de maduración de la célula.
- Tienen efectos positivos y negativos, cuya interacción determina el nivel neto de la transcripción genética.
- Algunos de ellos tienen efectos que son específicos del tipo celular o que se regulan en función del estadio de desarrollo. Esto puede deberse a que los lugares de unión sobre promotores o potenciadores son únicos y están regulados, o a inhibidores endógenos cuya actividad está alterada de forma específica por la maduración y la estimulación celular (Mcknigth *et al*, 1992).

1.5 PROTEÍNAS CON HOMEODOMINIO

Proteínas con homeodominio fueron descritas originalmente como proteínas que contienen motivos conformados por 60 aminoácidos altamente conservados, codificados por pequeños fragmentos de ADN (homeobox) comúnmente encontrados en genes que controlan el desarrollo en *Drosophila* (McGinnis *et al*, 1984; Scout and Weiner, 1984).

El homeodominio consiste en una estructura de hélice-vuelta-hélice-giro-hélice, la cual es considerada una región de unión al ADN debido a que motivos similares existen en proteínas reguladoras de la transcripción en procariotes (Pabo and Sauer, 1984).

En plantas este tipo de proteínas se encuentra ampliamente distribuido y se ha observado que intervienen en diversos procesos de embriogénesis y desarrollo.

1.6 EVOLUCIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA

El desarrollo de métodos de secuenciación, ha permitido tener disponible las secuencias del genoma de una variedad de organismos, y con esto la aparición de bases de datos como el GeneBank del centro nacional de

información biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), entre otras el número de bases de datos se ha ido incrementando, así como los métodos de búsqueda incluidos en éstas (Mount, 2001).

Mediante métodos de alineamiento múltiple como el CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), se han podido comparar diversas secuencias de genes y proteínas revelando las similitudes y diferencias que existen entre los organismos.

Todo esto ha permitido observar la evolución desde un punto de vista molecular, con la aparición de la sistemática en la que se incluyen secuencias de genes y proteínas para determinar los mecanismos de evolución de genes y proteínas, intuir conservación de funciones entre otras múltiples aplicaciones; así como, determinar cambios, duplicaciones y mutaciones ocurridos durante la evolución (Nei and Koehn, 1983).

Los análisis filogenéticos de ADN y proteínas son una importante herramienta para el estudio de la evolución de los organismos, uno puede estudiar relaciones evolutivas virtualmente en todos los niveles por el uso de diferentes fragmentos de ADN. La filogenética también es importante para esclarecer la evolución de familias de genes, así como entender los procesos de adaptación molecular. La reconstrucción de árboles filogenéticos se realiza mediante métodos estadísticos algunos desarrollados con el propósito de poder usar datos moleculares como caracteres y en años recientes se han desarrollado nuevos métodos (Nei and Kumar, 2000).

1.7 BIBLIOGRAFÍA

Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., and Wheeler D. L. (2006). Gene Bank. *Nucleic Acids Research*, 34(D), 16- 20.

Bäurle I. and Laux T. (2003). Apical meristems: the plant's fountain of youth. *BioEssays*, 25, 961-970.

Bäurle I. and Laux T. (2005). Regulation of WUSCHEL Transcription in the Stem Cell Niche of the *Arabidopsis* Shoot Meristem, *The Plant Cell*, 17, 2271-2280.

Bowman J. L. and Eshed Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science*, 5(3), 110-115.

Cano S. J. y Castaño-de la Serna E. "Meristemas: fuente inagotable de vida vegetal". (2007). *Ciencia y Desarrollo*. <http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/207/Articulos/Meristemas/meristemas00.htm> [Consulta: 1 Mayo 2007]

Cano S. J. y Castaño-de la Serna E. "Meristemas: fuente inagotable de vida vegetal". (2007). *Ciencia y Desarrollo*, 33 (207), 6-9, ISSN: 0008.

Carles C. C. and Fletcher J.C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of dynamic balance. *Trends in Plant Science*, 8(8), 394-401.

Clark S. E. (1997). Organ Formation at the Vegetative Shoot Meristem. *The Plant Cell*, 9, 1067-1076.

Ferl R. and A. L. Paul (2000) Genome organization and expression. En: Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. editores. *Biochemistry and molecular biology of plants*. U.S.A. American Society of Plant Physiologists 338-350p.

Fletcher J. C. (2002). Shoot and Floral Meristem Maintenance in *Arabidopsis*. *Annual Reviews of Plant Biology*, 53, 45-66.

Hamada S., Onouchi H., Tanaka H., Kudo M., Liu Y. G., Shibata D., Machida C. and Machida Y. (2000). Mutations in WUSCHEL gene of *Arabidopsis thaliana* result in the development of shorts without juvenile leaves. *The plant Journal*, 24(1), 91-101.

Hardt R. G., Lenhard M. and Laux T. (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes and Development*, 16, 1129-1138.

Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. and Laux T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 657-668.

Itho J. I., Sato Y., Nagato Y. and Matsuoka. (2006). Formation, maintenance and function of the shoot apical meristem in rice. *Plant Molecular Biology*, 60, 827-842.

Jönsson H., Heisler M., Reddy V., Agrawal V., Gor V., Shapiro B. E., Mjolsness E. and Meyerowitz E. M. (2005). Modeling the organization of the WUSCHEL expression domain in the shoot apical meristem. *Bioinformatics*, 1(1), i232-i240.

Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y. and Matsuoka M. (2003). Isolation and characterization of rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal*, 35, 429-441.

Kieffer M., Stern Y., Cook H., Clerici E, Maulbetsch C, Laux T, and Davies B. (2006). Analysis of the transcription factor *wuschel* and its functional homologue in *antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *The Plant Cell*, 18, 560–573,

Laux T., Mayer K. F., Jurgens G. and Berger J. (1996). The *Wuschel* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122, 87-96.

Lewin B. (1997). GENES VI. Ed. Oxford University Press and Cell Press. 153p.

Lewin B. (2008). GENES IX. Jones and Barlett publishers. Pp. 609-635.

Leibfried A., To J. P. C., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J. J. and Lohmann J.U. (2005). *Wuschel* controls meristem Function by direct regulation of cytokinin inducible response regulators. *Nature*, 438, 1172-1175.

Mayer K. F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G. and Laux T. (1998). Role of Wuschel in regulating stem cell fate in *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95, 805-815.

Matsumoto N. and Okada K. (2001). A homeobox gene, *Pressed Flower*, regulates lateral axis-dependent development of *Arabidopsis* flowers. *Genes and Development*, 15, 3355-3364.

McGinnis W., Ichikawa H., Saito A., Tada Y., Fujimara T. and Kano-Murakami Y. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes, *Nature*, 308, 428-433.

Mckee T. and Mackee J. R. (2003). *Bioquímica, Base Molecular de la Vida*. Tercera edición. MacGraw Hill Interamericana. pp 636-648.

Mcknigh S. L, Yamamoto K.R. (1992). *Transcriptional Regulation 2*. Ed. Cold spring harbor laboratory. pp.1007-1010.

Mount D. W. (2001). *Bioinformatics sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 2-11.

Nardmann J., Ji J., Werr W. and Scanlon M. J. (2004). The maize duplicate genes *narrow sheath1* and *narrow sheath2* encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development*, 131, 2827-2839.

Nardmann J. and Werr W. (2006). The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of *WUS* orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 2492-2504.

Nei M. and Koehn R. K. (1983). *Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer Associates Inc. Plublishers. Sunderland, Massachusetts. pp. 14-30.

Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.

Pabo, C. O. And Sauer, R. T. (1984) Protein-DNA recognition. *Annual Review Biochemistry*, 53, 293-321.

Park S. O., Zheng Z., Oppenheimer D. G. and Hauser B. A. The *PRETTY FEW SEED2* gene encodes an *Arabidopsis* homeodomain protein that regulates ovule development. *Development*, 132, 841-849.

Quandt K, Frech K, Herrmann G, Werner T (1995). A consensus match scoring system that is correlated with biological functionality. In *Bioinformatics: From Nucleic Acids and Proteins to Cell Metabolism* (Eds. D. Schomburg, U. Lessel), GBF Monographs Volume 18, VCH Publishers, Inc, New York, NY. pp47-57.

Scout M. P. and Weiner A. J. (1984) Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 4115-4119.

Reinhardt D., Frenz M., Mandel T. and Kuhlemeier C. (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development*, 130, 4073-4083.

Schoff H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K. F. Jürgens G. and Lauz T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 100, 635-644.

Steeves, T.A. and Sussex, I.M. (1989). *Patterns in plant development*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University press.

Stuurman J., Jaggi F. and Kuhlemeier C. (2002). Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes and Development*, 16, 2213-2218.

Takada S. and Tasaka M. (2002). Embryonic shoot apical meristem formation in higher plants. *Journal Plant Research*, 115, 411-417.

Taylor C. B. (1997). *Plant Vegetative Development: From Seed and Embryo to Shoot and Root*. *The Plant Cell*, 9, 981-988.

Varagona, M. J., Schmidt R. J., and Raikhel N. V. (1992). Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell*, 4, 561-568.

Zuo J., Niu Q.W., Frugis G. and Chua N.H. (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The plant Journal*, 30(3), 349-359.

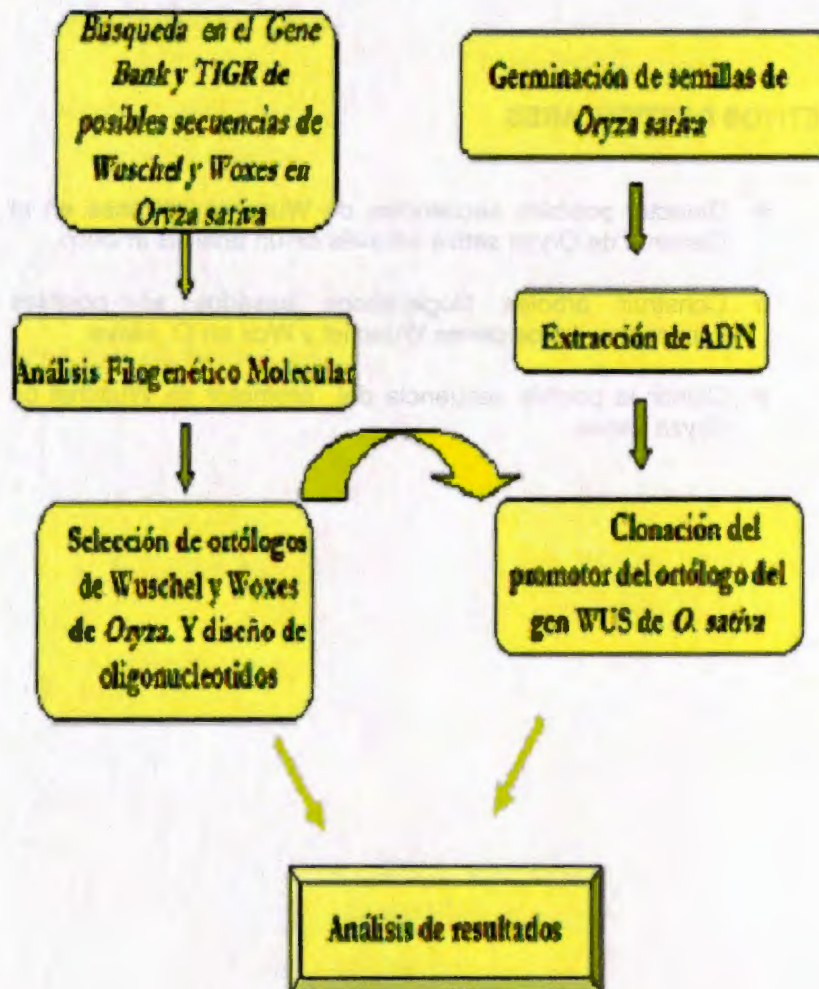
1.8 OBJETIVO GENERAL

- Definir La familia de los genes WOX en *Oryza sativa*, así como la secuencia parcial del posible promotor del gen OsWuschel.

1.9 OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar posibles secuencias de Wuschel y Woxes en el Genoma de *Oryza sativa* a través de un análisis *In silico*.
- Construir árboles filogenéticos basados en posibles secuencias de los genes Wuschel y Wox en *O. sativa*.
- Clonar la posible secuencia del promotor de Wuschel de *Oryza sativa*.

1.10 DISEÑO EXPERIMENTAL



CAPITULO II

Artículo de Divulgación Sobre Meristemos.

2.1 MERISTEMOS: FUENTE INAGOTABLE DE VIDA VEGETAL

Nota: Este capítulo fue publicado en la revista Ciencia y Desarrollo de CONACYT, en su edición de Mayo 2007, vol. 33, no. 207, p. 6-9

JULIA CANO SOSA Y ENRIQUE CASTAÑO DE LA SERNA

Los meristemos son estructuras diminutas localizadas en las puntas de los tallos, en la raíz de una planta y, en algunos casos, en toda ella, los cuales poseen células madre o pluripotenciales, gracias a las cuales los meristemos resultan ser extraordinarias fábricas de órganos y tejidos, a lo largo de toda la vida de la planta. Casi una historia de ciencia ficción.

