

CAPÍTOL III

Estudi del patró d'expressió de la proteïna quinasa CK2 en diferents òrgans vegetals en desenvolupament, per hibridació *in situ*.

CAPÍTOL III:

Materials i mètodes

1. Obtenció del teixit vegetal

Els experiments d'hibridació *in situ* es van realitzar sobre la flor i la fulla d'*Arabidopsis thaliana* (ecotipus Columbia), i sobre l'arrel i el meristem apical de *Raphanus sativus*, ambdues espècies pertanyents a la família *Cruciferae*. El motiu del canvi d'espècie va ser el petit diàmetre de les arrels d'*Arabidopsis*, que les feia gairebé invisibles un cop incloses en la parafina.

1.1. Esterilització de les llavors d'*Arabidopsis thaliana* i de *Raphanus sativus*

En un tub estèril de 15 ml es rentaven les llavors amb 96% etanol durant 1 minut. S'eliminava l'etanol i es rentaven amb una barreja d'aigua destil·lada estèril i lleixiu comercial, en proporció 1.5:1, i una gota de Tween 20 per ml. Per a *Arabidopsis* es feien 3 rentats de 5 minuts, mentre que per a *Raphanus* calia allargar els rentats a 10 minuts cadascun. A continuació, s'esvandien les llavors amb 5 rentats amb aigua destil·lada estèril, de 5 minuts cadascun.

Les llavors, un cop esterilitzades, es deixaven a 4°C durant 24 hores per a produir un efecte de vernalització.

1.2 Germinació i creixement d'*Arabidopsis thaliana* en terra. Recol·lecció del material.

El suport de creixement es composava de sorra fina i terra (substrat hortícola de tipus 3), en proporció 1:2, que s'havia humitejat i distribuït en safates. Les llavors esterilitzades es barrejaven amb 0.1% bactoagar i es sembraven amb l'ajut d'una pipeta Pasteur. Les plantes es cultivaven a 22°C amb un fotoperíode de 8 hores de foscor i 16 hores de llum. En 4 o 5 dies les llavors germinaven i les primeres flors apareixien en 30 dies.

Per a l'obtenció de les fulles, es recollien concretament de cada planta únicament la tercera i quarta fulla en ordre d'aparició cronològica, abans que s'entrés a la fase de desenvolupament floral, aproximadament 15 dies després de la germinació. Les fulles es tallaven pel peciol i s'introduïen directament en la solució de fixació. Per a l'obtenció de les flors, es deixava que les plantes creixessin durant 1 mes. Les inflorescències es tallaven per la tija i s'introduïen directament en la solució de fixació.

1.3. Germinació i creixement de *Raphanus sativus* en medi líquid. Inducció de la formació d'arrels laterals.

El medi de cultiu líquid tenia la següent composició: per a 1 litre, 4.3 g de medi MS (Murashige and Skoog Salt Mixture, Duchefa), 10 g de sacarosa, 100 mg de mioinositol, 0.5 mg d'àcid nicotínic, 0.5 mg de piridoxina i 0.1 mg de tiamina, pH 5.8 ajustat amb KOH. Les llavors esterilitzades es dipositaven en una placa de Petri amb 15 ml de medi de cultiu líquid, i s'incubaven a 25-27°C a la foscor. Les llavors germinaven en un dia i l'arrel es desenvolupava molt ràpidament, aproximadament amb 4 dies es podia tallar i fixar.

Per a la inducció d'arrels laterals, l'arrel principal es tallava i s'incubava en medi de cultiu en presència d'auxina, 10 µM àcid indolacètic (IAA), durant 24-48 hores.

2. PREPARACIÓ DEL TEIXIT: FIXACIÓ I INCLUSIÓ EN PARAFINA

La fixació del material vegetal per a la hibridació *in situ* tenia com a objectiu la preservació de la morfologia del teixit i la retenció de les molècules de RNA a la mateixa posició que tenien *in vivo*. La determinació de les condicions de fixació és un procés empíric que depèn de les característiques estructurals pròpies de cada teixit. Principalment, les flors estan constituïdes per cèl.lules petites i poc vacuolades, mentre que les fulles i sobretot les arrels contenen cèl.lules grans i molt vacuolades, la qual cosa provoca que el contingut citoplasmàtic s'acumuli al voltant de la membrana citoplasmàtica.

2.1. Fixació del teixit

S'introduïen les peces per fixar en un vial de vidre que contenia 10 ml de la solució de fixació: 50% etanol, 5% àcid acètic i 3.7% formaldehid, en aigua. Per a la fixació de les flors, el vial es col.locaven sota buit molt suau, durant 1 hora. Es tancava el buit i s'incubava durant 2 hores en el mateix fixador. A continuació, es connectava el buit durant 15 minuts més i es tornava a incubar sense buit durant 1 hora. En total, la fixació es prolongava durant 4.5 hores. L'aplicació del buit tenia per objectiu facilitar la sortida de l'aire contingut en el teixit, afavorint alhora l'entrada del fixador.

Les fulles i les arrels es fixaven en la mateixa solució, però no s'hi aplicava el buit sinó que únicament s'incubava durant 1 hora a temperatura ambient, es canviava la solució i s'incubava durant la nit a 4°C.

2.2. Inclusió de les mostres en parafina

Un cop fixats, els teixits es deshidrataven progressivament a través d'una sèrie d'etanol a diferents concentracions: 50%, 60%, 70%, 90% i 100%. S'incubava durant 30 minuts a cada concentració i es deixava durant la nit en 100% etanol. Es descartava la solució de la nit i es feia encara una altra incubació en 100% etanol durant 1 hora.

A continuació, calia substituir l'etanol per xilol, car la parafina, el medi d'inclusió emprat, no és soluble en etanol. Es realitzaven incubacions de 30 minuts en una sèrie progressiva de xilol diluït en etanol: 25%xilol:75%etanol, 50%xilol:50%etanol, 75%xilol:25%etanol i, per últim, tres incubacions de 1 hora en 100%xilol. Es descartava totalment l'última solució i s'afegien exactament 10 ml de xilol a cada vial.

La inclusió del teixit fixat en parafina (Paraplast Plus, Sigma) era una etapa lenta, que es prolongava durant gairebé una setmana. S'afegien 20 lleties de parafina sòlida a cada vial i es deixava durant la nit a temperatura ambient, per tal que lentament la parafina s'anés desfent en el xilol. L'endemà s'incubava a 42°C durant 1 hora. S'afegia parafina fosa a 60°C fins a omplir les $\frac{3}{4}$ parts del vial i s'incubava a 42°C durant 4 hores més. Durant aquests etapes s'agitaven els vials ocasionalment per afavorir la mescla de la parafina en el xilol. A continuació, es descartava aquesta mescla, s'afegia parafina fosa i s'incubava a 60°C durant un mínim de 4 hores. Es repetia aquesta incubació 6 vegades, descartant cada vegada la parafina.

Finalment, es construïen els blocs de parafina que contenien el teixit inclòs. Es preparaven uns motlles de paper satinat que es col·locaven sobre una placa calefactora a 60°C. S'abocaven la parafina i el teixit dins el motlle i amb l'ajuda d'un punxó s'orientaven les mostres de forma regular. S'apagava la placa calefactora i es deixava que el bloc s'anés refredant i, per tant, solidificant. Els blocs podien conservar-se a 4°C, fins al seu ús.

3. OBTENCIÓ DE SECCIONS DE LES MOSTRES INCLOSES EN PARAFINA

3.1. Preparació dels portaobjectes

Es submergien els portaobjectes en mescla cròmica durant la nit i l'endemà es rentaven amb aigua destil·lada fins eliminar-ne completament les restes. Durant tots els tractaments de l'experiment d'hibridació *in situ* era necessari que les seccions de teixit es mantinguessin adherides als portaobjectes. Per això, era recomenable tractar-los amb poli-L-Lisina d'alt pes molecular que generava una superfície adhesiva en el portaobjectes. Amb l'ajut d'una pipeta Pasteur es repartien homogèniament 8 µl d'una solució 1mg/ml poli-L-Lisina per la superfície dels portaobjectes i es deixaven secar sobre la placa calefactora a 42°C.

3.2. Tall de les mostres incloses en parafina. Ús del microtom.

El bloc de parafina conservat a 4°C es deixava atemperar a temperatura ambient. Amb una fulla d'afeitar s'eliminava l'excés de parafina i es perfilava el bloc per tal que quedés en forma trapezoidal. La base major del trapezi es fixava amb parafina fosa sobre un motlle adaptable al microtom, mentre que la base menor constituïa la zona de tall. Es col·locava el bloc en el microtom (model RM 2045, Leica) procurant que les peces de teixit quedessin orientades respecte la ganiveta i es tallaven les seccions, de 8 µm de gruix. Les tires de parafina es col·locaven en un bany histològic d'aigua a 42°C fins que quedaven completament estirades. Es recollien amb un portaobjectes tractat amb poli-L-Lisina i es deixaven secar sobre la placa calefactora a 37°C durant la nit.

Les seccions podien conservar-se a 4°C protegides de la humitat, si bé era preferible processar-les tot seguit.

4. PRE-TRACTAMENT DE LES SECCIONS DE TEIXIT

El pre-tractament de les mostres tenia com a objectiu eliminar la parafina del teixit seccionat i preparar-lo per a la hibridació, mantenint intacte el contingut citoplasmàtic i incrementant l'accessibilitat al RNA diana. Totes les solucions i les manipulacions es van realitzar tenint en compte les recomanacions per a treballar en un ambient lliure de RNAses (Maniatis, 1982). El pre-tractament constava de les següents etapes:

- Es desparafinaven les seccions per incubació en xilol 2 vegades durant 10 minuts. S'incubava en una solució al 50% de xilol en etanol durant 5 minuts i, a continuació, s'hidrataven les seccions a través d'una sèrie de dilucions d'etanol a concentracions decreixents (100%, 90%, 70%, 50% i 30% etanol en aigua, 2 minuts cada dilució). Finalment, es feien 2 rentats de 5 minuts amb aigua.
- S'incubava en 0.2 M HCl durant 20 minuts. Aquesta etapa bloquejava les càrregues positives remanents de la poli-L-Lisina. Es feien 2 rentats de 5 minuts amb aigua.
- Es transferia a una solució de 2 X SSC (20 x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M citrat sòdic), durant 10 minuts i, a continuació, es rentava amb aigua durant 5 minuts.
- Es secava l'excés d'aigua i s'incubava a 37°C durant 15 minuts en una solució preescalfada de 1 µg/ml proteïnasa K en 100 mM TrisCl pH 8.0, 50 mM EDTA. La desproteïnitació tenia com a finalitat aconseguir maximitzar el senyal d'hibridació sense perdre l'estructura morfològica del teixit.
- Es submergia breument en 1 x PBS (10 x PBS: 1.3 M NaCl, 0.07 M Na₂HPO₄, 0.03 M NaH₂PO₄), durant 2 minuts i s'inhibien les proteases amb 2 mg/ml glicina en 1 x PBS durant 2 minuts. Seguidament, es feien 2 rentats amb 1 x PBS de 1 minut.
- Sota la campana de gasos es tornava a fixar el teixit amb 4% formaldehid en 1 x PBS durant 20 minuts. A continuació, es feien 2 rentats de 2 minuts amb 1 x PBS.
- Per últim, es deshidrataven les seccions a través d'una sèrie d'etanols a concentracions creixents (30%, 50%, 70% i 90% etanol en aigua), seguit de 2 incubacions de 5 minuts en 100% etanol. Es deixaven secar a temperatura ambient i es procedia a hibridar-los amb la sonda corresponent.

5. PREPARACIÓ DE LES SONDES. HIBRIDACIÓ.

Per als experiments d'hibridació *in situ* les sondes de RNA o ribosondes són preferibles per dos motius: en primer lloc, la digestió amb RNAsa després de la hibridació elimina la sonda que no ha estat hibridada, sense afectar els híbrids formats; i, en segon lloc, els híbrids RNA-RNA tenen una estabilitat més alta que els híbrids RNA-DNA, de manera que és possible realitzar rentats a una estringència superior i, per tant, disminuir significativament el soroll de fons inespecífic.

En la realització d'aquests experiments, es van utilitzar ribosondes marcades per mètodes no radioactius, concretament amb digoxigenina (DIG). La detecció dels híbrids es va fer per mètodes colorimètrics, mitjançant un anticòs antiDIG conjugat a la fosfatasa alcalina.

5.1. Síntesi de les ribosondes

Les ribosondes es sintetitzaven mitjançant reaccions de transcripció *in vitro*, per acció de RNA polimerases a partir de DNA motlle clonat en vectors que contenien els promotors T7 i T3, i que prèviament s'havien linearitzat amb els enzims de restricció apropiats per a obtenir els trànscripts *antisense* i *sense*. En concret, es van utilitzar els cDNAs ATCKA1 i CKB1, d'*Arabidopsis*, que havien estat clonats en pBluescript i que foren cedits pels Drs. K. Shinozaki (Tsukuba, Japan) i J. C. Walker (Columbia, Missouri, USA), respectivament.

La reacció de transcripció *in vitro* es feia en presència dels quatre ribonucleòtids, un dels quals es trobava marcat amb digoxigenina. La reacció de transcripció tenia la següent composició:

- 1 µg de DNA motlle linearitzat
- 4 µl de tampó de transcripció T3/T7 (5x): 0.2 M TrisCl pH 8.0, 40 mM MgCl₂, 10 mM espermidina, 125 mM NaCl (GibcoBRL)
- 2 µl de DIG RNA Labeling Mix (10x): 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-UTP, pH 7.5 (Roche)
- 1 µl de 40U/µl RNASEOUT™, Recombinant Ribonuclease Inhibitor (GibcoBRL)
- 1 µl de 0.1 M DTT
- 1 µl de 50U/µl T7/T3 RNA polimerasa (GibcoBRL)

S'ajustaven les concentracions en un volum final de 20 µl. S'incubava a 37°C durant 1 hora, es tornava a afegir 1 µl de T3/T7 RNA polimerasa i s'incubava durant 1 hora més.

Un cop acabada la reacció de transcripció *in vitro* es feia una digestió amb DNAsa I:

- 20 µl de reacció de transcripció
- 5 µl de tampó de DNAsa (10x): 0.4 M TrisCl pH 7.5, 60 mM MgCl₂
- 2 µl de 40U/µl RNASEOUT™, Recombinant Ribonuclease Inhibitor (GibcoBRL)
- 4 µl de 0.1 M DTT
- 0.5 µl 127U/µl Deoxyribonuclease I (GibcoBRL)

S'ajustava el volum a 50 µl i s'incubava a 37°C durant 15 minuts. La reacció s'aturava en afegir 2 µl de 0.2 M EDTA i refredant-la en gel. Es feia una extracció de la ribosonda en fenol/cloroform i es precipitava amb 2.5 M acetat amònic i 2.5 volums d'etanol en presència de tRNA com a *carrier* de la precipitació. Es redissolia el precipitat en 50 µl d'aigua.

A continuació, s'hidrolitzaven parcialment les ribosondes, mitjançant digestió alcalina en tampó carbonat, per tal d'obtenir unes longituds mitjanes de 150 a 200 pb. La durada de la reacció d'hidròlisi era funció de la longitud inicial de la ribosonda (L_0) i de la longitud final (L_f) que es desitjava, i es podia calcular segons la fórmula: $t \text{ (min)} = L_0 - L_f / K \cdot L_0 \cdot L_f$, on $K = 0.11$ i $L_f = 0.2$. Als 50 µl de ribosonda s'afegien 30 µl de 0.2 M Na₂CO₃ i 20 µl de 0.2 M NaHCO₃, preparades de forma extemporània, i s'incubava a 60°C durant 39 minuts les ribosondes per a la CK2α, i durant 35 minuts les ribosondes per a la CK2β. La reacció s'aturava amb 3 µl de 3M acetat sòdic i 5 µl d'àcid acètic glacial.

La sonda hidrolitzada es precipitava amb 2.5 M acetat amònic i 2.5 volums d'etanol en presència de tRNA com a *carrier* de la precipitació. Es redissolia el precipitat en 100 µl d'aigua.

5.2. Hibridació i rentats

La solució d'hibridació tenia la següent composició final: 100 µl ribosonda, 50% formamida, 4 x SSC, 2% SDS, 150 µg/ml tRNA i 0.5 mg/ml polyA⁺, en un volum final de 2 ml. Es dipositaven 100 µl de la solució d'hibridació sobre cada un dels portaobjectes i es cobrien amb un cobreobjectes. La hibridació tenia lloc durant 16 hores a 55°C en una cambra humida.

Un cop acabada la hibridació, es retiraven el cobreobjectes submergint les preparacions en una solució de 1 x SSC, 0.1% SDS a temperatura ambient. Es feia un rentat de 10 minuts

en la mateixa solució i, a continuació, es feien 2 rentats de 30 minuts cadascun a 55°C amb una solució de 0.2 x SSC, 0.1% SDS.

Es transferia a una solució de 2 x SSC durant 2 minuts i s'incubava durant 30 minuts a 37°C en una solució preescalfada de 10 µg/ml RNAsaA en 2 x SSC. Es tornava a rentar en 2 x SSC durant 2 minuts. La RNAsaA digeriria la sonda de cadena senzilla que no havia estat hibridada i disminuïa, per tant, el soroll de fons.

6. DETECCIÓ DELS HÍBRIDS

La detecció es realitzava mitjançant el reconeixement immunològic de les molècules de digoxigenina per part d'un anticòs conjugat a la fosfatasa alcalina, que en presència dels substrats NBT (nitrobluetetrazolium) i BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) donava lloc a productes blaus.

En primer lloc, s'equilibraven les seccions en TBS (100 mM TrisCl pH 7.5, 400 mM NaCl), durant 5 minuts i s'incubaven en solució bloquejadora (0.5% blocking reagent, de Roche, en TBS) durant 1 hora. Es rentaven 2 vegades en TBS durant 1 minut. A continuació, s'incubaven durant 3 hores amb l'anticòs anti-digoxigenina (Anti-Digoxigenin-AP, Roche) diluït 1:1000 en 0.5% BSA fracció V (w/v) en TBS. Posteriorment, es feien 3 rentats de 30 minuts amb TBS.

S'equilibraven les seccions en tampó de detecció (100 mM TrisCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂), durant 5 minuts. Es dipositaven 150 µl de solució de substrats (45 µl de 75 mg/ml NBT i 35 µl de 50 mg/ml BCIP en 10 ml de tampó de detecció) i es deixava que el color es desenvolupés, protegit de la llum, normalment durant unes 20 hores. La reacció colorimètrica s'aturava rentant les seccions amb aigua.

Les seccions es deshidrataven a través d'una sèrie d'etanols a concentració creixent (30%, 50%, 70%, 90% i 100% etanol en aigua) i es muntaven definitivament en medi de muntatge Entellan (Merck).

CAPÍTOL III:

Resultats

A les condicions experimentals utilitzades en els experiments d'hibridació *in situ*, no era possible distingir l'expressió específica de cada un dels gens que codifiquen per a les subunitats de la CK2. Els resultats que es presenten en aquest apartat mostren l'expressió global de tots els gens que codifiquen per a la subunitat corresponent de la CK2.

Seguidament, es descriuen els resultats que es van obtenir per a cada un dels òrgans vegetals estudiats.

1. HIBRIDACIÓ *IN SITU* SOBRE SECCIONS DE MERISTEM APICAL VEGETATIU DE *RAPHANUS SATIVUS*.

El meristem apical vegetatiu de les plantes etiolades, en aquest cas de rave, es caracteritza per la impossibilitat de desenvolupar primordis foliars i d'avançar en el desenvolupament del teixit vascular i dels òrgans aeris, a conseqüència del seu creixement en absència de llum. No obstant, el meristem apical és, durant els primers dies de creixement, un òrgan en activa divisió cel.lular, com ho demostra el gran nombre de plans de divisió que s'observen en talls longitudinals (Fig 1, B i D). A més, manté la capacitat de generar i organitzar els teixits aeris en cas que es produeixi l'estímul lumínic.

En un tall longitudinal, pot observar-se la morfologia de les cèl.lules que formen el meristem: són petites, gairebé isodiamètriques i es caracteritzen per tenir una relació de contingut nucli:citoplasma alta i poca vacuolació, en contrast amb les cèl.lules properes de l'arrel i l'hipocotil. A la part més superficial de l'àpex, es distribueixen de forma estratificada en dues capes de cèl.lules clòniques, anomenades L1 i L2, i en conjunt túnica, les quals es divideixen seguint plans anticlinals, és a dir, perpendiculars a la superfície extena. A més, en presència de llum, les cèl.lules L2 poden dividir-se periclinalment per a formar els primordis foliars. Més internament, la resta de cèl.lules del meristem, les cèl.lules L3 o corpus, es divideixen seguint plans tan anticlinals com periclinals, i presenten diferent grau de divisió cel.lular en funció de la seva posició en el meristem, el qual és determinant del teixit que formaran (Meyerowitz, 1997). Aquest nivell d'organització del corpus, però, no s'assoleix en plantes etiolades i per tant no es pot percebre en els resultats que es presenten.