El estudio sobre los meristemos permite ampliar el conocimiento acerca del funcionamiento de las plantas; así mismo, nos permite obtener de manera controlada plantas enteras o partes de ellas, dependiendo del medio en que se cultiven. Esto se debe a que sus células tienen la característica de poder dar lugar a cualquier tejido vegetal, lo que permite conservar y reproducir plantas que podrían extinguirse, así como producir aquellas carentes de infecciones virales útiles para la conservación de *bancos de germoplasma*.¹

2.1.1 ¿Qué son los meristemos?

En muchas ocasiones observamos la pérdida de hojas, flores, frutos o incluso ramas de un árbol; sin embargo, esto no significa su muerte, sino por el contrario, la planta genera nuevas estructuras para reemplazar las anteriores. Esta característica es una de las principales diferencias entre la mayoría de los animales y las plantas: su capacidad de regeneración, ya que poseen unas zonas especializadas llamadas meristemos, localizados en los extremos de los tallos, raíces y ocasionalmente a lo largo de toda la planta (figura 1a).

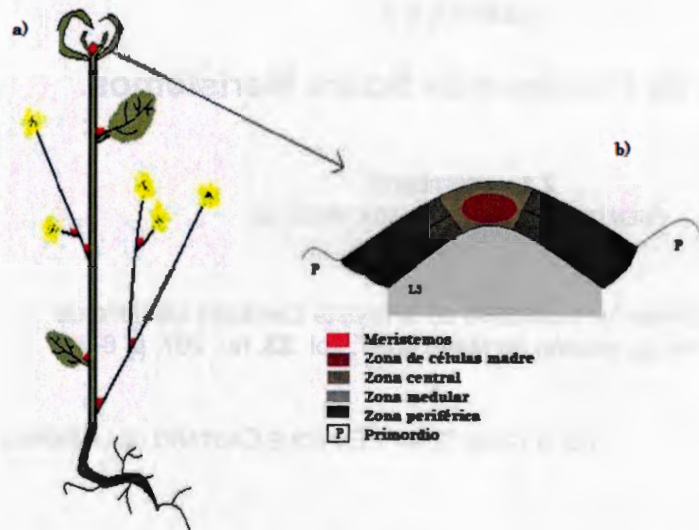


Figura 2.1. La planta y sus meristemos.

a) Localización de los meristemos en la planta. b) Arquitectura del meristemo del ápice del tallo.

Las células madre tienen la capacidad de generar cualquier tipo de tejido de la planta (hojas, flores, etcétera), de multiplicarse continua o periódicamente y de modificarse de diversas maneras, dependiendo de las necesidades de la planta, por ejemplo, formar tejidos adultos como lo es la corteza de los árboles, u órganos como nuevas hojas o raíces.

2.1.2 Arquitectura

La forma de un meristemo es parecida a la cima de una montaña –desde luego, vista a través de un microscopio– ya que a simple vista no es perceptible, pues se trata de una estructura muy pequeña que, comúnmente, se encuentra recubierta por hojas jóvenes y organizada en capas celulares, así como en zonas de células.

Las capas participan coordinadamente en la formación de órganos y en la zona central se localizan las células madre del meristemo; en los extremos de éste, se forman estructuras conocidas como primordios (tal como se observa en la figura 1b), donde se localizan las células que darán origen a las hojas de una planta.

Cabe mencionar que la estructura de los meristemos del ápice² del tallo, varía según el tipo de planta; por ejemplo, en la *arabidopsis* (una planta pequeña utilizada como modelo de estudio en el campo de la investigación científica) crece a la manera de una espiral cuando desarrolla los

1.-Son una colección de material vegetal vivo que tiene como objetivo recolectar y conservar plantas para el futuro de la sociedad. 2.-Punta, extremo o parte terminal del tallo o raíz.

primordios, mientras que en plantas como el maíz y el arroz, el meristemo no tiene una forma específica.

Los meristemos de la raíz, por su parte, dan lugar a las estructuras subterráneas de la planta y también se divide en capas celulares (figura 2.2).

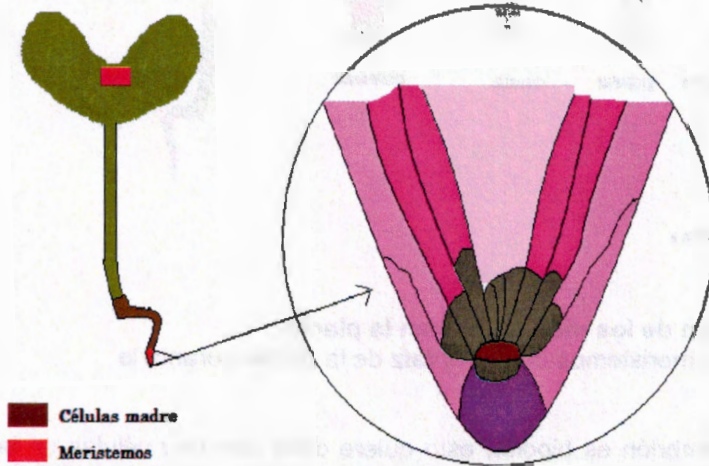


Figura 2.2. Meristemo de la raíz.

Arquitectura del meristemo de la raíz de una planta.

2.1.3 Formación

Los meristemos se forman durante la *embriogénesis*, es decir, después de la germinación de la semilla de una planta.

En el desarrollo del embrión de la planta se reconocen varios estadios denominados: globular, corazón, torpedo o de transición y el cotiledonar, después de este último se obtiene lo que se conoce como plántula o planta joven (figura 2.3).

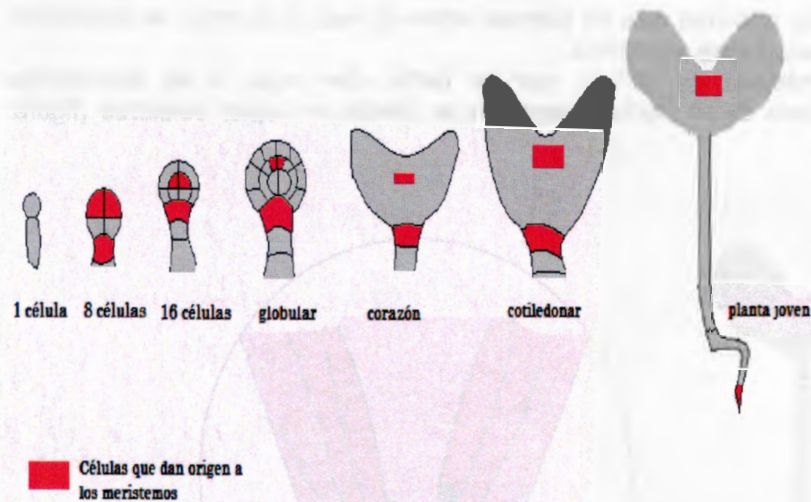


Figura 2.3. Origen de los meristemos en la planta.

Formación de los meristemos de tallo y raíz de la planta durante la embriogénesis.

Se dice que el embrión es bipolar, esto quiere decir que hay células en la parte superior del embrión que darán origen al meristemo del ápice del tallo y células de la parte inferior que al dividirse producirán al meristemo de la raíz (ver cuadro anexo).

El meristemo del tallo también puede originar flores por medio de la diferenciación. Para que esto ocurra, el meristemo del tallo recibe señales de genes como los llamados *Agamous* y *Leafy* que lo convierten en uno capaz de generar flores. El meristemo que genera flores, se conoce como meristemo floral.

El meristemo de la raíz tiene las mismas funciones, sólo que éste produce la formación de ésta última. También genera lo que se conoce como *raíces secundarias* que son más delgadas y finas, parecidas a cabellos que surgen de la raíz principal.

2.1.4 Algo más

Durante el desarrollo de la planta se pueden formar otros meristemos denominados *axilares*, los cuales se ubican a lo largo de toda la planta y pueden permanecer *durmientes* o en reposo mientras no son necesarios.

Lo sorprendente es que si existen agresiones al meristemo del ápice del tallo, como frío, desecación, depredación o si el ápice envejece y se dañan las estructuras, los meristemos que han permanecido en reposo pueden activarse y cumplir las funciones del meristemo dañado, es decir, lo rempazan.

Es poco lo que se conoce hasta el momento acerca de los genes implicados en este proceso y, en la actualidad, existe un gran interés en dilucidar todos sus pasos.

Como se puede observar, el tema de los meristemas es muy interesante y nos ayuda a comprender un poco más acerca de la biología de la planta, así como a interesarnos más sobre estos organismos tan impresionantes.

2.1.5 ANEXO

2.1.5.1 FUNCIONES PRINCIPALES DE LOS MERISTEMOS

- > Mantenimiento de las células madre: cuidar y mantener un número constante de éstas.
- > Renovación o amplificación de células madre. Cuando éstas pasan por un proceso de diferenciación¹ pierden su pluripotencialidad² y su número disminuye, es cuando las reemplazan otras nuevas.
- > Formación de órganos primordio (órgano que empieza a formarse). Las células madre que salen de la zona central, se van ubicando en la zona periférica, dando lugar a los primordios que generarán los órganos de la planta.
 1. La célula experimenta cambios que le permiten especializarse, partiendo de una célula no especializada.
 2. Capacidad para convertirse en células distintas, para formar diferentes tejidos (hoja, tallo, raíz etc.).

2.1.6 ENTRETEXTOS:

Meristemo proviene del griego *merizein* (dividir) y hace referencia a una zona o tejido embrionario, localizado en las puntas de los tallos, raíces y ocasionalmente a lo largo de toda la planta

Los meristemas son capaces de regenerar cualquier tejido vegetal; ellos son los responsables de que una planta *reverdezca* o vuelva a dar flores

Si los humanos tuviésemos la cualidad de regeneración de las plantas, al perder algún miembro de nuestro cuerpo no habría mayor problema, porque nos crecería un reemplazo en poco tiempo.

2.1.7 BIBLIOGRAFÍA

Bäurle, I. and T. Laux (2003). Apical meristems: the plant's fountain of youth. *BioEssays*, 25, 961-970.

Bennett, T. and O. Leyser (2006). Something on the side: axillary meristems and plant development. *Plant Molecular Biology*, 60, 843-854.

Jürgens, G. (2001). Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *The EMBO Journal*, 20, 3009-3616.

Kerstetter, R. A. and S. Hake (1997). Shoot meristem Formation in vegetative development. *The Plant Cell*, 9, 1001-1010.

Lenhard, M. and T. Laux (1999). Shoot meristem formation and maintenance. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 44-50.

CAPITULO III

Nota: Este capítulo fue publicadó como parte del libro titulado Plant Biotechnology de la editorial I.K. International,

3. Phylogenetic Analysis of WUSCHEL and WOX Members in *Oryza sativa*

Julia Cano Sosa ¹, Angela Ku Gonzalez, Luis Carlos Rodríguez-Zapata ², Enrique Castaño ^{3*}

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C., Calle 30 No. 151 Int. Canacintra, García Gineres. C. P. 97070 Mérida, Yucatán, México.

2. Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo C. P. 97200. Mérida, Yucatán, México.

3. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo C. P. 97200. Mérida, Yucatán, México.

Email address: enriquec@cicy.mx

3.1 SUMMARY

Morphogenesis and development are key processes for multi-cellular organisms; regulation of this process requires nuclear accessibility of several genes and specific transcription factors that modulate this process. In *Arabidopsis* homeotic genes have been found as key controllers which involved the transcription factor WUSCHEL and fourteen other transcription factors that have conserved regions with WUSCHEL know as WUSCHEL HOMEBOX family of genes. These factors are involved in the control of meristem cells as well as the first steps of cell differentiation. Here we carried out a phylogenetic study to define the possible candidates for WUSCHEL and its homeobox family members in *Oryza sativa*. WUSCHEL shows a clear divergence between eudico y monocot plants while some ambers of the family remain conserved.

3.2 INTRODUCTION

Biological processes are governed through responses upon a given set of signals. These signals are generally regulated at the level of transcription. Transcriptional regulation of gene expression is required for differentiation and development at several levels. (Novina and Roy 1996). Some of the most important family of transcription factors involved in embryogenesis and development are the encoded by the homeotic genes and their products know as homeodomain proteins. Originally they were detected as key controllers for development in *Drosophila* (McGinnis W. *et al.*, 1984). The term since then has been applied to transcription factors that meet the following criteria: four highly conserved residues and a conserved secondary structure consisting of a helix–loop– helix–turn–helix motif (Scott P. M. *et al.*, 1989). The homeobox has since been found to be present in a large family of eukaryotic regulatory proteins (Scott P. M. *et al.*, 1989). The homeobox family now includes genes from organisms of both the plant and animal kingdoms. Although it is now clear that most members of this gene family have developmental roles that are unrelated to homeosis, the homeobox remains a hallmark of homeotic genes, and a number of these genes appear to have retained both their precisely ordered tandem arrangement in the genome, as well as their developmental roles in axial patterning across vast evolutionary time. The impressive conservation of nucleotide sequences of the homeoboxes has fostered the efficient and rapid isolation of homeobox-containing genes from diverse sources. Even more impressive is the conservation of the protein segment encoded by the homeobox, the homeodomain (Kornberg T. B. 1993). In plants, WUSCHEL (WUS) and its family of homeotic genes were described previously in Arabidopsis. The WUS gene encodes a transcription factor with a homeobox DNA_binding domain subtype that comprises 66 amino acid residues (Mayer *et al.*, 1998), compared to 60 of a typical homeodomain,

is required for shoot apical meristem function, maintains undifferentiated the stem cells. Wuschel Homeobox genes have been identified based on homology to the Wus homeodomain and contains a homeodomain of 65 amino acids.

Wox genes are plant-specific. The *WOX (WUSCHEL HOMEBOX)* gene family are composed of 15 genes that encode proteins with a unique and specific plant homeodomain subtype in addition a so called WUS-box motif of yet unknown function. Expression studies and functional analysis suggest that these genes play an important role in determining cells fate during development (Haecker *et al.*, 2004). Two major factors interfere with large-scale evolutionary studies of related genes and proteins, particularly of those controlling developmental processes are nucleotide and amino acid that

contain a great amount of informational. (Kornberg,1993). Phylogenetic analysis from the representative eukaryotic sequences suggests that there are two major groups of homeodomain proteins, each containing sequences from angiosperms, metazoa, and fungi. Angiosperm and metazoan sequences are located in one group. These results support the hypothesis that there was at least one gene duplication of homeobox sequence may have happened before the origin of angiosperms, fungi, and metazoa. This duplication, in turn, suggests that these proteins have diverse functions early in the evolution of eukaryotes (Bharathan *et al.*, 1997).

Understanding the evolutionary relationships of these transcription factors is of tremendous interest, because they play a vital role in a wide range of biological phenomena, including mating-type recognition, pathogenesis response, and early morphological development. Researches during embryonic development have led to the identification of numerous genes whose protein products function to control gene expression during embryogenesis. These transcriptional regulatory proteins play a fundamental role in directing embryogenesis by establishing and maintaining the appropriate patterns of spatial and temporal gene expression. The most information generated in past 20 years about this, exist in animals. In plants we think this interaction is similar but no yet well understand. Homeotic genes are master control genes that specify the body plan and regulate development of higher organism.(Gehring W., J. *et al.* 1994; Banerjee B. S. *et al.*, 2001). The regulatory function of a homeodomain protein derives from the specificity of its interactions with DNA and presumably with components of the basic transcriptional machinery such as RNA polymerase or accessory transcription factors (Laughon, A. *et al.*, 1991). Understanding the evolutionary relationships of these transcription factors is of tremendous interest, because they play a vital role in a wide range of biological process. These transcriptional regulatory proteins play a fundamental role in directing embryogenesis by establishing and maintaining the appropriate patterns of spatial and temporal gene expression and switch on cascades of other genes. Embryo requires an elaborate program of spatial and temporal signals. These signals direct the activity of transcriptional regulatory proteins which, in turn, guide the expression of target genes that specify cellular phenotypes. Many transcriptional regulatory proteins that function during development are encoded by members of a gene family that contain a conserved sequence motif termed the homeobox (Levine M. *et al.*, 1988). The homeobox encodes a DNA binding domain (the homeodomain) that was first identified as a conserved feature of *Drosophila* homeotic genes (McGinnis W. *et al.*, 1984) and subsequently shown to be present in numerous genes whose products regulate transcription during development (Scott P. M. *et al.*, 1989; Akam M. *et al.*, 1989; Gehring W. J. *et al.*1987). The notion that the present homeotic genes might have arisen by duplication and divergence gained immediate acceptance when their isolation and

characterization revealed, in each, a conserved homeobox region (McGinnis W. *et al.*, 1984; Scott, M. P. and Weiner, A. J., 1984). Here we are using evolutionary conservation as a tool to help identify sequences in *Oryza sativa*, related with WUS and the members of the WOX family. This phylogenetic analysis does help to screen among several thousand candidates to provide with a hand full of options that can then be tested for functionality. Our results provide a good selection from missing candidates from the WOX family as well as never before reported complete sequences for these genes.

3.3 METHODS

3.3.1 Sequence data

All protein, nucleotides and homeodomains sequences of *Oryza sativa* used in this study were obtained from two Gene databases, the **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) (Benson *et al.*, 2006), and the **TIGR** (The Institute for Genomic Research) created by the instituted J. Craig Venter (Yuang Q. *et al.*, 2003). Were compared to WUS and WOX related sequences, the number of similar sequences found are shown in Table 1.

TABLE 1
Tables for numbers sequences obtained in GeneBank and TIGR for phylogenetic analysis

A **NUMBERS OF SEQUENCES TO AMINOACIDS**

	WUS	WOX 1	WOX 2	WOX 3	WOX 4	WOX 5	WOX 6	WOX 7	WOX 8	WOX 9	WOX 10	WOX 11	WOX 12	WOX 13	WOX 14
GEN BANK (Pulsed)	32	34	38	24	37	38	35	31	21	41	305	21	30	81	30
TIGR	27	25	15	14	14	14	15	14	22	11	15	8	9	20	16
TOTAL	49	79	53	38	71	72	54	68	33	52	120	29	39	91	109

B **NUMBERS OF SEQUENCES TO NUCLEOTIDES**

	WUS	WOX 1	WOX 2	WOX 3	WOX 4	WOX 5	WOX 6	WOX 7	WOX 8	WOX 9	WOX 10	WOX 11	WOX 12	WOX 13	WOX 14
GEN BANK (Pulsed)	40	39	60	64	30	95	27	31	16	67	26	27	35	49	22
TIGR	16	3	11	22	27	1	1	2	9	13	1	0	9	14	1
TOTAL	56	42	71	86	57	96	28	33	25	80	27	27	44	63	23

C **NUMBERS OF SEQUENCES TO HOMEODOMAINS**

	WUS	WOX 1	WOX 2	WOX 3	WOX 4	WOX 5	WOX 6	WOX 7	WOX 8	WOX 9	WOX 10	WOX 11	WOX 12	WOX 13	WOX 14
GEN BANK (Pulsed)	15	44	62	44	67	33	66	37	16	39	90	22	21	91	90
TIGR	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TOTAL	35	68	82	64	87	73	86	77	36	79	110	42	41	111	110

In this study we obtained more than three thousand sequences related with WUS and WOX. In these tables we show numbers of different sequences obtained in two gene banks for the phylogenetic test. A) Numbers of sequences obtained with Blast in Gene Bank and TIGR used how antecedent complete sequence of WUS and WOX aminoacids. B) Numbers of sequences obtained with Blast in Gene Bank and TIGR used how antecedent complete sequence of WUS and WOX nucleotides. C) Numbers of sequences obtained with Blast in Gene Bank and TIGR used how antecedent sequence of WUS and WOX homeodomain. For Gene Bank sequences we carried out a typical BLAST or PBLAST (Altschul *et al.*, 1997) to obtained related sequences with WUS and WOX from *Arabidopsis* (Accession CAA09986 and AJ012310). Sequences that are part of chromosomes were translated from nucleotides to proteins with the program DNA Strider 1.2.

3.3.3 Multiple sequence alignments

To summarize all available sequence information, full-length protein, nucleotides and homeodomains sequences were aligned independently. Multiple sequence alignments of WUS, WOX and sequences related sequences from *Oryza sativa*, were carried out with CLUSTAL W 1.82 from the European Bioinformatics Institute (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990). After the alignments were obtained we analyzed each sequences manually and selected the sequences more likely related to the WUS family. This was necessary also to eliminate repeated sequenced from both databases and redundant sequences of the same gene publish by different authors.

3.3.4 Phylogenetic Analyses

The analyzed sequences were edited with the program editsequence and the alignments of the sequences were created using the multiple-alignment feature of ClustalW in the program MegAlign both from DNASTAR 5.08/5.03. The alignments were save in PAUP format. Trees were built independently from all alignments by using the PAUP program with the software Winclada. In the construction of rooted trees we used a sequence of HOS66 (accession number BAA77823) a member of Knox family that contain a homeodomain that is different in function and complete sequence with WUS and WOX (Ito Y. *et al.*, 1999; Ito Y. *et al.*, 2002). The refined tree alignments were also used for inference of phylogeny. Estimates from the evolutionary relationships of the sequences were determined using maximum parsimony with the Ratchet method. Phylogenies based on rooted parsimony were generated using programs contained in the program Winclada (Nixon, 1999). This program was used to generate 1000 jackknife replications as a test of inferred phylogeny (non parametric statistic). The series of trees produced was analyzed by the Consensus method to construct a strict consensus tree from the parsimony replicates. Alignments generated from full-length of amino acids, nucleotides and homeodomains resulted in similar or identical phylogenetic trees.

3.4 RESULTS

3.4.1 Sequence Alignments

Genomic data of *Oryza sativa* was collected from GeneBank and TIGR database by comparing specific domains of WUS and WOX genes. The initial results yield more than three thousand sequences related with WUS family. These sequences were aligned independently, manual selection of

dissimilar sequences to each homodomain, nucleotide and amino acid sequences was carried out. The results for WUS alignment yield 49 different amino acids sequences, 56 different nucleotides sequences and 35 sequences similar to its homeodomain (table 2).

Table 2

Accession numbers sequences selected of family WUS orthologos in rice. Accession numbers was obtained of GeneBank and TIGR, correspond to aminoacid sequences reported and included the correspond chromosome localization in genome of *Oryza sativa* L.

WOX Ortholog	Accession Number	Chromosome
WUS	XP_474234	4
WOX1	NP915983	1
WOX2	BAB93218	1
WOX3	BAB48302	4
WOX4	NP9238947	4
WOX5,6,7	NP915549	1
WOX8	AAT77402	5
WOX9A	NP1110182	5
WOX9C	AAT77402	
WOX10	BAD73349	1
WOX11 y 12	XP480923 y NP891692	8
WOX13 y 14	BAF06545	1

The major similarity was found by using the homeodomain sequence for comparison. The alignments also included the HOS66 (BAA77823) *Oryza* sequence as a phylogentic root of trees. HOS66 is a Knox sequence related with the WUS family but is sufficiently divergent to provide a good differentiation among closely related sequences. Table 1 show the number of amino acids, nucleotides and homeodomain sequences used in every case for WOX1 to WOX14. Accessions numbers are not show but can be provided upon request.

3.4.2 Conserved regions and typical motifs in the sequences of family WOX

WUS and WOX and related sequences belonging to rice were aligned in CLUSTALW. The overall sequence similarity of 30% as calculated from the amino acids-long alignment used for the phylogenetic analysis. In the case of nucleotides the percent of similarity was 20-28% and the similarity used homeodomain varied from 80-85%. The selected sequence shows the likely ortholog of WUS in rice. The conserve acidic domain characteristic of this transcription factor, the homeodomain, consensus WUS BOX (TLPLFPMH) and repressive domain (ASLELTLN) were found (Haecker A. *et al.*, 2004; Kieffer M. *et al.*, 2006). The likely orthologs of all WOX conserved the homeodomain and contain a consensus WUSBOX except OsWOX13 similar to AtWOX13. The greatest sequence conservation is achieved in the area that corresponds to the homeodomain.

3.4.3 Phylogenetic Relationships-WOX

Phylogenetic reconstruction was carried out by applying parsimony methods to the amino acids, nucleotides and homeodomains sequences which resulted in 45 rooted trees. The diagram in figure 3.1 is an example of the trees obtained for each WOX. Significantly related sequences from rice were tested for each WOX member. The jackknife confidence levels of these main branches are very high, in the 95%-100% range, with the exception of sequences used for separation, which is only 64%. The topology and composition of the individual branches for each WOX provided possible orthologs of WOX in rice and are shown in detail in figure 3.2.