L'estudi per hibridació *in situ* de l'expressió de les subunitats de la CK2 en el meristem apical vegetatiu, revela que els transcrits són presents en abundància a totes les cèl.lules del meristem, en comparació amb l'hipocotil i amb la zona més proximal de l'arrel, on hi són absents (Fig 1, A i C). El senyal és especialment fort, però, en aquelles cèl.lules que han assolit recentment la divisió, la qual cosa fa pensar que l'estabilitat dels transcrits perdura més enllà de la mitosi i es manté a uns nivells detectables per la tècnica mentre la cèl.lula mantingui la capacitat per dividir-se. En alguna d'elles, es pot veure que el material genètic dels dos nuclis originats es troba encara en contacte, malgrat s'ha assolit ja la citocinesi (Fig 1, B i D).

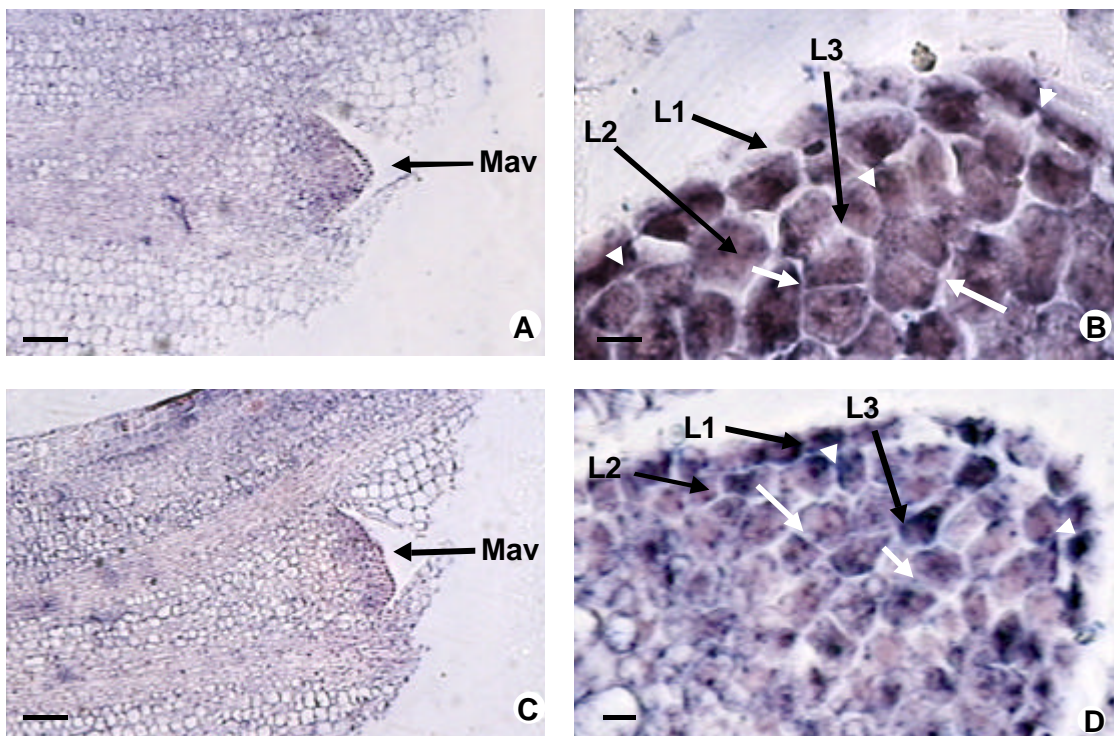


Fig 1: Expressió de les subunitats a i b de la CK2 en el meristem apical vegetatiu de *Raphanus sativus*. A i B, hibridació amb la sonda antisentit per a la CK2a. C i D, hibridació amb la sonda antisentit per a la CK2b. Mav, meristem apical vegetatiu; L1, L2, L3, representen l'organització cel.lular en estrats. A B i D, les puntes de fletxa indiquen divisions anticlinals i les fletxes divisions periclinals. La hibridació amb la sonda sense per a les dues subunitats no va donar senyal. La barra negra correspon a 500 μm a A i C, i a 50 μm a B i D.

2. HIBRIDACIÓ *IN SITU* SOBRE SECCIONS DE FLORS D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

La flor d'*Arabidopsis* és considerada un model molt apropiat per a l'estudi de l'expressió gènica durant el desenvolupament, atès que es coneix molt bé el patró d'aparició i organització dels diferents òrgans florals. A través de l'observació de la morfologia de la flor per microscòpia electrònica d'escannatge, des de l'aparició del meristem floral i fins a la flor oberta, s'han establert 12 estadis de desenvolupament, que es resumeixen a continuació (Smyth, 1990; Drews, 1991):

Estadi	Descripció
1	El botó floral apareix en el meristem apical.
2	Es forma el primordi floral.
3	Els primordis dels sèpals apareixen als costats del primordi floral
4	Els sèpals s'allarguen sense cobrir el meristem floral.
5	Apareixen els primordis dels pètals i els estams.
6	Els sèpals cobreixen el meristem floral i els estams s'allarguen. Apareix el primordi del gineceu.
7	El gineceu comença a diferenciar-se i forma un cilindre.
8	Apareixen els lòculs dels estams i els pètals creixen.
9	El cilindre del gineceu s'estreny i es constreu per la punta. Apareixen els primordis dels òvuls.
10	El cilindre del gineceu es tanca per la punta. S'allarguen els primordis dels òvuls.
11	El gineceu desenvolupa les papil·les de l'estigma. Apareixen els integuments interior i exterior dels òvuls.
12	Els pètals assoleixen la mida dels estams. L'integument exterior cobreix l'òvul.

La fase reproductiva comença quan el meristem apical vegetatiu es transforma en meristem de la inflorescència. En base a característiques citològiques i de freqüència mitòtica, el meristem de la inflorescència pot dividir-se en tres regions: la zona central, situada a l'àpex, on les divisions són infreqüents; la zona perifèrica, als laterals de la zona central, on les divisions són ràpides i freqüents; i el meristem profund (*rib meristem*), on les divisions són també ràpides i freqüents (Fig 2, a). Els primordis florals es formen a partir de divisions periclinals del grup de cèl·lules L3 de la zona perifèrica del meristem de la

inflorescència (estadi 1 i 2 de desenvolupament). A l'estadi 3, l'apex del meristem floral es troba estratificat en les capes L1 i L2, i més a l'interior, les divisions periclinals de les cèl·lules L3 situades a la zona perifèrica provoquen l'aparició dels primordis dels sèpals.

Els òrgans de la flor d'*Arabidopsis* s'organitzen en 4 verticils concèntrics, que apareixen seqüencialment a partir del primordi floral, i que contenen en la flor madura, i de fora cap a dins, 4 sèpals lliures, 4 pètals alternant els sèpals, 4 estams centrals i 2 estams laterals i, finalment, el gineceu format per 2 carpels separats per un fals septe, amb els òvuls al seu interior. Es mostra un esquema d'aquesta distribució a la Fig 2, b.

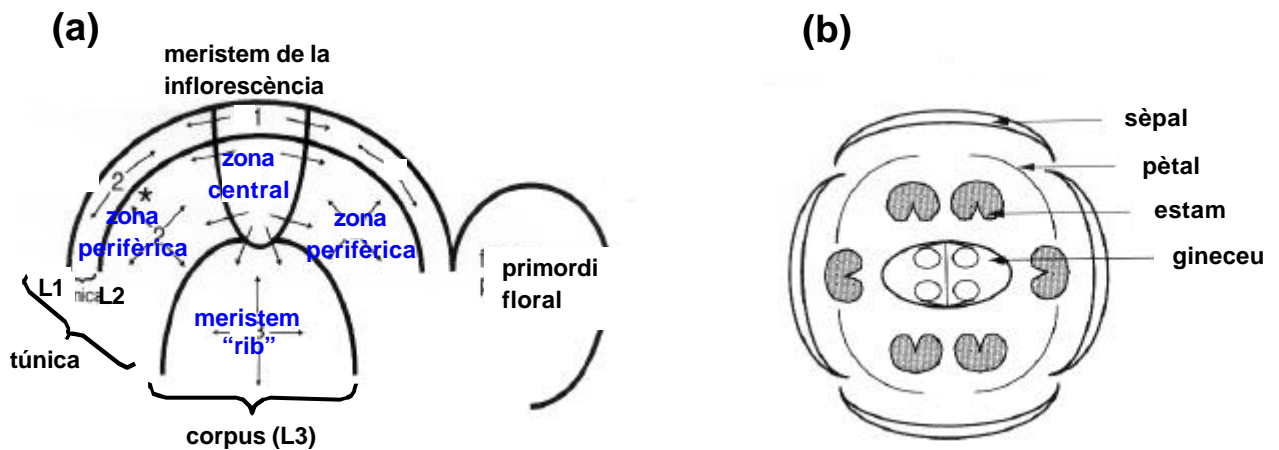


Fig 2: (a) Estructura del meristem de la inflorescència. S'indiquen en blau les tres regions del meristem. Les fletxes indiquen els plànols de divisió cel·lular més freqüents per a cada regió. **(b) Diagrama de la flor madura d'*Arabidopsis*.**

Els quatre primordis dels pètals i els sis primordis dels estams s'inicien quasi simultàniament a l'estadi 5, mentre que la resta del meristem floral, situat a l'interior, donarà lloc al primordi del gineceu a l'estadi 6. Les identitats de cada un dels primordis de l'òrgan floral es determinen d'acord amb la seva posició en la flor, que segueix un programa de desenvolupament específic per a donar lloc a diferents tipus cel·lulars. Per exemple, hi ha signes visibles de diferenciació a l'estadi 7 en els estams i carpels, i en l'estadi 9 en els pètals. Els primordis dels òvuls apareixen a l'estadi 9 i a partir de l'estadi 11 es desenvolupen el sac embrionari i els integuments que recobreixen els òvuls.