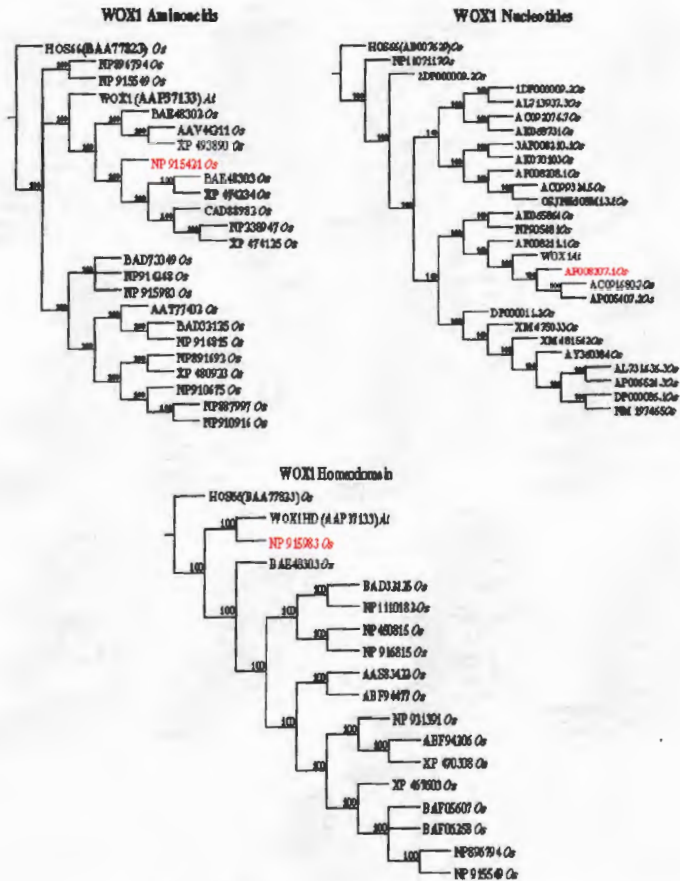


Fig. 1 : Phylogenetic test of WOX 1.

Phylogenetic trees strict consensus resulted with the program Winclada, based in aminoacids, nucleotides and homeodomains sequences rice obtained in Gene Bank and TIGR. Accession number sequence that was select as orthologo of WOX 1 in rice shown in red. We use the third tree correspond to homeodomain test for select the ortholog because are more information about this in the literature and we obtained better results with this.

1) Phylogenetic tree of complete sequence of nucleotides rice related with WOX1. 2)

Phylogenetic tree of complete sequence of aminoacids rice related with WOX1. 3)

Phylogenetic tree of complete sequence of homeodomains rice related with WOX1.

Numbers shown on clades are statistics jackknife. Beside clades are accession number sequences of rice.

Figure 3.1. Phylogenetic test of WOX 1



Fig. 2 : Phylogenetic trees of orthologs WOX2 to WOX14 in rice.

Lyrics in different colors are accession numbers of sequences to WOX orthologs in rice. In some are more than one sequence this because analysis was not sufficient for select the correspond ortholog maybe are more related than others. These trees were obtained based in homeodomains sequences related with correspond WOX.

Figure 3.2. Phylogenetic test of WOX 2 to WOX14 in rice.

The WOX sequences in Arabidopsis and orthologs in plants show how *Zea mays* and *Populus* share one branch of the tree, indicating a divergence among the WOX from mono and eudicotyledoneus sources. Trees with many of the internal nodes being supported by jackknife confidence values are presumably arising from the relatively short evolutionary distances or small

residue variations homeodomains among the plant sequences as compared to other kingdoms. The consensus phylogenetic tree produced by ratchet and jackknife methods obtained the evolutionary relationships with WUS and orthologs in other species shown in Fig. 3.3. This suggests that the WUS gene present in eudicots is divergent from monocots because it forms two separate clades. The sequence selected as ortholog of WUS in rice with accession number XP_474234 contained all important domains found in AtWUS. This sequence was localized in the chromosome number four of rice. Like WUS from *Arabidopsis* we found only one homologue.

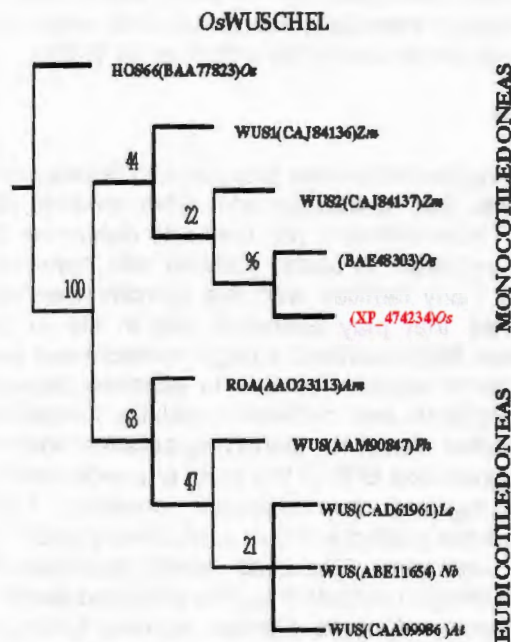


Figure 3 : Phylogenetic tree of WUSCHEL.

Phylogenetic tree obtained with homeodomain sequences related WUS of *Arabidopsis* in *O. sativa* obtained on GeneBank and TIGR. In this tree we included homologs reported in other species of plants. View two clades that show separation of mono and eudicotyledons this maybe caused by divergence inter species. Letters in red correspond to number accession sequence selected how ortholog of WUS in rice. Numbers on clades are statistical test jackknife.

Figure 3.3. Phylogenetic tree of Wuschel.

Apparently the family of WUS is widely conserved in mono and eudicotyledons. Evolution by the birth-and-death process gene duplication is one of the most common evolutionary processes by which new genes arise and multigene families that exist in genomes as a consequence of either concerted evolution or evolution. The results suggest that gene duplication must have occurred in the WOX family since more than one sequenced homologue was found for some how WOX 9, 11, 12, 13 and 14. Multiple sequence alignment show that at least some of the duplicated genes subsequently became nonfunctional evidence in all currently sequenced as yet unknown. The selected sequences as orthologs for 14 of the WOX members in rice are shown in table 2. The WOX family in Rice may involve several more members as several proteins found contain the characteristic homeodomain family but show little similarity with known WOX genes from Arabidopsis. However eventually functional data would solve this problem and would allow to define clearly the orthologs for WOX.

3.5 DISCUSSION

Generally, transcription factors are grouped into families because they share particular domains that associated with DNA binding, oligomerization, or other activities. These domains are useful to determine the role and seek their origin and evolution. In plants proteins with homeodomain are widely conserved, exist many families with this domain how Knox and WUS, its presence indicates that play essential role in life of plants. Since first homeodomain was first described, a large number have been identified. The goal of the analyses reported here is to examine the extent sequence of nucleotides, aminoacids and proteins variability functionally motif that will serve as a predictive model for identifying putative homeodomain proteins, and explore the goodness of fit of this motif to a wide variety of known and of previously unrecognized homeodomain proteins. Examples of gene duplication where the products of this evolutionary event remain fused over a long period are rare. Repeated gene duplications and functional modifications resulting in evolution by the birth and-death process give rise to the great diversity of homeodomain proteins fulfilling a wide array of physiological functions. More recent duplications have resulted in multiple copies within each kingdom. Assuming a single origin, it is remarkable that this protein secondary structure has been maintained across the metazoa and angiosperms. Conserved secondary structure and amino acid motifs are taken to indicate common function, so the amphipathic suggests a protein–protein interaction that has been conserved in evolution. The goal of the analyses reported here is to examine the extent sequence of nucleotides, amino acids and homeodomain through variability functionally motif that serve as a model for identifying a wide variety of known and of previously unrecognized putative homeodomain proteins. Researches during

embryonic development have led to the identification of numerous genes whose protein products function to control gene expression during embryogenesis. These transcriptional regulatory proteins play a fundamental role in directing embryogenesis by establishing and maintaining the appropriate patterns of spatial and temporal gene expression.

In this study we obtained more than three thousand sequences related with genes WUS and WOX genes in *Oryza sativa*. At this moment this type of result not found in the literature respect *Oryza sativa*. Existed reports that shown some accession numbers of sequences how Belonging to some members family of WUS in rice but only shown the homeodomain sequence (Nardmann J. *et al.*, 2006 and Nardmann J. *et al.*, 2007). Nardmann in his studies not mentioned the number of total sequences obtained for phylogeny in poacea, only show the some propose members of WOX.

We show numbers of different sequences obtained in two gene banks used for the phylogenetic test, which offers major support because think that is necessary for the formal analysis of evolution about this family. Three types of phylogenetic tree obtained based in nucleotides, amino acids and the conserved homeodomain, this because we considered that are necessary for make sure us results and in the literature is more common make some experiments based only in sequence aminoacids, but we considered lost information essential for elucidate the correct phylogeny for this family of transcription factors. We observed that the homeodomain sequence is very conserved among sequence obtained how members of family WUS, which indicated that is conserved during evolution same how occurred in others protein with homeodomain. In this study obtained complete sequence of OsWOX1 with accession number NP915983, this sequence is the same proposed by Feng Q. *et al.*, 2002 in the study Sequence and analysis of rice chromosome 4. For the rest select members of WUS family we obtained the correspond ortholog in rice. OsWOX2 obtained, have accession number BAB93218 the sequence of this contain the same homeodomain previously reported by Nardmann J. *et al.*, 2006. Now we reported the complete aminoacids and nucleotides sequences. OsWOX3 obtained, have accession number BAE48302. The sequence is the same previously reported by Nagasaki *et al.*, 2005 for this gene. Also for OsWOX4 we obtain the full sequence with accession number NP238947, this sequence contain the same homeodomain previously reported by Nardmann J. *et al.*, 2006. Now we reported the complete amino acids and nucleotides sequences. OsWOX5 obtained, have accession number NP915549. The sequence is the same previously reported by Kamiya N. *et al.*, 2003 for this gene. In the phylogenetic analysis to OsWOX6 and 7 we no obtained sequence for this genes, this be in the same clad of the sequence belonging to OsWOX5 because are very related. This is result of divergence and maybe disappears to make room for new streams with new features. The complete sequence of

OsWOX8 with accession number AAT77402, has not yet being reported however, this sequence is the same that we obtained for WOX9C, future functional analysis would be required to assign a correct or divergence in Monocots. For OsWOX9A and C obtained accession numbers NP1110182 and AAT77402 correspond. In the phylogenetic tree obtained for the ortholog WOX9 show several sequences in different clades that were related but no are the same. Which leads us to believe in the existence of more than one or two orthologs for this gen in *Oryza*. The functions of this gene maybe are very important or have several functions what led to his multiplication in the genome. Sequences obtained have the same homeodomain reported for these genes by Nardmann J. *et al.*, 2006. Sequence obtained for OsWOX11 and 12 is the same for both and are two, XP480923 and NP891692. With this study no is clear wich sequence corresponds for each one or maybe occurred duplication for one gen. Are necessary functional studies about this and comparison with previously report in order to allocate the correct name gene. Sequence obtained has the same homeodomain reported for these genes by Nardmann J. *et al.*, 2006. Sequence obtained for OsWOX13 and 14 is the same for both and have the same homeodomain reported for OsWOX13 by Nardmann J. *et al.*, 2006. Are necessary functional studies about this and comparison with previously report in order to allocate the correct name. In our phylogenetic analysis for the gene WUSCHEL obtained two possible orthologs but the fine detail sequence comparison show deferens in the terminal carboxyl which allows to select for the sequence in figure 3. The sequence is 98% to similitude with previously reported by Nagasaki *et al.*, 2005. The evolutionary and potential functional relationships implied by this analysis are supported by other criteria, including the chromosomal distribution of these genes relative to duplicated genome segments. Considerable diversity in DNA binding site specificity among family members is predicted and marked divergence in protein sequence outside of the conserved homeodomain is observed, these observations suggest that the *Oryza* homeodomains proteins have the potential to participate in an extensive set of combinatorial interactions, endowing them with the capacity to be involved in the regulation of a multiplicity of transcriptional programs. These phylogenetic results in combination with conserved secondary protein structure, putative modularity of homeodomain proteins, and known patterns of expression contribute to greater understanding of the origin and evolution of these proteins and their role in the diversification of eukaryote lineages. With results obtained in our search, we proposed the possibility that in *Oryza* there are more than 15 members for the family OsWUS, which emerged during evolution through duplication and this has allowed exist new members family that diverged for the Acquaintances in *Arabidopsis* how result of 150 million years of divergence between mono and eudicotiledoneus plants.

3.6 REFERENCE

- Akam, M. 1989. Hox and Hom: homologous gene clusters in insects and vertebrates, *Cell*, 57, 347-349.
- Altschul, Stephen T., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Banerjee B. S. and Baxevanis A. D. 2001. Molecular evolution of the homeodomain transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 3258-3269.
- Bharathan G., Janssen B. J., Kellogg e. A. and Sinha N. 1997. Did homeodomain proteins duplicate before the origin of angiosperms, fungi, and metazoa?, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13749-13753.
- Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., and Wheeler D. L. (2006). Gene Bank. *Nucleic Acids Research*, 34(D), 16- 20.
- Feng Q., Zhang Y., Hao P., Wang S., Fu G., Huang Y., Li Y., Zhu J., Liu Y., Hu X., Jia P., Zhang Y., Zhao Q., Ying K., Yu S., Tang Y., Weng Q., Zhang L., Lu Y., Han B. 2002. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature*, 420, 316-320.
- Gehring, W. J. 1987. Homeoboxes in the study of development. *Science* 235:1245-1252. Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. 1994. Homeodomain Proteins. *Annual Review Biochemistry*, 63, 487- 526.
- Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. and Laux T. 2004. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 657-668.
- Ito Y., Eiguchi M., Kurata N. 1999. Expression of novel homeobox genes in early embryogenesis in rice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1444, 445-450.
- Ito Y., Hirochika H., Kurata N. 2002. Organ-specific alternative transcripts of KNOX family class 2 homeobox genes of rice. *Gene*, 288, 41-47.

Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y. and Matsuoka M. 2003. Isolation and characterization of rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal*, 35, 429-441.

Kieffer M., Stern Y., Cook H., Clerici E., Maulbetsch Ch., Laux T. and Davies B. 2006. Analysis of the Transcription Factor WUSCHEL and Its Functional Homologue in *Antirrhinum* Reveals a Potential Mechanism for Their Roles in Meristem Maintenance. *The Plant Cell*, 18, 560–573.

Kornberg T. B. 1993. Understanding the Homeodomain. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 26813-26816.

Laughon, A. 1991. DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry*, 30, 11357-11367.

Levine, M., and T. Hoey. 1988. Homeobox proteins as sequencespecific transcription factors. *Cell*, 55, 537-540.

McGinnis, W., R L. Garber, J. Wirz, A. Kuroiwa, and W. J. Gehring. 1984. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, 37, 403-408.

Nardmann J. and Werr W. 2006. The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of *WUS* orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of monoand dicot evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 23, 2492-2504.

Nardmann J, Zimmermann R, Durantini D, Kranz E, Werr W. 2007. *WOX* Gene Phylogeny in Poaceae: A Comparative Approach Addressing Leaf and Embryo Development. *Molecular Biology and Evolution*. 24(11), 2474-84.

Nagasaki H., Matsuoka M., Sato Y. 2005. Members of TALE and WUS subfamilies of homeodomain proteins with potentially important functions in development form dimers within each subfamily in rice. *Genes & Genetic Systems*, 80, 261-267.

Nixon K. C. 1999. The Parsimony Ratchet, a New Method for Rapid Parsimony Analysis. *Cladistics*, 15 (4), 407–414

Nixon, K.C. (1999). *Winclada* (beta) ver. 0.9.9. Published by the autor, Ithaca, Nueva York.

Novina C.D. and Roy A.L. 1996. Core promoters and transcriptional control. *Trends in Genetics*, 12(9), 351-355.

Pearson W. R. and D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 2444-2448.

Pearson W. R. 1990. Rapid and sensitive comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 183, 63-98.

Scott, P. M., J. W. Tamkun, and G. W. Hartzell III. 1989. The structure and function of the homeodomain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 989, 25-48.

Scott M. P. and Weiner A. J. 1984. Structural relationships among genes that control development Sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 4115-4119.

Yuan Q., Ouyang S., Liu J., Suh B., Lee D., Quackenbush J. and Buell C. R. 2003. The TIGR rice genome annotation resource: annotating the rice genome and resources for plant biologists. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 229-233.

CAPITULO IV

4. Clonación del Promotor del Gen OsWuschel de *Oryza sativa*.

4.1 INTRODUCCIÓN

La transcripción es un proceso muy complejo en el que participan diversas enzimas y proteínas asociadas. Las moléculas de RNA se transcriben a partir de los genes de las células y la transcripción comienza con la unión de la RNA polimerasa a una secuencia específica de DNA que se llama promotor. La frecuencia de inicio de la transcripción suele afectarse por la unión de factores de transcripción (Mckee T and Mckee, 2003).

Al igual que muchos procesos, la transcripción debe ser regulada, ya que muchos genes transcritos tienen un papel importante en procesos de desarrollo espacial y temporal. Waatabe and Okada, 2003).

En *Arabidopsis thaliana* se ha observado que el gen Wuschel codifica para una proteína homeobox, la cual mantiene indiferenciadas a las células pluripotenciales que se encuentran en la zona central de meristemo apical del tallo (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998).

El tamaño de la población de células pluripotenciales está dada por el nivel de la expresión del dominio de WUSCHEL, por lo que se debe mantener un balance. En el caso particular de este gen el balance se puede dar por retroalimentación negativa, entre otros factores la presencia de WUS activa la expresión de los genes Clavata 3 y Clavata 1, cuyos productos reprimen a WUS (Brad *et al.*, 2000; Shoof *et al.*, 2000; Lenhard and Laux., 2003). Otro gen que controla a WUS es Agamous cuyo producto reprime al gen Wus (Lenhard *et al.*, 2001).

De acuerdo a diversos estudios realizados utilizando mutantes de este gen y cambios en los dominios de expresión, se ha propuesto que existen otras rutas de regulación o control de la expresión de WUS (Laufs *et al.*, 1998. Zhao *et al.*, 2004).

En el caso del gen Wus existe un reporte acerca de su regulación transcripcional, en el cual se identificaron secuencias cortas que actúan integrando a los elementos que controlan la indiferenciación de células pluripotenciales, es decir controlan la transcripción de Wus. En este estudio se analizaron los patrones de expresión del gene GUS unido a distintos fragmentos del promotor y en base a esto se sugirió que la regulación de WUS es mediada por regiones cis., así como que se encontró una sección de 57pb que es esencial para mantener a las células indiferenciadas (Baurle and Laux, 2005).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1 ANÁLISIS DE SITIOS DE UNIÓN AL PROMOTOR DE OsWUS

El análisis de posibles sitios de unión de factores transcripcionales, al promotor de OsWus se realizó con el programa MatInspector del software Genomatix.

MatInspector utiliza una matriz amplia que describe sitios de unión de factores transcripción localizados en secuencias de ADN. La primera versión de MatInspector fue descrita por Quandt *et al.*, (1995) y una nueva versión del mismo en Cartharius *et al.*, (2005) Esta última fue la que se usó en el estudio.

4.2.2 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron oligonucleótidos con ayuda de los programas Primer3 (v. 0.4.0) y Oligo Analyzer 3.0 del IDT Scitools, a partir de una secuencia de 3500 pb previa al gen OsWUSCHEL (XP_474234) el cual fue seleccionado del análisis filogenético molecular.

4.2.3 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Se realizó un análisis con base a su patrón de restricción en el programa NEBcutter V2.0.

4.2.4 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *O. sativa*.

Se utilizaron semillas de tres variedades de arroz: S-102 (grano corto), M-202 (grano mediano) y Wells (grano largo).

Las semillas de arroz se desinfectaron siguiendo el siguiente protocolo:

- Se descascararon manualmente.
- Se lavaron con etanol al 70% durante 5 minutos y en agitación continua.
- Se sumergieron en una solución de hipoclorito al 50%, durante 45 minutos agitándose continuamente.
- Se lavaron con agua destilada estéril, hasta eliminar la solución de hipoclorito.

Una vez desinfectadas las semillas se colocaron en cajas petri con papel filtro húmedo y se dejaron germinar en fotoperíodo 16/8hrs a una temperatura de 25°C.

También se pusieron a germinar semillas de arroz en hidroponía, para ello las semillas se colocaron en mallas y estas se pusieron a flotar en medio Hogland en el invernadero.

4.2.5 EXTRACCIÓN DE ADN DE *O. sativa*.

Se utilizaron dos métodos para la extracción de ADN genómico de hojas de *O. sativa*.

I. Las células se maceraron con Nitrógeno líquido y se añadió el amortiguador de extracción (100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM de NaCl, 10 mM de β Mercaptoetanol, 1.3% SDS). Los ácidos nucleicos se precipitaron con acetato de potasio 5 M, se realizó extracción fenólica, seguida de una precipitación con isopropanol y se resuspendió el ADN en agua ultrapura. Posteriormente se digirieron con RNAsa (Dellaporta *et al.*, 1983).

II. Se maceraron las células en nitrógeno líquido y se añadió amortiguador de extracción (100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM de NaCl, 2% de β -Mercaptoetanol, 2% SDS y 10% de PVP). Se realizó extracción fenol:cloroformo:isoamilico, seguida por una precipitación con isopropanol y se resuspendió el ADN en agua ultrapura. Posteriormente el extracto se digirió con RNAsa (Cheng L. R *et al.*, 2001)

4.2.6 REACCIONES DE PCR.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando ADN de *O. sativa* y los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de XP_474234 del posible promotor de este gen.

TABLA 4.1. Oligonucleotidos diseñados para la clonación del promotor de Xp_474234.

Nombre	Secuencia
BSPM1 F	CCC CTC CAC CCA CCT GCT GCC GCT G
HaeII R	AGG AGG CGC CTG CAT GGT AGT ACG CCC
HaeII F	CGT ACT ACC ATG CAG GCG CCT
AclI R	TCA AAC GTT TGA ACA CCT GTA TGA AGT
AclI F	CAG GTG TTC AAA CGT TTG ATA TAA TAT GAT G
NdeI R	GAA CTA GGA GTA TAT GTG CAT TCA TAT GTG
NdeI F	CAC ATA TGA ATG CAC ATA TAC TCC TAG TTC
BpmI R	TCT CCA GTT CGG CTG TAT TTA AAT CC
BpmI F	GGA TTT AAA TAC AGC CGA ACT GGA GA
PstI R	ATC CAT CCT GCA GGA AGG C

4.3 RESULTADOS

4.3.1 SITIOS DE UNION A LA SECUENCIA DEL POSIBLE PROMOTOR OsWUS

En cuanto al promotor del posible OsWus se seleccionó un fragmento de 3500pb antes del codon de inicio del gen. A este fragmento se le realizó un análisis de posibles sitios de unión de factores de transcripción para promotor.

Con este análisis, se localizaron sitios de unión para factores de transcripción de la Clase E2F1, Elementos de respuesta a etileno, gen parecido a Agamous 2, LEAFY, elementos de respuesta a auxinas, sitios para factor de transcripción clase MYB, así como varios sitios de unión para el propio WUS a lo largo de la secuencia, lo cual nos indica que posiblemente este gen también se regula así mismo (figura 4.1).

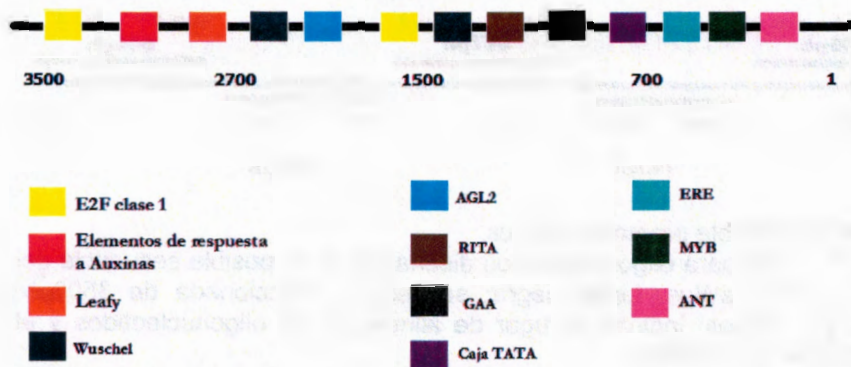


Figura 4.1. Sitios de unión para factores de transcripción en la secuencia del posible promotor OsWus (XP_474234). Se observan trece sitios de unión diferentes a lo largo de la secuencia, dentro de estos sitios se puede observar una caja TATA la cual es necesaria para el inicio de la transcripción. ¹ Sitio de inicio de la transcripción.

A partir de la secuencia seleccionada como el posible promotor de OsWUS y de su patrón de restricción, se diseñaron cuatro pares de oligonucleotidos para amplificar secciones del mismo.

4.4 Clonación de un segmento del posible promotor de OsWUs.

Para la clonación del posible promotor de OsWus se utilizaron los juegos de oligonucleotidos diseñados en base al análisis de restricción de la secuencia seleccionada (Xp_474234).

El promotor se dividió en 5 partes para facilitar su amplificación y clonación (figura 4.2). Así que en los datos siguientes, el primer número corresponde a la sección del promotor. Como resultado de las reacciones de PCR realizadas obtuvimos fragmentos correspondientes a los tañamos esperados. Posteriormente estos fragmentos se ligaron al vector pGEM-Teasy para su envío a secuenciación.

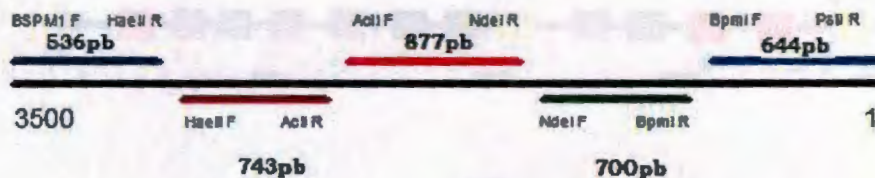


Figura 4.2. Posible promotor OsWus.