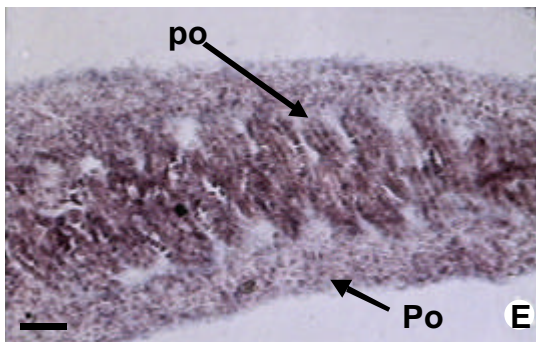
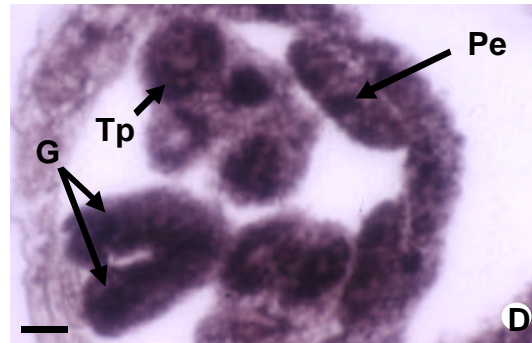
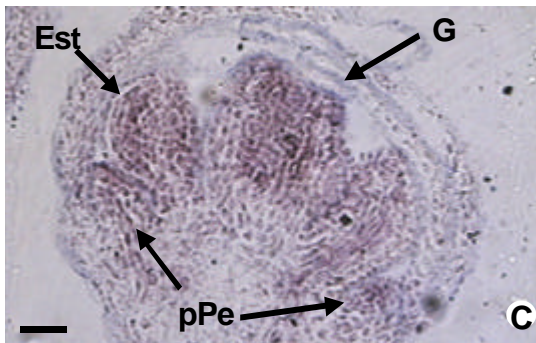
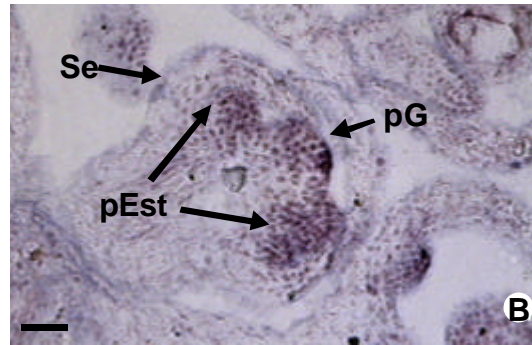
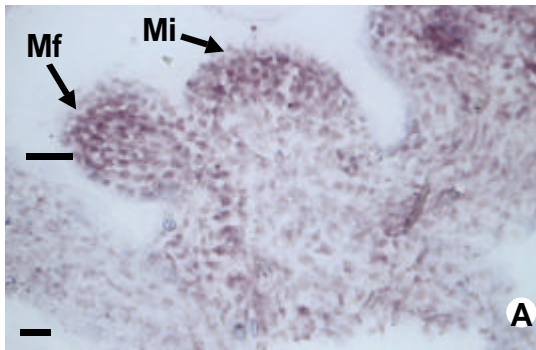
En analitzar els resultats de l'expressió de les dues subunitats de la CK2 a la flor d'*Arabidopsis*, s'observen patrons d'hibridació similars al llarg del desenvolupament, la qual cosa suggereix que la seva expressió podria estar coordinada. Globalment, s'observa una activació de l'expressió, durant l'aparició del primordi de la flor (Fig 3, A; Fig 4, A i B), i posteriorment durant l'aparició dels diferents primordis que configuraran l'òrgan floral. Així, es detecta expressió en els primordis dels estams (Fig 3, B; Fig 4, C), en els primordis dels pètals (Fig 3, C; Fig 4, C), en el primordi del gineceu (Fig 3, B; Fig 4, C), i en els primordis dels òvuls (Fig 3, E; Fig 4 E).

En els sèpals, l'expressió desapareix progressivament a partir del moment que recobreix el meristem floral (Fig 4, B), i esdevé finalment nul·la (Fig 3, F; Fig 4, G). En els pètals, en canvi, l'expressió es manté alta durant tot el desenvolupament i, fins i tot, en la flor madura (Fig 3, C, D, F i J; Fig 4, G).

Pel que fa als estams, l'expressió és alta en els lòculs de les anteres mentre aquestes s'estan formant, si bé desapareix completament a partir de la seva maduració, quan estan preparades funcionalment per a la dehiscència (Fig 3, D, F i J; Fig 4, D, F i G). Un patró similar s'observa en el tapètum, la capa de cèl·lules de les anteres amb funció nutritiva (Fig 3, (D); Fig 4 (F)).

En alguns tipus cel·lulars especialitzats, l'expressió perdura en la flor madura, com en els òvuls, els integuments dels òvuls i la paret de l'ovari (Fig 3, G-J; Fig 4, G-I). L'expressió de la CK2 en la flor, analitzada per *Northern blot*, mostrava aquest és l'òrgan d'*Arabidopsis* on l'expressió és més alta (Mizoguchi, 1993; Espunya, 1997).

Per últim, la hibridació amb sondes sentit per a ambdues subunitats mostrava un senyal molt dèbil que podria considerar-se un lleuger soroll de fons (Fig 3, K; Fig 4, J). A vegades el tipus de llum que s'empra en el microscopi provoca en algunes cèl·lules un efecte de refringència que en les imatges impreses es pot confondre amb senyal d'hibridació, tot i que en el microscopi són perfectament distingibles. Alguns grans de pol·len de les imatges F, J i K de la Figura 3 i els lòculs de les anteres de la imatge F de la mateixa Figura, presenten la refringència. Observi's que el mateix efecte apareix també en les hibridacions de control amb la sonda sentit (Fig 3, K).



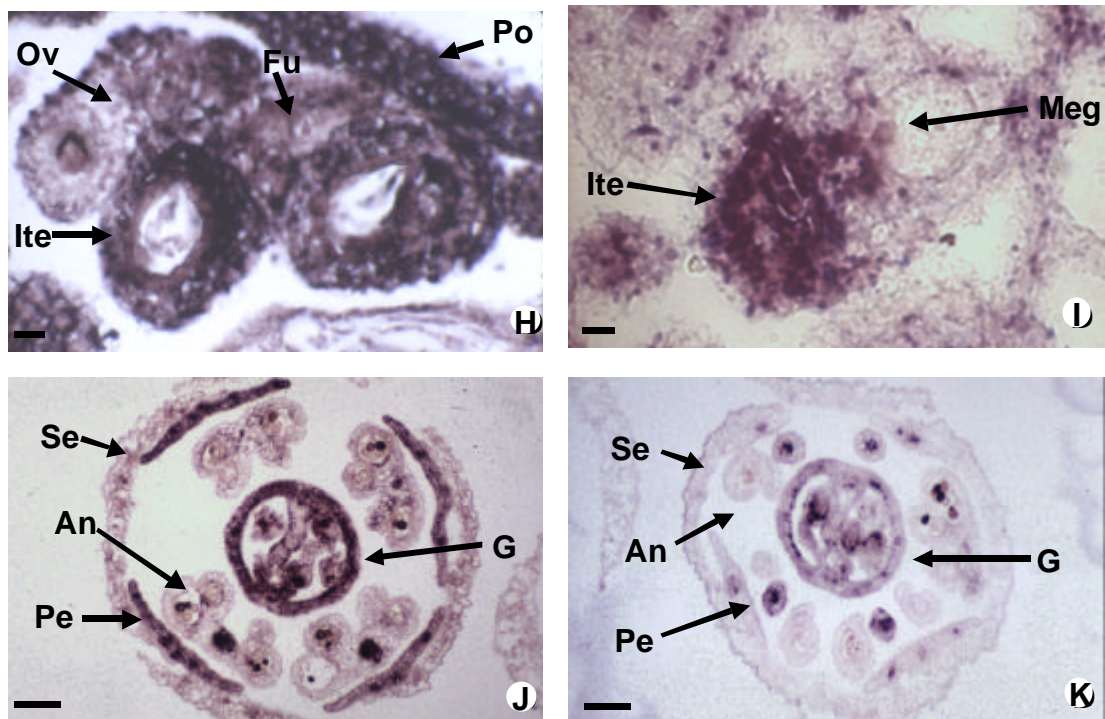
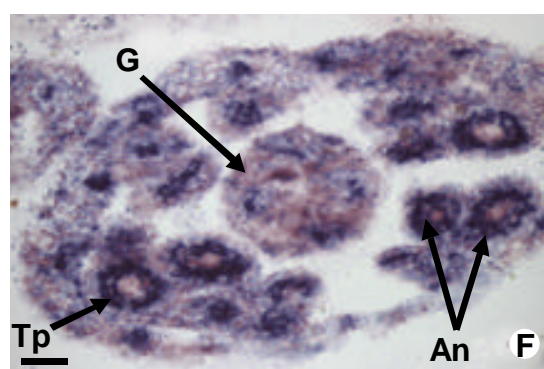
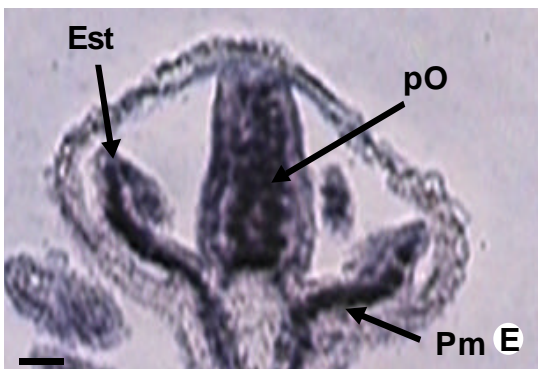
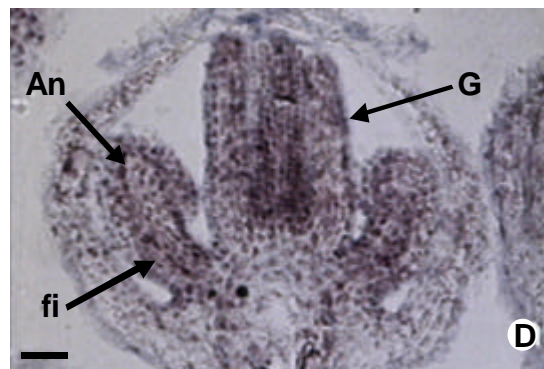
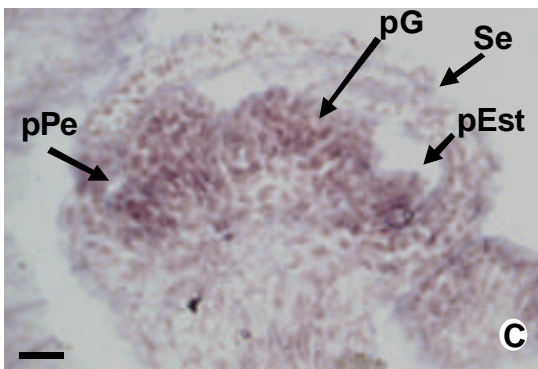
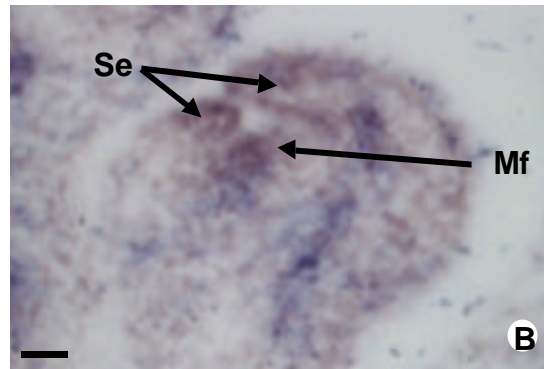
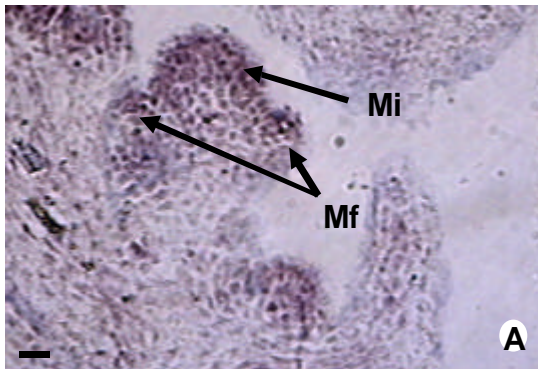


Fig 3 (pàg 98 i 99): Expressió de la subunitat CK2a en la flor d'Arabidopsis.