Sitios de unión para oligonucleotidos diseñados en la posible secuencia del promotor de OsWus. Línea negra: secuencia seleccionada de 3500pb. Líneas de colores: indican el lugar de alineación de oligonucleotidos y el tamaño que se amplifica.

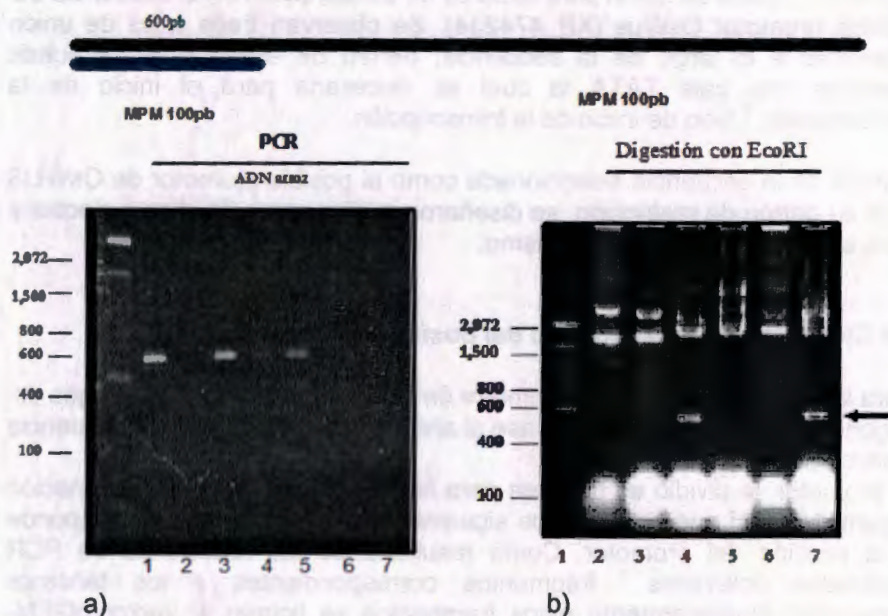


Figura 4.3 Clonación de un fragmento de 536pb del posible promotor de OsWUS. MPM: marcador de peso molecular. a) PCR de ADN arroz con oligonucleotidos HaeII F y AclI R. b) Digestión de clonas con inserto de aproximadamente 600pb.

De las reacciones de PCR con el juego de oligos BSPM1 F y HaeII R se logro cuales amplificar un fragmento de aproximadamente 600pb que es lo que esperábamos ya que los se diseñaron para un fragmento de ese

tamaño. Este fragmento se purificó y ligo al vector pGEM-Teasy para su envío a secuenciación (Figura 4.3).

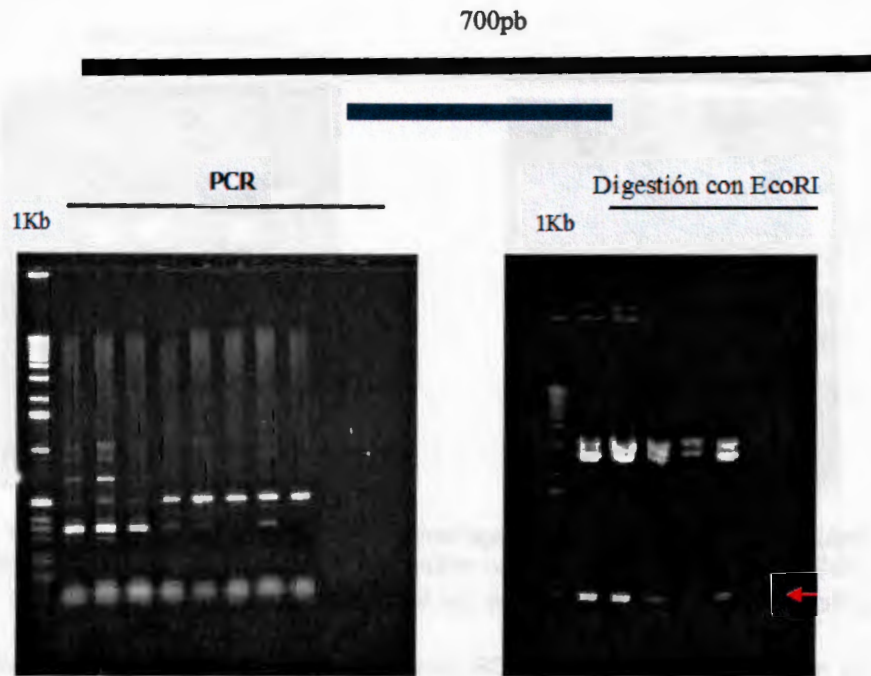


Figura 4.4 Clonación de un fragmento de 743pb del posible promotor de OsWUS. 1kb: marcador de peso molecular. a) PCR de ADN arroz con oligonucleotidos BSPM1F y Haell R. b) Digestión de clonas con inserto de aproximadamente 700pb.

Apartir de las reacciones de PCR con los oligos BSPM1F y Haell R diseñados para clonar el posible ortólogo del gen WUS en *O. sativa* se logró amplificar una banda de aproximadamente 700pb que es lo que esperábamos ya que los se diseñaron para un fragmento de ese tamaño. Esta banda se logro purificar y ligar al vector p-GEM-Teasy, para verificar que el fragmento ligado era del tamaño esperado se realizó una digestión con la enzima EcoRI con lo que se obtuvo una banda del tamaño esperado. Figura 4.4.

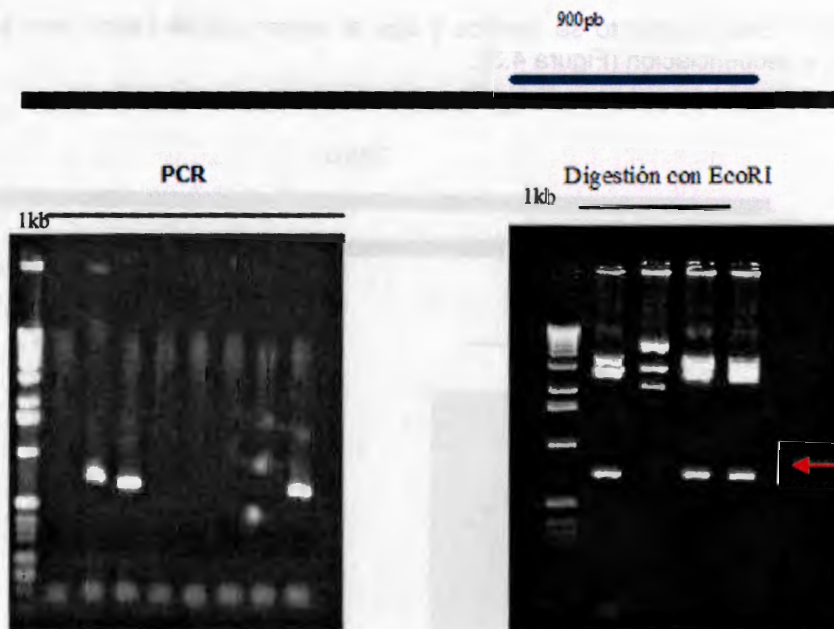


Figura 4.5 Clonación de un fragmento de 877pb del posible promotor de OsWUS. 1kb: marcador de peso molecular. a) PCR de ADN arroz con AclI F y NdeI R. b) Digestión de clonas con inserto de aproximadamente 900pb.

Se realizaron reacciones de PCR con los oligos AclI F y NdeI R diseñados para clonar el posible ortólogo del gen WUS en *O. sativa*. Obteniéndose una banda de aproximadamente 900pb que es lo que esperábamos ya que se diseñaron para amplificar un fragmento de ese tamaño. El fragmento se ligo al vector pGEM-Teasy y se verificó el tamaño del inserto mediante una digestión con la enzima EcoRI (figura 4.5)

La secuencia que logramos amplificar tiene un tamaño de 2156pb, y a continuación se muestra el alineamiento de las secuencias de clonas obtenidas (52RC47 y 39POsWUS), con la secuencia del posible promotor de OsWUS obtenida del Gene Bank (PromotorRCOsWUS).

Se seleccionaron 6 clonas (2 de para cada fragmento amplificado) para su secuenciación de las cuales tres alinearon en un 100% con la secuencia disponible en el GeneBank para el posible promotor de OsWus. Las secuencias de las clonas obtenidas y alineadas fueron:

PromotorRCOsWUS
52RC47y39POsWUS

CAGTCACATCATACTAATTTTAACCAAATCTAAACTTTGCGCTGAACCTAACACAGCC 60

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS TGAGTATAGGCACGAATAAATTTGAGGAGTTTCCAATCACTCCAAATAAAACCGTGAATG 120

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS CAAATTAAGAAGTGGTATACATTTTCCCTTTTGTCTCCCGTCAATTGATCACTTGCCA 180

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS CACGTTACAGAGTGAGTATAATATGTAAACTGTTACCCCACTCAATTGAATTGATATTG 240

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS AATTAGAAGAGAGAGAAGAGATCACAAAGCCGGATGCAGCACAAAGOTACAACAGACGTTA 300

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS CAAGATAAAGAGATATGCCGTACTAAAGGTGTGTGTGGAATGAGCGGAACCCTAGGGTTT 360

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS TCTATTCCCTCGCTCGCCGGTGTAGTGGTTCTCAAATCCATCCTGCAGGAAGCCCGGC 420

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS TCTGGTCACTCGCCGGTACCGCTTTGTGTGGGGCCCTACTAGGAGCTTAGTGGGTCCC 480

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS TCCACCACAATCTCCTCTATATGGGAGCAGTCTCTCTGTGTAGTTAAATCTCAGTAGT 540

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS CTTTTAGTTTTTCACTTATTTTTTCATGTCCCCGGCGATGACCTTTTTGGTGTGTGGTT 600

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS GTGTACTGAAACTCTGCTTTTTTCTAATATATTGATGTGCAATCTATTTGTAATAGGAT 660

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS GTGTACATCCACCTAAATCCCTTATATTATGGGACGGAGGAGTATTAGCATGGTTG 720

-----GGACGGAGGGAGTATTAGCATGGTTG 27

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS CATCCCAACACACACTTTCATAAGAGAGTTTTTT-AGTAAAAATTTGTAAATATCA 779
CATCCCAACACACACTTTCATAAGAGAGTTTTTTGTAGTAAAAATTTGTAAATATCA 87

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS ATATGGAAGCTTGAGTTCACAAATGAAAAGTTTCATGTGATCTAAGGCATGTTTGTGTC 839
ATTTGGAAGCTTGAGTTCACAAATGAAAAGTTTCATGTGATCTAAGGCATGTTTGTGTC 147
** *****

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS CCTTCAAACCTCTAAAAATACGTCACATCAAATTTGGACACATGCATAGAGTATTTAA 899
CCTTCAAACCTCTAAAAATACGTCACATCAAATTTGGACACATGCATAGAGTATTTAA 207

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS ATGTGGACGAAAAAAATCAATTACACAGTTTGCATGTAAATTCGGAGATGAATCTTTTG 959
ATGTGGACGAAAAAAATCAATTACACAGTTTGCATGTAAATTCGGAGATGAATCTTTTG 267

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS AGCATAAATTACGCCATGATTTGACAATGTGATGCTACAGTAAACATGCTAATGACAAAT 1019
AGCATAAATTACGCCATGATTTGACAATGTGATGCTACAGTAAACATGCTAATGACCGAT 327

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS TAATTAGGCTTAATAAATTCGCTTGCAGTTTATAGCCGGAGTATGTAATTTGTTTGT 1079
TAATTAGGCTTAATAAATTCGCTTGCAGTTTATAGCCGGAGTATGTAATTTGTTTGT 387

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS ATTAGTCTATGTTAATACTTCAAATAATGTGTCCTGATACTTAAAAAAAATTTGGCAC 1139
ATTAGTCTATGTTAATACTTCAAATAATGTGTCCTGATACTTAAAAAAAATTTGGCAC 447