(A)-(J), hibridació amb la sonda antisentit sobre talls de flors en l'estadi 2 de desenvolupament (A), estadi 5-6 (B), estadi 7 (C), estadi 8 (D), estadi 10 (E), estadi 12 (F), i flor madura (G)-(J). (K), hibridació amb la sonda sentit sobre un tall transversal d'una flor madura. (D), (J) i (K) corresponen a talls transversals, mentre que la resta són talls longitudinals.

Les abreviatures utilitzades són les següents: An, antera; Esg, estigma; Esl, estil; Est, estam; Fu, funicle; G, gineceu; Ite, integument; La, lòcul de l'antera; Meg, megaspore; Mf, meristem floral; Mi, meristem de la inflorescència; Ov, ovari; Pe, pètal; pEst, primordi de l'estam; pG, primordi del gineceu; PO, paret de l'ovari; pO, primordi de l'òvul; pPe, primordi del pètal; Sc, septe central; Se, sèpal; Tp, tapètum.

La barra negra correspon a 500 μm a F, J i K, a 150 μm a C, D, E i G, i a 50 μm a A, H i I.



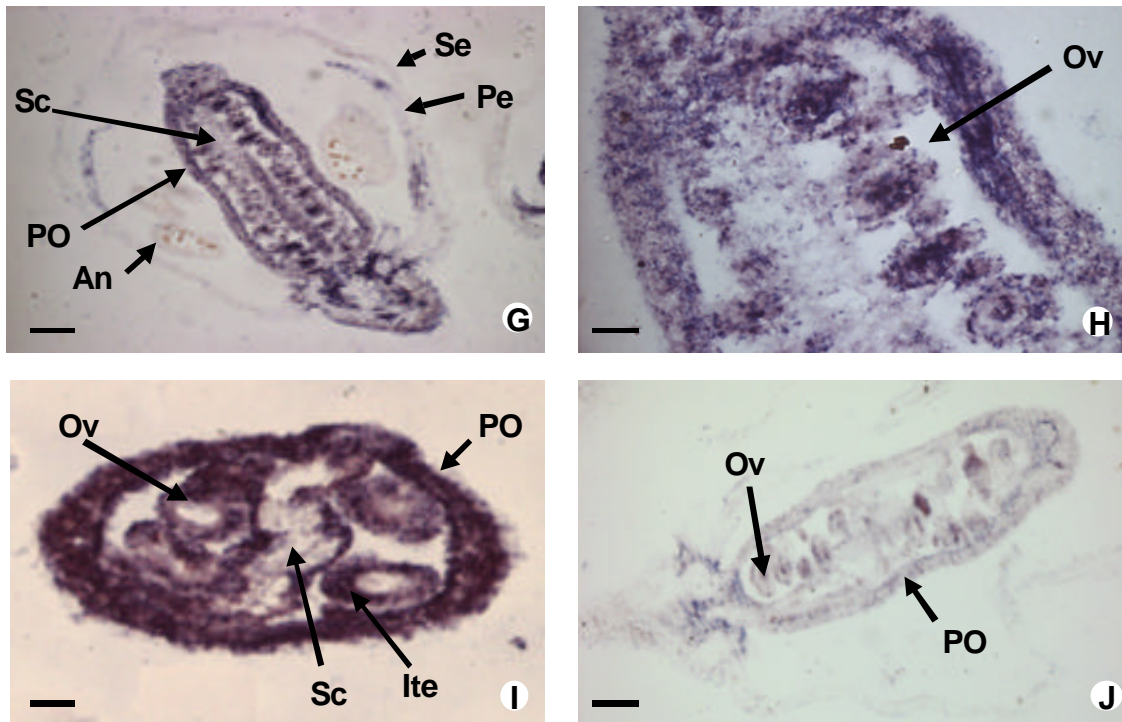


Fig 4 (pàg 100 i 101): Expressió de la subunitat CK2b en la flor d'Arabidopsis.

(A)-(I), hibridació amb la sonda antisentit sobre talls de flors en l'estadi 2 de desenvolupament (A), estadi 4 (B), estadi 7 (C), estadi 8 (D), estadi 9 (E) i (F) i estadi 11-12 (G)-(I). (F) i (I) corresponen a talls transversals, mentre que la resta són talls longitudinals. (J), hibridació amb la sonda sentit sobre un gineceu en estadi 11.

Les abreviatures utilitzades són les mateixes que en la Figura 3 i també: fi, filament.

La barra negra correspon a 500 μm a G i J, a 150 μm a C, D, E, F, H i I, i a 50 μm a A i B.

3. HIBRIDACIÓ *IN SITU* SOBRE SECCIONS D'ARREL DE *RAPHANUS SATIVUS*

Per a l'estudi de l'expressió de les subunitats α i β de la CK2 en l'arrel es va treballar amb la crucífera *Raphanus sativus*. Aquesta espècie té l'avantatge de disposar d'una arrel força més gruixuda que la d'*Arabidopsis*, la qual cosa facilitava enormement la seva manipulació i observació al microscopi.

A nivell anatòmic, es poden diferenciar a l'arrel madura tres regions, que es mostren a la Figura 5, a: la regió meristemàtica, la regió d'elongació i la regió de diferenciació. La zona meristemàtica comprèn el meristem apical de l'arrel i regions properes, on la freqüència de divisió cel.lular és alta, i que s'han esquematitzat en detall a la Fig 5, b. En la zona d'elongació, que es situa per sobre de la regió meristemàtica, les cèl.lules augmenten en longitud i col.laboren, per tant, en la penetració de l'arrel cap a l'interior del sòl. Aquesta regió ve seguida per la regió de diferenciació o de maduració, en la qual té lloc la diferenciació definitiva de tots els tipus cel.lulars, i es caracteritza per l'aparició de pèls a l'epidermis.

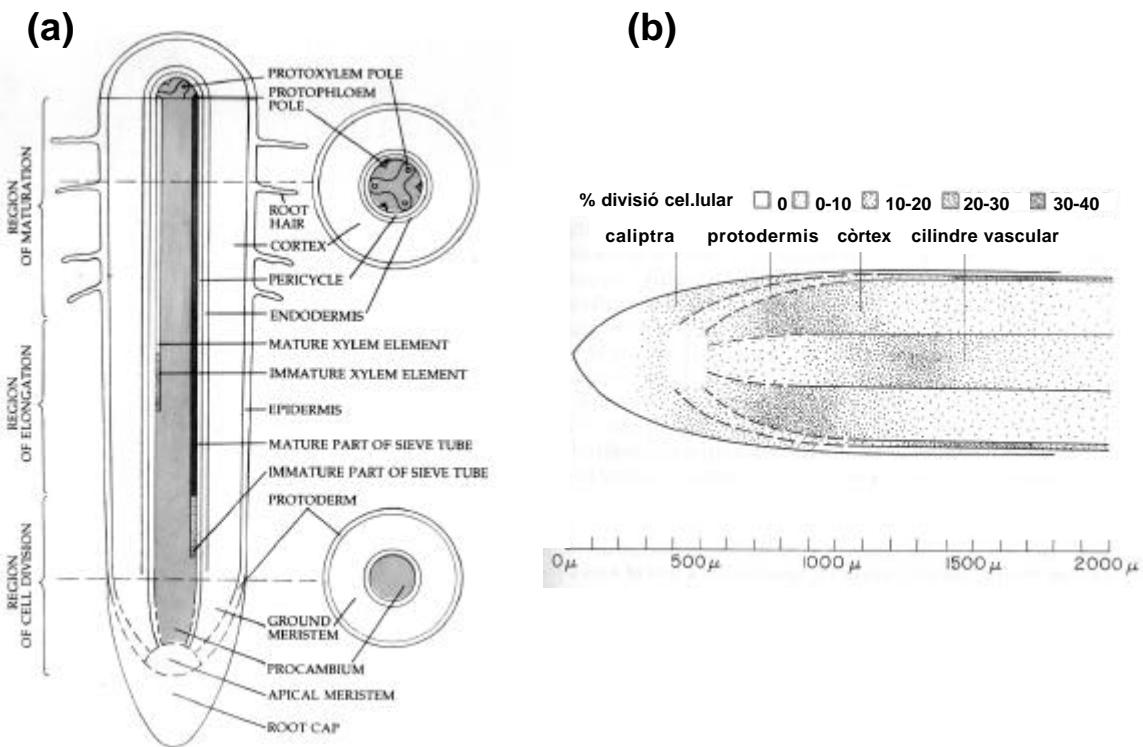


Fig 5 (pàgina anterior): (a) Esquema d'una arrel on es mostren els diferents tipus cel.lulars i la posició de les regions meristemàtica, d'elongació i de maduració. (b) Detall de les regions meristemàtiques i d'elongació d'una arrel, on s'indica el grau de divisió cel.lular.

A diferència del meristem apical vegetatiu de la tija, el meristem apical de l'arrel ocupa una posició subterminal, ja que es troba recobert per la caliptra, un conjunt de cèl.lules amb funció de resistència. A l'arrel de rave, la zona meristemàtica està formada per 3 capes de cèl.lules anomenades inicials, la divisió continuada de les quals origina els diferents tipus cel.lulars de l'arrel: la més apical dóna lloc a la caliptra i a l'epidermis, la capa intermitja, al còrtex i a l'endodermis, i la més interna, al sistema vascular i al pericicle.

La zona d'elongació és a la vegada una zona de divisió cel.lular i una zona d'expansió, si bé el balanç entre aquests dos processos varia al llarg de l'arrel, decantant-se a favor de la divisió en la proximitat de la zona meristemàtica. No obstant, ja és possible distingir-hi els tipus cel.lulars parcialment diferenciats (protodermis, còrtex i procàmbium) que donaran lloc als tres teixits principals de l'arrel madura (epidermis, còrtex i teixit vascular). També s'hi distingeix l'endodermis, la capa de cèl.lules que separa el còrtex del procàmbium. El procàmbium es troba en activa divisió cel.lular i no es diferenciarà a vasos funcionals de floema i xilema fins més endavant. Les cèl.lules del còrtex es vacuolitzen ràpidament i mostren plans de divisió periclinals i anticlinals que permeten el creixement de les arrels tant longitudinalment com en amplada.

A la part més distal de la regió d'elongació, la protodermis dóna lloc a l'epidermis. Les cèl.lules del còrtex es troben completament diferenciades i han aturat l'activitat mitòtica. En el cilindre vascular, s'hi distingeixen el pericicle, el parènquima estel.lar i els vasos conductors del floema i el xilema. El pericicle és una capa de cèl.lules adjacents a l'endodermis que, si bé ja s'han diferenciat, conserven l'aptitud per a dividir-se ja que són responsables de la formació d'arrels laterals i contribueixen a establir la guixudària de l'arrel. El parènquima estel.lar té funció de suport dels vasos conductors i subministra cèl.lules precursors als pols de maduració de floema i xilema.

El patró d'expressió dels gens de les dues subunitats de la CK2 a l'arrel és similar, tal com també s'observava durant el desenvolupament floral i en el meristem apical de la tija. En conjunt, l'expressió d'ambdues subunitats pot associar-se a tipus cel·lulars que es troben en activa divisió cel·lular i poc diferenciats, així com en cèl·lules que ja s'han diferenciat però que mantenen la seva aptitud per dividir-se. Les Figures 6 i 7 mostren diferents imatges de la hibridació *in situ* sobre talls transversals efectuats a les zones meristemàtica i d'elongació de l'arrel, i que es descriuen tot seguit.

A la zona meristemàtica, els transcrits d'ambdues subunitats són presents a totes les cèl·lules, que són morfològicament similars, de petit diàmetre i no vacuolades. Al seu voltant s'hi observen les cèl·lules madures que conformen la caliptra, i que tenen funció de suport i de resistència (Fig 6, A; Fig 7, A). El senyal que s'observa, possiblement correspon a les cèl·lules inicials i a les primeres cèl·lules derivades d'aquestes, que encara no han començat a diferenciar-se.

Per sobre de la zona meristemàtica, a l'inici de la zona d'elongació, el senyal d'hibridació es detecta a tots els tipus cel·lulars, però és especialment fort a la protodermis i a l'endodermis (Fig 6, B i C; Fig 7, B). En una visió en detall d'aquestes cèl·lules s'observa que el senyal d'hibridació a les cèl·lules del còrtex es concentra a prop de la membrana, pel fet que l'espai citoplasmàtic es troba densament vacuolitzat (Fig 6, C). A la protodermis el senyal es significativament més fort i s'observa a tot el citoplasma però principalment envoltant el nucli.

A la zona més distal de la regió d'elongació, la CK2 s'expressa únicament en el pericicle i el parènquima estel·lar, situats a l'interior del cilindre vascular (Fig 6, D; Fig 7, C). Ni en l'epidermis, derivada de la protodermis, ni en l'endodermis s'hi detecta senyal d'hibridació, i les cèl·lules del còrtex, totalment vacuolades i per tant diferenciades, han aturat l'activitat mitòtica.

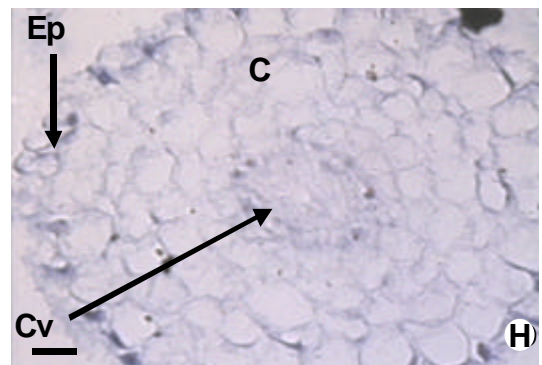
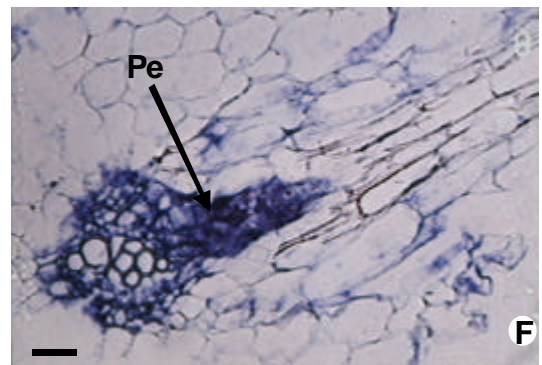
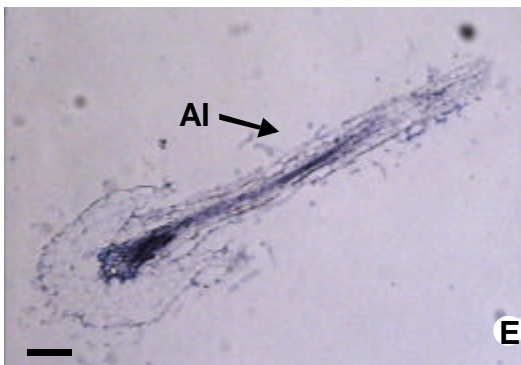
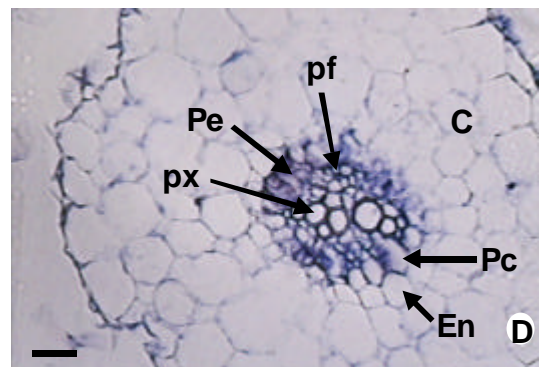
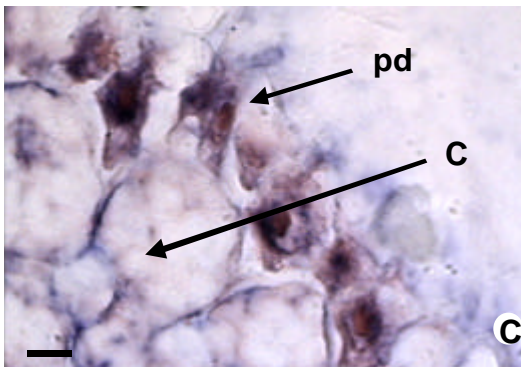
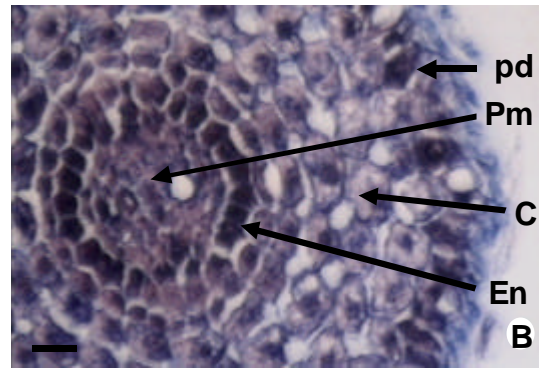
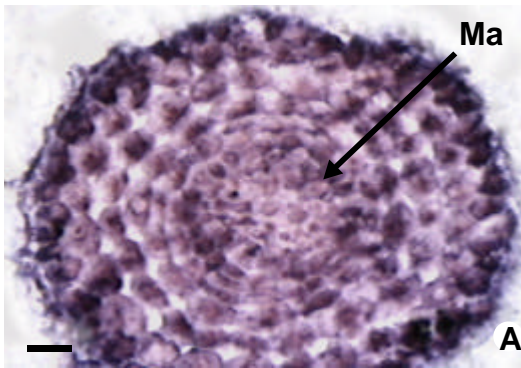
La incubació d'arrels de rave amb l'auxina àcid indolacètic, resulta en l'aparició d'arrels laterals, originades per estimulació de la divisió cel·lular en el pericicle (Kerk, 2000). Les divisions continuades del nou primordi radicular derivaran en l'establiment d'una nova arrel, amb les mateixes característiques tissulars descrites per a l'arrel principal. Durant el seu

desenvolupament, les arrels laterals atravessaran el còrtex i l'epidermis de l'arrel principal fins a sortir cap a l'exterior.

Per a la hibridació amb la sonda de la subunitat CK2 α , es mostra una arrel lateral molt desenvolupada, on es detecta expressió en el pericicle i el parènquima tant de l'arrel principal com de la lateral, i en la franja meristemàtica situada a l'extrem de l'arrel lateral (Fig 6, E-G). Per a la hibridació amb la sonda de la subunitat CK2 β , que es va fer sobre una arrel lateral més jove, es pot apreciar l'expressió en la regió meristemàtica de l'arrel lateral, destacant-se el senyal de la protodermis (Fig 7, D i E). En el cilindre vascular de l'arrel principal i en la part proximal de l'arrel lateral no es detecta tanta expressió com per a la hibridació amb la CK2 α , possiblement com a conseqüència d'una diferent orientació del teixit, que deixa visible el còrtex.

Per últim, l'especificitat de la detecció es va comprovar a través de la hibridació amb la cadena sentit per a ambdues subunitats, que mostrava una absència absoluta de senyal per sobre un lleuger soroll de fons (Fig 6, H; Fig 7, F).

Fig 6 (pàgina següent): Expressió de la subunitat CK2 α a l'arrel de *Raphanus sativus*. (A)-(G), hibridació amb la sonda antisentit. (H), hibridació amb la sonda sentit. Les abreviatures utilitzades són les següents: Al, arrel lateral; C, còrtex; Ca, caliptra; Cv, cilindre vascular; En, endodermis; Ep, epidermis; Ma, meristem de l'arrel; Pc, pericicle; pd, protodermis; Pe, parènquima estel.lar; pf, protofloema; Pm, procàmbium; px, protoxilema. La barra negra correspon a 500 μ m a C, 150 μ m a A, B, D, F, G i H, i a 50 μ m a E.