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS ACGAACTAACACAGCCTAACCTGAAAGCTTTGGTTGAAACTTGAAGTCTAAAGTGTGT 1199
ACGAACTAACACAGCCTAACCTGAAAGCTTTGGTTGAAACTTGAAGTCTAAAGTGTGT 507

```

** *****
PromotorRCosWUS      GCTGGCAATTCGCTGCACGTACTAAATTGCAATTCCTCTGTATAGCTAGGAGTATGGT 1259
52RC47y39POSWUS     GCTGGCAATTCGCTGCACGTACTAAATTGCAATTCCTCTGTATAGCTAGGAGTATGGT 567
*****

PromotorRCosWUS      TATACCAGCAAACATAAATTTAGCCTTTTGATGAGGAGCACCTATATATAGTACCACATTC 1319
52RC47y39POSWUS     TATACCAGCAAACATAAATTTAGCCTTTTGATGAGGAGCACCTATATAATAGTACCACATTC 627
*****

PromotorRCosWUS      CGAGTACCTTTAGGATAATCTATATTGAAAAATCCCTAACTAGTATTTATCAGTACTAG 1379
52RC47y39POSWUS     CGAGTACCTTTAGGATAATCTATATTGAAAAATCCCTAACTAGTATTTATCAGTACTAG 687
*****

PromotorRCosWUS      TAAAAAATCTTAATTTGTTGATTTATGAGTTTACAAATAAAAGATAAAAATATTTTACAGC 1439
52RC47y39POSWUS     TAAAAAATCTTAATTTGTTGATTTATGAGTTTACAAATAAAAGATAAAAATATTTTACAGC 747
*****

PromotorRCosWUS      AATTAAGTGGTAATAGTATAAATAGATACTACAATCCATAATACGATCAATTAATAATTA 1499
52RC47y39POSWUS     AATTAAGTGGTAATAGTATAAATAGATACTACAATCCATAATACGATCAATTAATAATTA 807
*****

PromotorRCosWUS      TTATACTACTAATCATAAAGATCATTTGTAACATCTCCAGTTCGGCTGTATTTAAATCC 1559
52RC47y39POSWUS     TTATACTACTAATCATAAAGATCATTTGTAACATCTCCAGTTCGGCTGTATTTAAATCC 867
*****

PromotorRCosWUS      AA-----AGTTTGGATC-A 1572
52RC47y39POSWUS     AATCGAATTCGAATTCGATTTCTCCAGTTCGGCTGTATTTAAATTCAAAGTTGGATCCA 927
** *****

PromotorRCosWUS      AAC TTCAGTCTTTTCCATCACATCAATCTGTACATACACACAACCTACATCATCTCTAAT 1632
52RC47y39POSWUS     AAC TTCAGTCTTTTCCATCACATCAATCTGTACATACACACAACCTACATCATCTCTAAT 987
*****

PromotorRCosWUS      TTTAACTAAAATCCAAACTTTGCGCTGAACTAAACACAGCCTTCATATACATCGACCACA 1692
52RC47y39POSWUS     TTTAACTAAAATCCAAACTTTGCGCTGAACTAAACACAGCCTTCATATACATCGACCACA 1047
*****

PromotorRCosWUS      CT-----GAAGTTCATCAAAACCGTACGTTCTGTCAAATTTAAGAA 1732
52RC47y39POSWUS     CTTCATATACATCAACCACATGAAGTTTCATCAAAACCGTACGTTCTGTCAAATTTAAGAA 1107
** *****

PromotorRCosWUS      ACATAAAACAGAGGATATATGCACCACTGCATGTAAGGCAATTCACAGAAAACCTTGTG 1792
52RC47y39POSWUS     ACATAAAACAGAGGATATATGCACCACTGCATGTAAGGCAATTCACAGAAAACCTTGTG 1167
*****

PromotorRCosWUS      CTAGCTGGATCGTATGCTACAGTAGACTGCGTAGGATGCATTTGGTACTGAAAAAAGTTT 1852
52RC47y39POSWUS     ATAGCTGGATCGTATGCTACAGTAGACTGCGTAGGATGCATTTGGTACTGAAAAAAGTTT 1226
*****

PromotorRCosWUS      TGTTCAGAATGCATGCAACCGCGGCCTACCAGCAGTCTATTGTGTCCATGAACCAATCA 1912
52RC47y39POSWUS     TGTTCAGAATGCATGCTACCGCGGCCTACCAGCAGTCTATTGTGTCCATGAACCAATCA 1286
*****

PromotorRCosWUS      TGACAGAATATCCCTCGCGTTCCCGAGGGAGAAAAATCGAACTGAATGAAGCTAGAGTTTA 1972
52RC47y39POSWUS     TGACAGAATATCCCTCGCGTTCCCGAGGGAGAAAAATCGAACTGAATGAAGCTAGAGTTTA 1346
*****

PromotorRCosWUS      CACGAAATTCGAATAAAATAATCCAAATGAACTAGGAGTATATGTGCATTCATATGTG-- 2030
52RC47y39POSWUS     CACGAAATTCGAATAAAATAATCCAAATGAACTAGGAGTATATGTGCATTCATATGTGAA 1406
*****

PromotorRCosWUS      -----TATTTGGTTTCC 2042
52RC47y39POSWUS     TCACTAGTGAATTCGATTTGAACTAGGAGTATATGTGCATTCATATGTGATTTGGTTTCC 1466
*****

PromotorRCosWUS      TTC TAATATACTCCATCCGTTTATAATAGTCATAAATAAA----- 2083
52RC47y39POSWUS     TTC TAATATACTCCATCCGTTTATAATAGTCATAAATAAAATCCGTTTATAATAGTCAT 1526
*****

PromotorRCosWUS      -----AAAAATAGATGTATATGACACATCCATCCAAAATCTCTTATATATGAGATA 2136
52RC47y39POSWUS     AATAAAAAAAAATAGATGTATGACACATCCATCCAAAATCTCTTATATATGAGATA 1586
*****

PromotorRCosWUS      GAGGGAGTAACACCACGTAATCCATCTTATGTCGTTACAAAACCCCTTTTATCTTATA 2196
52RC47y39POSWUS     GAGGGAGTAACACCACGTAATCCATCTTATGTCGTTACAAAACCCCTTTTATCTTATA 1646

```

```

*****
PromotorRCOsWUS      AGTAGTTAAAATAAAAACCCGTATTTTAAAAGTTTATAGAGGGTGTCTCGTAAAGACCTGTT 2256
52RC47y39POSWUS      AGTAGTTAAAATAAAAACCCGTATTTTAAAAGTTTATAGAGGGTGTCTCGTAAAGACCTGTT 1706
*****

PromotorRCOsWUS      TTTGCGTGTGGTTGTGATGTCGGCGCGCCCTAAAAATGTGTTCAACTGTTTACAGATATT 2316
52RC47y39POSWUS      TTTGCGTGTGGTTGTGATGTCGGCGCGCCCTAAAAATGTGTTCAACTGTTTACAGATATT 1766
*****

PromotorRCOsWUS      TGGGGATAGACGGTTGCTACATCCATATATGAAAAATACATTTAGCTGTTTGCAAGAC 2376
52RC47y39POSWUS      TGGGGATAGACGGTTGCTACATCCATATATGAAAAATACATTTAGCTGTTTGCAAGAC 1826
*****

PromotorRCOsWUS      TTTCTGTAGTAATGTGAGAGTTCAAAAAAGAATATGGGTATTGGTACATGGAGTATAGA 2436
52RC47y39POSWUS      TTTCTGTAGTAATGTGAGAGTTCAAAAAAGAATATGGGTATTGGTACATGGAGTATAGA 1886
*****

PromotorRCOsWUS      AGTCAGCTAAACCTCTATCTTTCTTTCCCTGCGTACCAGGCTACCAGTAGCTTACATTT 2496
52RC47y39POSWUS      AGTCAGCTAAACCTCTATCTTTCTTTCCCTGCGTACCAGGCTACCAGTAGCTTACATTT 1946
*****

PromotorRCOsWUS      CTTCTTTGTAATTTCTCTCAATCAAAATGCAAGGTTGAAAAGGCTATATACCTACTAGCTA 2556
52RC47y39POSWUS      CTTCTTTGTAATTTCTCTCAATCAAAATGCAAGGTTGAAAAGGCTATATACCTACTAGCTA 2006
*****

PromotorRCOsWUS      ATAGTATCTCTCAAGATCAAACATGTGCGAATCACGGATCAAATAACGTCAGATTCA 2616
52RC47y39POSWUS      ATAGTATCTCTCAAGATCAAACATGTGCGAATCACGGATCAAATAACGTCAGATTCA 2066
*****

PromotorRCOsWUS      CCATCAAACGCACTACTGAGGCTATGTTTAGATGCTACCCATAAATTTTTTCATCATATT 2676
52RC47y39POSWUS      CCATCAAACGCACTACTGAGGCTATGTTTAGATGCTACCCATAAATTTTTTCATCATATT 2125
*****

PromotorRCOsWUS      ATATCAAACGTTTGAACACCTGTATGAAGTATFAAATACATGCTAAAAATAACTAATG 2736
52RC47y39POSWUS      ATATCAAACGTTTGAACACCTGTATGAAGTATFAAATACATGCTAAAAATAACTAATG 2157
*****

PromotorRCOsWUS      CACATATTCGCAGTAATTTGCGAGAGAACTTTTAAAGCTTAATGACGGATTAAATTAGCC 2796
-----

PromotorRCOsWUS      TTAATAAATTCATCTCACGGTTTACTGATGATTCCGTAATTTTTTTTGTATTAGACTA 2856
-----

PromotorRCOsWUS      TGTTTAATACTTTAAATGTGATTCGTATATCCGATTTTCGATGTGACACGGTAACAAAT 2916
-----

PromotorRCOsWUS      TTTACCCCTGGATCTAAACACAGCTATAAAGCACCGGACGAACCTGGATTATTTCCCTGT 2976
-----

PromotorRCOsWUS      CAATCTGATCGACACACACCTCTCATAACGTAACATTATTCACAGAGAACTGAAAACACA 3036
-----

PromotorRCOsWUS      GGCAAGTTTGAAGAAGCAACATGGTACCAACTCTCACATCACAACCACAAACCATGCCAC 3096
-----

PromotorRCOsWUS      CAGGGTGGTTGCCTCCAAATACAGCTCAATGAAAGCATCAACATGCATGCTCTCTCTCT 3156
-----

PromotorRCOsWUS      CTCTCTCTGTGTATGATGAGAGAGAAGGCTTGCAGCTTAGCTAAGGATCGGAGAGGAG 3216
-----

PromotorRCOsWUS      AGGAGAGGAGGAAGAAGCGATTGCCATAAGGAGGCGCTGCATGGTAGTACGCCCCCTTG 3276
-----

PromotorRCOsWUS      CGTAGTCCCACATGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 3336
-----

```

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **CTCCAAAGATAATCCATGATTTCTCCCTCAGAGCGGCCCAACCTATGTACCCCCCTACC** 3396

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **TTCCATAGCTCCCCPTCCSTAGCTACCTTCACTCCATCCTTCTCTCTCCTTATAAACCC** 3456

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **TCATGTCCCTCCTCCACCCCTCAGGGCCACAGCCCTTCTTCCCTTTCATCTTGATC** 3516

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **TTGATCCTCTTCTTGAATCTTCTACTTCTTCTTCTTGGTTTCACTTGGCMTCCGTTTCCAT** 3576

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **GGATCACAATGCAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGGTGGGTGGAGGGGGAGGAGAGGGAGTGGC** 3636

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **GGGAGGGGTGGTGTGCGGGTGTCCGGCCGAGCGGGACGAGGTGGACGCCGACGACGGA** 3696

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **GCAGATCAAGATCCTGCGGGAGCTGTACTACAGCTGCGGCATCAGGTCCGCCAACTCGGA** 3756

PromotorRCOsWUS 52RC47y39POSWUS **GCAGATCCAGCGGATCGCCGCCAT** 3780

Mediante el alineamiento anterior pudimos verificar que las secuencias de las clonas aisladas corresponden a una sección de la secuencia reportada en el GeneBank para el posible promotor de la secuencia con el número de accesión Xp_474234, la cual seleccionamos como OsWus mediante análisis *In silico*. También podemos observar que aun falta amplificar una parte de la secuencia (secuencia en color rojo) la cual es primordial ya que en ella se encuentra el sitio de inicio de la transcripción (ATG en color azul) a lo cual hacemos referencia en la sección de perspectivas.

4.5 DISCUSIÓN

Al analizar la secuencia seleccionada como el posible promotor de OsWus en el software MatInspector de programa genomatix, obtuvimos que la secuencia posee varios sitios de unión para factores transcripcionales como E2F, el cual esta involucrado en procesos del ciclo celular y que puede actuar como activador o represor regulando el ciclo, además de estar involucrado en apoptosis y diferenciación (Lammens *et al.*, 2009) (De ager and Murria.,1999) (Wildwater *et al.*, 2005). De igual forma en la secuencia se localizaron sitios de unión a elementos de respuesta a auxinas que intervienen en procesos de embriogénesis (Leibfried *et al.*, 2005), una caja TATA, sitios de unión para factores transcripcionales clase MYB.

Los genes MYB codifican para factores transcripcionales encargados de procesos específicos en plantas, como la biosíntesis de antocianinas, proliferación, diferenciación, regulación (metabolismo secundario, formación de meristemo, desarrollo de flor y semilla), apoptosis mecanismos de respuesta a estrés, defensa entre otros (Du *et al.*, 2009). Existe un sitio de unión para Wuschel, lo cual sugiere que este gen se puede autorregular. No existen a la fecha datos similares para otros miembros de la familia del gen Wus ni para los ortólogos del mismo reportados anteriormente.