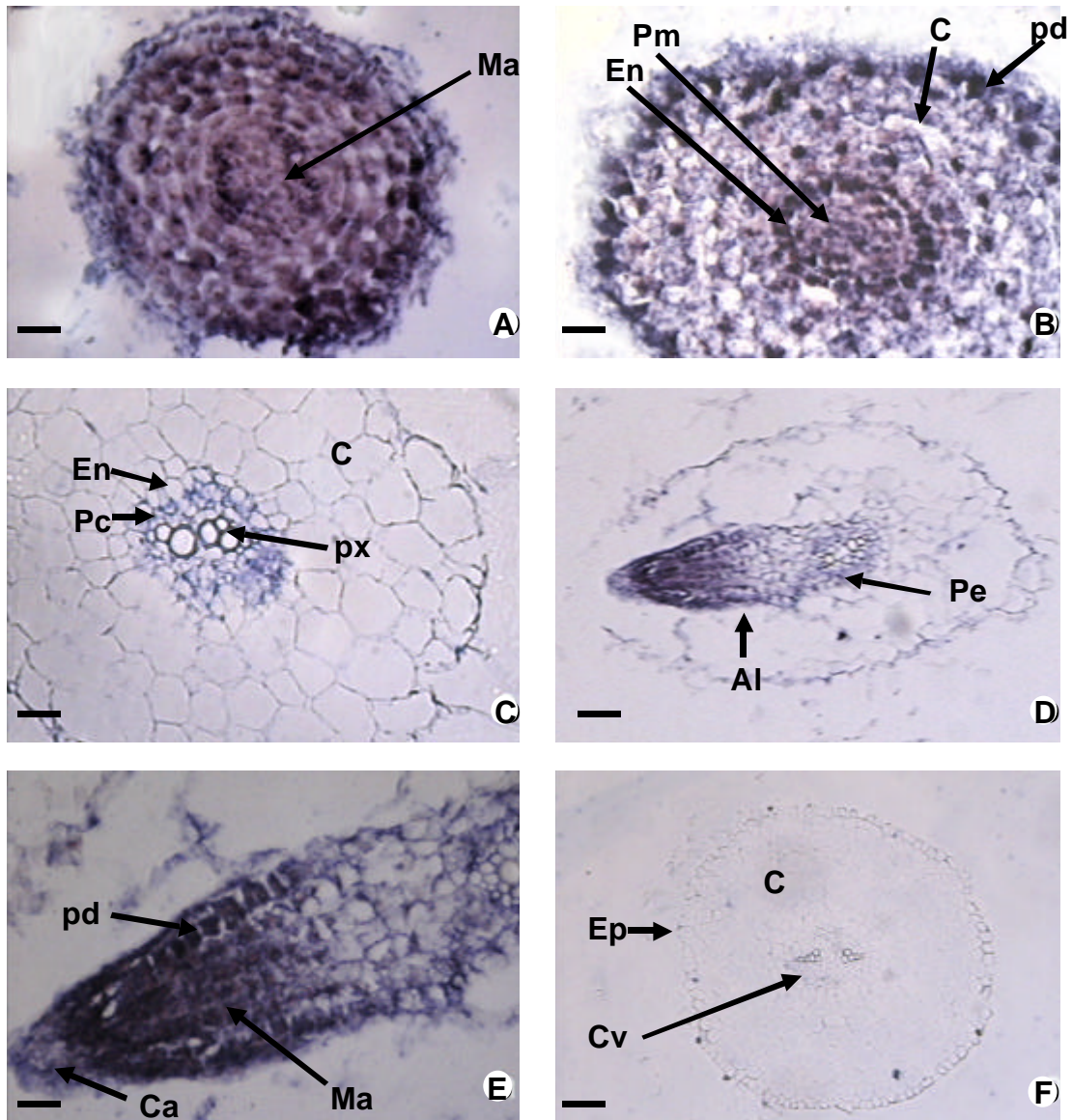


Fig 7: Expressió de la subunitat CK2b a l'arrels de *Raphanus sativus*. (A)-(E), hibridació amb la sonda antisentit. (F), hibridació amb la sonda sentit.

Les abreviatures utilitzades són les mateixes que en la Figura 6.

La barra negra correspon a 500 μm a E, a 150 μm a A, B i C, i a 50 μm a D i F.

4. HIBRIDACIÓ *IN SITU* SOBRE SECCIONS DE FULLA D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

Els primordis foliars apareixen a partir de divisions periclinals de cèl·lules L2 situades a les regions laterals del meristem apical vegetatiu de la tija, que mostra una organització similar a la del meristem de la inflorescència (Fig 2). El desenvolupament de la fulla a partir del primordi engloba una combinació de divisions i elongacions cel·lulars, que determinen la característica morfologia final en forma de làmina. El gruix de la làmina el forma el mesòfil, que presenta una simetria dorsiventral, i que es troba interromput en regions localitzades pel teixit vascular del nervi principal i de les venes secundàries. L'activitat mitòtica del mesòfil es manté alta fins que la fulla ha assolit gairebé les dimensions finals, però és superior a la base, mentre que la diferenciació del mesòfil segueix un gradient contrari al de l'activitat mitòtica i és més alta a la punta (gradient basipètal). El sistema vascular principal o nervi central es localitza al centre de la fulla, i es desenvolupa de manera paral·lela al mesòfil.

L'expansió de la làmina és deguda a l'expansió de les cèl·lules del mesòfil, provocada per un augment del volum cel·lular per vacuolització, diferenciació de l'epidermis, formació d'espais intercel·lulars i un augment de l'espai ocupat pel sistema vascular. El mesòfil madur consistirà en una capa de cèl·lules allargades verticalment situades a la superfície adaxial de la fulla, anomenades parènquima en palissada, i diverses capes de cèl·lules de l'anomenat parènquima esponjat que es troben situades a sota les anteriors i que ocupen la major part de la fulla fins a l'epidermis abaxial. Els tricomes i els estomes es troben dispersats per les epidermis, si bé els tricomes són més abundants a l'epidermis adaxial i els estomes a l'epidermis abaxial.

La formació i maduració de les fulles adultes a partir dels primordis foliars del meristem apical vegetatiu, és un procés que a *Arabidopsis* es prolonga durant aproximadament 20 dies des del seu inici (Donnelly, 1999), per la qual cosa és determinant conèixer amb exactitud en quin moment es pren la mostra per a la hibridació *in situ*. Els resultats que es presenten a continuació es van obtenir treballant amb la tercera i quarta fulles de la roseta d'*Arabidopsis*, fixades 10 dies després de la germinació de les llavors. En aquest estadi,

per tant, les fulles no han completat el seu desenvolupament, la qual cosa determina les característiques de les diferents tipologies cel·lulars.

La hibridació amb les sondes de les dues subunitats de la CK2 mostra una expressió espacial i temporal equivalent per a les dues subunitats. En tota la longitud de la fulla, l'expressió s'observa distribuïda homogèniament en les cèl·lules del mesòfil, però apareix més intensa en alguns punts que podrien relacionar-se amb la presència de venes secundàries. A la base de la fulla, les cèl·lules del mesòfil tenen activitat mitòtica alta, però són molt petites i la major part del seu volum està ocupat pels cloroplasts, que en les imatges d'hibridació *in situ* es veuen de color marró. Això fa que el senyal de color blau resultat de la hibridació amb les sondes per a la CK2 quedi majoritàriament emmascarat pels cloroplasts. Per aquest motiu no es presenten imatges d'aquesta part basal del mesòfil.

L'expressió de la CK2 continua cap a la punta de la fulla, quan el mesòfil es va diferenciant en esponjat i en parènquima en palissada, perquè malgrat la diferenciació progressiva, la divisió cel·lular en aquest punt es manté. De fet, el parènquima en palissada no pot observar-se plenament en la seva forma característica fins que la fulla es més madura, aproximadament a partir del dia 16 de creixement. Les cèl·lules d'aquests dos parènquimes han augmentat el seu volum per vacuolització, de manera que els cloroplasts s'acumulen a prop de la membrana cel·lular i el volum que ocupen respecte el volum total de la cèl·lula és menor. El senyal de la hibridació amb les sondes de CK2 es detecta a totes les cèl·lules del mesòfil (Fig 8, B; Fig 9, B).

L'expressió més accentuada s'observa, però, en el procàmbium del feix vascular o nervi principal situat al centre de la fulla (Fig 8, A; Fig 9 A). El procàmbium es forma molt aviat en el primordi foliar i no desapareix fins que la fulla és completament madura, ja que continuament ha d'estar generant cèl·lules precursors per a la formació dels vasos vasculars funcionals. També s'observa expressió en les cèl·lules que acompanyen les venes secundàries, que a causa de la continua expansió dels vasos han de dividir-se i créixer constantment.

També és remarcable l'expressió de la subunitat CK2 α que s'observa en els tricomes (Fig 8, C). Els tricomes són apèndixs diferenciats amb funció de defensa davant de depredadors. La seva particularitat rau en el fet que els seus nuclis són poliploides, amb

contingut que oscil·la entre 4C i 64C, com a conseqüència d'una ciclació repetida al voltant de la fase S, sense que existeixi Mitosi. A més, l'absència de citoquinesi provoca que la cèl·lula augmenti en gran mesura el seu volum, i desenvolupi l'apèndix.

Per últim, l'especificitat de la reacció d'hibridació es va comprovar en hibridar seccions de la fulla amb les sondes sentit per a ambdues subunitats (Fig 8, D; Fig 9, C).

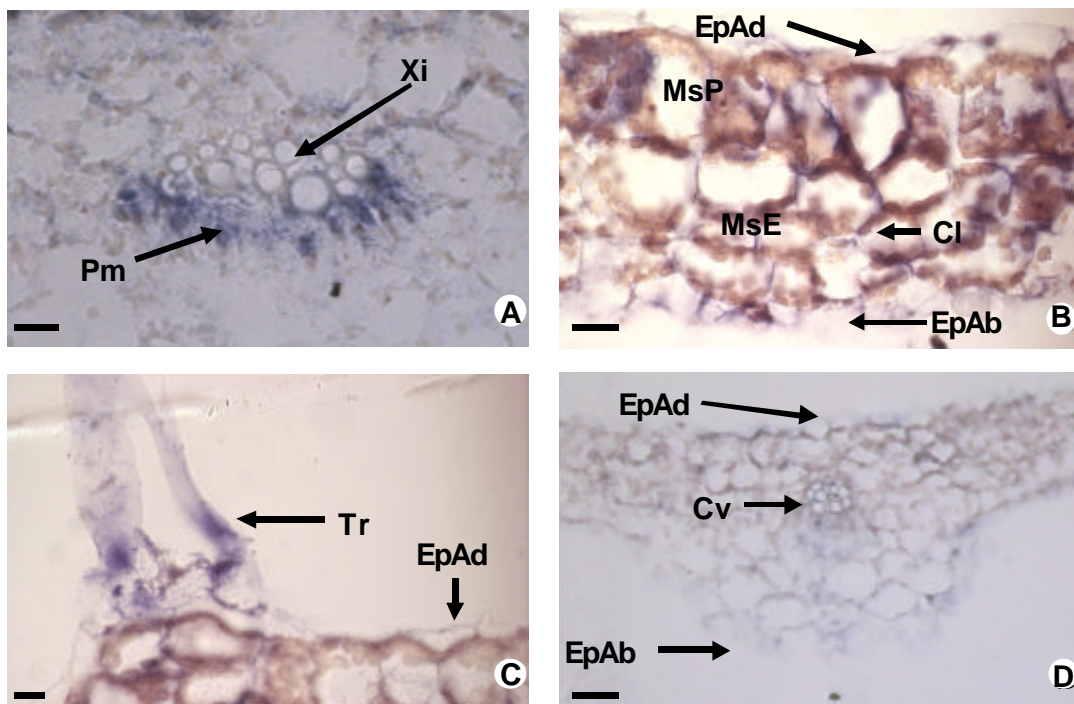


Fig 8: Expressió dels gens de la subunitat CK2a a la fulla d'*Arabidopsis thaliana*. (A)-(E), hibridació amb la sonda antisentit. (G), hibridació amb la sonda sentit.

Les abreviatures utilitzades són les següents: Cl, cloroplast; Cv, cilindre vascular; EpAb, epidermis abaxial; EpAd, epidermis adaxial; MsP, mesòfil en palissada; Pm, procàmbium; Tr, tricoma; Xi, xilema.

La barra negra correspon a 500 μ m a A, B i C, i a 150 μ m a D.

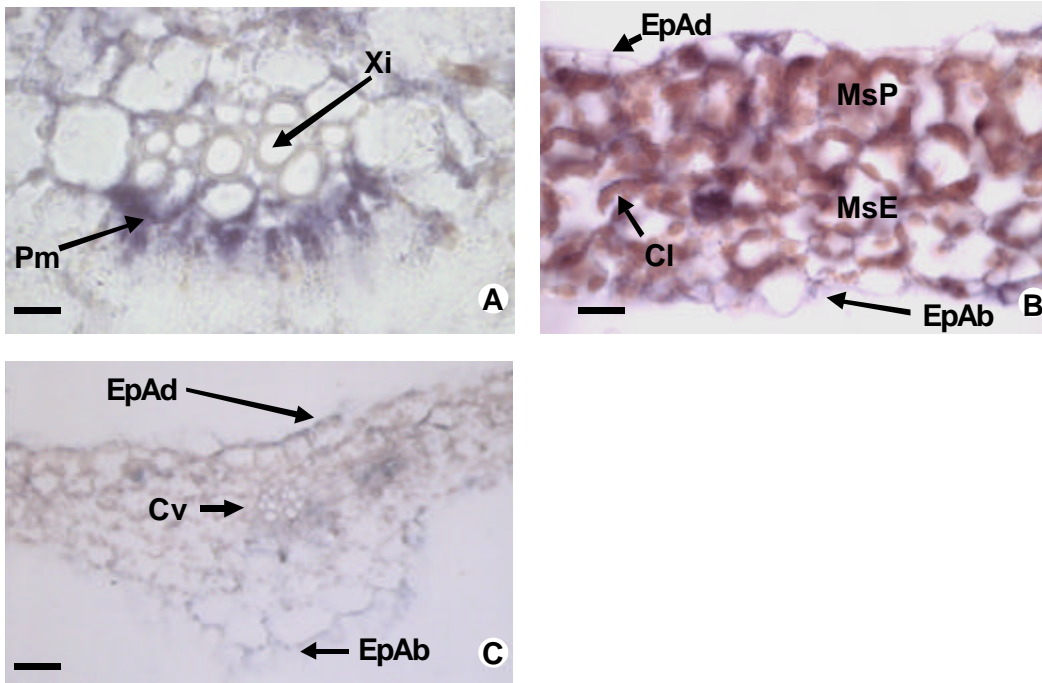


Fig 9: Expressió dels gens de la subunitat CK2b a la fulla d'*Arabidopsis thaliana*. (A) i (B), hibridació amb la sonda antisentit. (C), hibridació amb la sonda sentit. Les abreviatures utilitzades són les mateixes que en a la figura anterior. Les barra negra correspon a 500 μm a A i B, i a 150 μm a C.

CAPÍTOL III:

Discussió

Mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, s'ha estudiat el patró de l'expressió temporal i espacial dels gens de les dues subunitats de la CK2, i la seva relació amb l'organització funcional dels meristems vegetals i amb el control de la proliferació cel.lular durant el desenvolupament. Estudis previs havien demostrat que l'expressió dels gens de la CK2 no era constant en tots els òrgans de la planta, sinó que s'observaven diferències entre flors, arrels i fulles (Mizoguchi, 1993; Espunya, 1997), la qual cosa suggeria que la CK2 podia intervenir en el desenvolupament i funcionalitat d'aquests òrgans. Per altra banda, aquests tres òrgans representen un model molt apropiat per a l'estudi de l'organogènesi en vegetals, car permeten fer un seguiment dels processos que deriven en la formació de l'òrgan madur des de l'aparició del primordi o meristem corresponent. En conseqüència, es van realitzar els experiments d'hibridació *in situ* per a detectar els nivells de mRNA per a les dues subunitats de la CK2 presents en la flor, la fulla i l'arrel, així com en el meristem vegetatiu apical de la tija, en diferents moments del seu desenvolupament.

Els resultats que s'han obtingut mostren un perfil d'expressió equivalent per a les dues subunitats de la CK2 en tots els òrgans analitzats. A més, es pot concloure que la CK2 es troba regulada a nivell transcripcional durant el desenvolupament de la planta i s'expressa majoritàriament en tipus cel.lulars en activa proliferació, com les cèl.lules meristemàtiques, el procàmbium, i els primordis dels estams, del gineceu i dels òvuls de la flor. No obstant, l'expressió no es troba restringida exclusivament a les cèl.lules en divisió, sinó que en teixits diferenciats com les cèl.lules del pericicle i el parènquima estel.lar del teixit vascular de l'arrel, es manté elevada malgrat no existeix activitat mitòtica. Aquesta presència de trànscrips per a la CK2 podria relacionar-se amb un estat fisiològic de competència per a la divisió, tal i com s'ha descrit per a la p34^{cdc2} (Martínez, 1992; Hemerly, 1993).

La hibridació *in situ* sobre seccions dels tres meristems apicals de les plantes, vegetatiu, reproductor i de l'arrel, no mostra diferències en l'especificitat per a cap d'ells, la qual cosa suggereix que la CK2 probablement participa en la regulació general de la divisió cel.lular a la planta en el seu conjunt, independentment del destí final de les cèl.lules meristemàtiques. En el meristem apical vegetatiu de la tija, l'expressió és més alta en aquelles cèl.lules en què el pla de divisió és encara visible, sense que es pugui determinar, però, una preferència per cèl.lules en divisió periclinal o anticlinal.

Al llarg del desenvolupament i la maduració dels diferents òrgans, l'expressió de la CK2 decreix paulatinament, i esdevé pràcticament nul.la a partir del moment en què les cèl.lules

assoleixen la plena diferenciació i aturen el creixement, tal com s'observa en el còrtex de les arrels, i en els sèpals i les anteres de les flors. Aquestes dades suggereixen que, possiblement, aquestes cèl.lules hagin sortit del cicle de divisió cel.lular i hagin perdut la competència per a la divisió.

La incubació de l'arrel de rave en presència d'àcid indolacètic (IAA) indueix l'aparició d'arrels laterals, a partir de la divisió de les cèl.lules del pericicle i el parènquima estel.lar. Les auxines són hormones vegetals que en condicions normals són transportades per polaritat a través del teixit vascular de l'arrel fins a la zona meristemàtica, on es metabolitzen. L'aparició de les arrels laterals és més ràpida i es dona amb més freqüència quan es mutila la punta de l'arrel, perquè augmenta la concentració d'hormona a la part superior de l'arrel principal. Els resultats de la hibridació *in situ* mostren que en les arrels laterals, l'expressió de la CK2 es localitza a la zona meristemàtica, tal com ocorre en l'arrel principal. La inducció d'arrels laterals provoca un augment de l'expressió de la CK2, la qual cosa suggereix que aquesta quinasa pugui formar part de la cascada de les reaccions de fosforilació-defosforilació necessàries per a la reiniciació de la divisió en cèl.lules diferenciades amb competència per a la divisió. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts prèviament sobre l'expressió del gen de la *cdc2* en teixits vegetals (Martínez, 1992; Hemerly, 1993).

La divisió cel.lular a les plantes es troba íntimament associada a la morfogènesi i als processos de diferenciació cel.lular associats a ella. És lògic pensar, per tant, que la divisió cel.lular estigui regulada d'una manera diferent en els diferents tipus cel.lulars que constitueixen cada òrgan. En aquest sentit, els estudis de sotaexpressió de la CK2 α a *Arabidopsis*, mitjançant la transformació de les plantes amb el gen antisentit, no mostren diferències significatives en el desenvolupament i morfologia de les flors i de les arrels dels transformants (Lee, 1999). No obstant, les dimensions finals de les fulles són sensiblement menors en els transformants. Els resultats d'hibridació *in situ* que es presenten demostren que els nivells de mRNA per a la CK2 són alts en el mesòfil i en les cèl.lules del parènquima esponjat, responsables de la funció fotosintètica de la fulla. A la vegada, altres treballs demostren que la CK2 és capaç de fosforilar, *in vivo* i *in vitro*, l'ATP sintasa fotosintètica i algunes ribonucleoproteïnes del cloroplast (Kanekatsu, 1995; 1997). Aquestes observacions, unides al fet que la fulla és un dels òrgans de la planta on la CK2 s'expressa a uns nivells més elevats (Mizoguchi, 1993; Espunya, 1997), corroborarien la importància d'aquesta proteïna en el desenvolupament i fisiologia de la fulla.