La sección analizada fue de 3500 pb, semejante a la sección que se obtuvo para el promotor del gene Wus en Arabidopsis, trabajo realizado por Baurle and Laux en el 2005.

Al igual que en este reporte no se encontró sitio de unión para el factor de transcripción AGAMOUS (AG), el cual regula de manera negativa al gen WUS ya que esto permite la formación del meristemo floral, a su vez que WUS induce al gene AG. (Lenhard *et al.*, 2001).

Se logro la amplificación de una secuencia de 2156pb que podría corresponder a una sección del posible promotor de gen OsWus, hasta la fecha no se ha reportado el promotor de este gen en arroz por lo que podría servir para posteriores estudios funcionales.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

Altschul, Stephen T., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.

Cartharius K (2005). MatInspector: Analysing Promoters for Transcription Factor Binding Sites in "Analytical tools for DNA, genes and genomes: nuts & bolts", by Arseni Markoff ed., The nuts & bolts series, DNA Press, 2005, ISBN 0-9748765-1-8.

Cheng L. R., Song D. Z., Bi L. L. and Yun K., T. (2001). A Rapid and Efficient DNA Miniprep suitable for Screening Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 379a-379e.

De Jager S. M. and Murray J. A. H. (1999). Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Molecular Biology*, 41, 295–299.

Dellaporta S., Wood L. J. and Hicks J. B. (1983). A plant DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reports*, 14, 19-21

Du H., Zhang L., Liu L., Tang X.F., Yang W. J., Wu Y. M., Huang Y. B. and Tang Y. X. (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Mosc)*, 74(1), 1-11.

Lammens T, Li J., Leone G and De veylder L. (2009). Atypical E2Fs : new players in the E2F transcription factor family. *Trends in Cell Biology*, 19(3), 111-118.

Laufs, P., Dockx, J., Kronenberger, J., and Traas, J. (1998). MGOUN1 and MGOUN2: Two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125, 1253–1260.

Laux, T., Mayer, K.F.X., Berger, J., and Jürgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122, 87–96.

Laux T. and Bäurle I. (2005). The Plant Cell. Regulation of WUSCHEL Transcription in the Stem Cell Niche of the *Arabidopsis* Shoot Meristem, 17, 2271-2280

Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G., and Laux, T. (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* 105, 805–814.

Lenhard, M., and Laux, T. (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development*, 130, 3163–3173.

Liebfried A., To P. C. J., Busch W., Stehling A., Kehle A., Demar M., Kieger J. J and Lohmann U. J. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438, 1172-1175.

Mckee T. and Mckee J. R.(2003). *Bioquímica La Base Molecular de la Vida*. Tercera edición. McGraw Hill. pp 636-658.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, 100, 635–644.

Watanabe, K., and Okada, K. (2003). Two discrete cis elements control the abaxial side-specific expression of the FILAMENTOUS FLOWER gene in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15, 2592–2602.

Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J. M., Heidstra R., Blilou I., Korthout H., Chatterjee J., Mariconti L., Grissem W. and Scheres B. (2005). The Retinoblastoma-Related Gene Regulates Stem Cell Maintenance in Arabidopsis Roots. *Cell*, 123, 1337–1349

Zhao, Y., Medrano, L., Ohashi, K., Fletcher, J.C., Yu, H., Sakai, H., and Meyerowitz, E.M. (2004). HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 2586–2600.

Vincze T., Posfai J. and Roberts R. J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688-3691.

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En cuanto a la filogenia del gen *Wus* en el que se seleccionaron dos secuencias (XP_474234 y BAE48303) como posible ortólogos, estas parecen ser el mismo gen, ya que están reportadas cada una en diferente banco de genes (Gene Bank o TIGR) pero al compararlas solo difieren por 6 aminoácidos en el extremo posterior al homeodominio.

El número de accesión de la secuencia que seleccionamos como el ortólogo del gen *Wus* en *O. sativa* es XP_474234, se localiza en el cromosoma 4 de *Oryza* a diferencia de su localización en *Arabidopsis* en el cromosoma 2. Esta secuencia pudimos observar en el alineamiento contiene un homeodominio similar al de *WUS* además de la secuencia consenso característica de los miembros de la familia *WOX*. De igual manera al analizar la secuencia del gen *OsWus* y los reportados en otras plantas como *Arabidopsis*, *Lycopersicum*, *Nicotiana*, *Zea mays*, *Antirrhinum* y *petunia*, pudimos obtener dos clados que separan claramente a los genes *Wus* pertenecientes a especies monocotiledóneas de los de las eudicotiledóneas, lo que nos sugiere que se ha dado una separación genética conocida como evolución filogenética a lo largo del tiempo que permitió esta separación de clados. Este tipo de evolución se produce por el aislamiento físico de las poblaciones debido a barreras geográficas tales como lagos, ríos o montañas, que actúan impidiendo el flujo genético en un primer paso. Para que luego, en un segundo paso, estas poblaciones aisladas sigan una evolución independiente y continúen divergiendo hasta ser distintas. Requiere que la población sea separada, es decir, el flujo génico debe ser interrumpido. Esto es un prerrequisito para el desarrollo de las diferencias genéticas. Las diferencias genéticas aparecen por selección natural o por deriva génica y se verán reflejados por la presencia de nuevos alelos, cambios en la frecuencia alélica o la presencia de nuevos ajustes cromosomales. Eventualmente se alcanzará un punto donde las poblaciones tendrán suficientes diferencias para poder ser identificadas como diferentes. Esto explicaría el hecho de que los ortólogos del gen *Wus* identificados en *Zea mays* Nardmann *et al.*, (2006) al parecer se expresen solo en meristemas florales a diferencia de lo que reportan Laux *et al.*, (1996) en *arabidopsis*, en donde *WUS* se expresa en el meristemo vegetativo y solo al principio del meristemo floral y podría sugerir al mismo tiempo una diferente función para este gen en plantas monocotiledóneas.

En el caso de los genes *Wox*, localizamos en las secuencias obtenidas para *Wox*_{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,y 12} la secuencia correspondiente al homeodominio característico de unión a ADN y la caja consenso *WUS* reportada para en *arabidopsis* (Haecker *et al*, 2004).

La secuencia seleccionada como el Wox5 de *Oryza* NP915549 es idéntica a la reportada para este gen Wox por el grupo de Kamiya *et al.*, (2003). Por lo tanto nuestro estudio confirma los datos publicados anteriormente y en base al análisis funcional del promotor de OsWox5 realizado por Kamiya y a lo que reportan Haecker *et al.*, (1998) en *Arabidopsis*, observamos que la proteína codificada por el gen OsWox5 conserva su función en ambas especies de plantas. Por lo tanto para este caso en no ha existido una divergencia evolutiva que altere la genética de Wox5.

A diferencia de lo que reportaron para maíz por Nardmann *et al.*, (2006), en donde encuentra dos secuencias ortólogas para el Wox5 de *Zea mays*, lo que pudiera tratarse de una duplicación génica. En *Oryza* solo se obtuvo una secuencia para Wox5 lo que nos indica que no existe duplicación génica de este gen en arroz y que hay mayor divergencia para el caso de WOX5 entre *Arabidopsis* y *Zea mays* que con *Oryza*.

La secuencia seleccionada como el posible OsWox6 de *Oryza* NP915549 fue la misma que anteriormente se seleccionó como la correspondiente para OsWox5, así que basándonos en el reporte de Kamiya *et al.*, (2003) en donde además de proporcionar la secuencia realiza análisis funcionales para el promotor de este gen, obteniendo una función que correlaciona con la reportada para el Wox5 de *Arabidopsis* concluimos que la secuencia con el número de accesión NP915549 corresponde efectivamente a OsWox5.

Con el análisis filogenético realizado no se pudo obtener un ortólogo para Wox7 es que como reporta Nardmann *et al.*, (2006) para *Populus tomentosa* estos genes compartan la misma secuencia y que OsWox5 quizá cumpla funciones similares a las del Wox7 de *Arabidopsis*, además de lo reportado por Kamiya *et al.*, (2003) en donde OsWox5 se expresa en la zona donde se localiza el meristemo de la raíz y al parecer su función es la de mantener las células pluripotenciales de este meristemo.

La secuencia obtenida para Wox8 no ha sido reportada hasta el momento como perteneciente a la familia Wox en *Oryza*, por lo que nuestro estudio aporta el conocimiento de esta secuencia como posible OsWox8. Además se localizaron en la misma el homeodominio y la caja consenso WUS lo que nos indica que forma parte de la familia de los genes OsWox.

En *Arabidopsis* existe reportado un gen Wox9, a diferencia de lo que reporta Nardman en el 2006 en donde se obtuvieron dos secuencias ortólogas para Wox9 en *Oryza*, el OsWox9A. el OsWox9C. En este mismo reporte del 2006 se sugiere que para *Zea mays* existen tres secuencias ortólogas de Wox9 ZmWox9A, ZmWox9B y ZmWox9C.

Nuestros resultados nos indican que la secuencia con el número de accesión AAT77402 la seleccionamos con anterioridad como posible WOX8 y que esta es secuencia y la que posee el número de accesión NP1102824 están filogenéticamente relacionadas con el homeodominio de OsWox9C reportado por Nardman *et al.*, (2006). Por lo que se requiere un análisis

filogenético basado en alineamientos manuales para poder determinar cual de estas secuencias pertenece a OsWox8 y cual a OsWox9C.

La secuencia NP1110182 contiene un homeodominio idéntico al OsWox9A reportado por Nardmann *et al.*, (2006), por lo que nuestro estudio aporta la secuencia completa del posible OsWox9A.

Además proponemos la existencia de otra secuencia ortóloga a Wox9, el OsWox9B, ya que existen varias secuencias relacionadas al Wox9 de *Arabidopsis* y que podemos observar en los árboles filogenéticos correspondientes a este gen que quedan en clados diferentes a los de OsWox9A y C, esto basados en el reporte de Nardmann *et al.*, (2006) en el que para el caso de maíz existen tres ortólogos (ZmWox9A, ZmWox9B y ZmWox9C) y que al igual que arroz es una monocotiledónea.

La secuencia seleccionada como el Wox10 de *Oryza* BAE73349 no ha sido reportada como perteneciente a la familia de los genes Wox en *O. sativa* por lo que nuestro estudio aporta el ortólogo de gen Wox10 y sugerimos que en base a esta secuencia es posible obtener el Wox10 de *Zea mays*.

La secuencia seleccionada posee un homeodominio idéntico al que reportaron Nardmann *et al.*, (2006) como perteneciente a OsWox11/12. Esta se reporto de esa forma debido a que WOX11 y 12 están altamente emparentados y sus secuencias son similares por lo que es difícil concluir de cual de estos dos genes es ortólogo, solo por medio de análisis filogenético. Se requeriría un estudio de análisis funcional del promotor de la secuencia y una comparación con la función de Wox11 y 12 reportados en *Arabidopsis*.

La secuencia con el número de accesión BAF6545, seleccionada como el OsWox14 de *Oryza* es la misma que se obtuvo para OsWox13. Además de la secuencia mencionada obtuvimos tres secuencias más entre relacionadas de igual forma con WOX14 y cualquiera de ellas podría ser su ortólogo, por lo que sugerimos realizar análisis filogenéticos moleculares, basados en alineamientos manuales para poder determinar esto con mayor precisión.

La amplificación parcial del posible promotor de OsWox abre el camino para estudios sobre funcionalidad del mismo y de la función del gen como los realizados por Baurle and Laux, (2005) para el promotor del gen Wuschel de *Arabidopsis*.

5.2 BIBLIOGRAFÍA

Bäurle I. and Laux T. (2005). Regulation of WUSCHEL Transcription in the Stem Cell Niche of the *Arabidopsis* Shoot Meristem, *The Plant Cell*, 17, 2271-2280.

Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. and Laux T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 657-668.

Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y. and Matsuoka M. (2003). Isolation and characterization of rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal*, 35, 429-441.

Nardmann J. and Werr W. (2006). The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of *WUS* orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 2492-2504.

CAPITULO VI

6.1 PERSPECTIVAS

- Clonar algunos o todos los miembros de la familia OsWox en base a los resultados del análisis filogenético ya que podrían utilizarse como sondas en ensayos de southern blot para determinar su numero de copias.
- Obtener el promotor completo del gen OsWus, principalmente con la secuencia de inicio de la traducción (ATG), para estudios posteriores de funcionalidad con el fin de determinar si la secuencia es funcional así como la mínima secuencia requerida para que pueda actuar como promotor.
- Diseñar plásmidos con el promotor completo de OsWus, esto serviría como base para posteriores estudios de mutación de la secuencia del promotor.
- Realizar mutaciones o deleciones del promotor OsWus para determinar la mínima secuencia necesaria para su función.
- Obtener y analizar plantas transformantes que posee el promotor de OsWus en *O. sativa* y otros modelos para comparar su función con las reportadas y como un potenciador de embriogénesis somática.

