

78
2ej

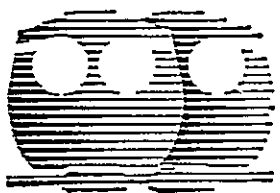
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



Expresión de Genes inducidos por cambios
hídricos durante el Osmoacondicionamiento
de Semillas de Maíz

T E S I S
Que para obtener el título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
p r e s e n t a

ALMA ELENA TORRES ESPINOSA



México, D. F.



1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

277668



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

9

/

5

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profr. AGUILAR CABALLERO RAÚL
VOCAL	Profr. VÁZQUEZ RAMOS JORGE MANUEL
SECRETARIO	Profr. HERNÁNDEZ MONTES HOMERO
1er. SUPLENTE	Profr. TORRES MÁRQUEZ MA. EUGENIA
2o. SUPLENTE	Profr. ORTEGA MUÑOZ RAQUEL

Sitio donde se desarrollo el tema :

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto "E", Departamento de Bioquímica, Laboratorio 114.

Asesor del Tema :



Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Sustentante :



Alma Elena Torres Espinosa

A ti

que al leerlo permites que este trabajo siga vigente

AGRADECIMIENTOS

Al llegar a esta etapa en su vida, uno recuerda a todas aquellas personas que de una o otra manera han contribuido a este hecho y reconocerlo es la mejor manera de demostrarlo, tal vez no a todas, pero sí a aquellas cuya contribución fue fundamental.

Mi primer agradecimiento es hacia las dos personas más admirables y tenaces que conozco y por cierto, son las responsables de que sea lo que soy, ¡mis padres!

Junto a ellos se encuentran otras tres personas que han sido mi luz y que hacen día con día que mi vida sea increíble, me refiero a Jorge, Leonardo y Alberto.

Otra parte importante a la que debo agradecer es a mi familia (abuelitos, tios, primos) que siempre me han apoyado y compartido logros y fracasos, y sobretodo por que han soportado mi difícil forma de ser.

Debo manifestar un agradecimiento especial a todos los profesores que han guiado mis pasos y que me fueron abonando, para que hoy empiece a cosechar frutos.

También a mis amigos y compañeros de clases, cuya influencia, positiva o negativa, influyó en la formación de mi carácter.

Finalmente, aunque no menos importante, me gustaría agradecer a una persona cuya paciencia, honestidad y amor a la ciencia, me ha inspirado: mi tutor el Dr. Jorge Vázquez Ramos.

INDICE

GLOSARIO	1
INTRODUCCIÓN.	1
Maíz.	1
Características de la Semilla.	2
Desarrollo de la Semilla.	5
Germinación.	7
El osmoacondicionamiento de las semillas (OSMA).	10
Embriogénesis Tardía.	13
Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant)	15
Las proteínas Rab (Responsive to ABA).	17
Las proteínas HSP (Heat Shock Protein).	18
ANTECEDENTES.	21
HIPÓTESIS.	24
OBJETIVO GENERAL.	25
OBJETIVOS PARTICULARES .	25
MATERIAL Y METODOLOGÍA.	26
Reactivos empleados	26
Material Biológico.	27
Otros Materiales.	27
Equipo	27
Metodología	28
Osmoacondicionamiento.	28
Semilla Seca.	29
Germinación Normal.	30
Purificación de ARN a partir de ejes embrionarios por el Método desarrollado por Chomczynsky y Sacchi (TRIzol®)	30
Calibración de ARN.	31
Cuantificación del ARN por espectrofotometría.	32
Análisis tipo Northern-blot	33
Separación de los ARNs por Electroforesis.	33
Transferencia del ARN a una membrana de nylon.	34
Reacción de Transformación.	36
Mini-Prep para extracción de Plásmidos.	37

<i>Purificación de fragmentos de ADN a través de una electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión.</i>	39
Marcaje de la sonda Radiactiva por Cebador Aleatorio (Random Primer).	41
Columna de Sephadex G-25.	41
<i>Hibridación.</i>	42
RESULTADOS.	44
Genes Rab	47
Rab 17 (maíz).	47
Rab 28 (maíz).	49
Genes Hsp	51
Hsp 17.6 y Hsp 17.9 (girasol).	51
Hsp 17.6 (maíz).	51
Dehidrina (cebada).	54
DISCUSIÓN.	57
CONCLUSIONES.	62
APÉNDICE.	<i>I</i>
<i>Osmoacondicionamiento.</i>	<i>I</i>
Purificación de ARN a partir de ejes embrionarios por el Método de Chomczynski y Sacchi (TRIzol®)	<i>I</i>
<i>Calibración de ARN.</i>	<i>II</i>
Análisis tipo Northern-blot	<i>II</i>
Transferencia de geles	<i>III</i>
<i>Reacción de Transformación</i>	<i>III</i>
<i>Mini-Prep para extracción de Plásmidos</i>	<i>IV</i>
Marcaje de Sonda Radiactiva por Cebador Aleatorio (Random Primer).	<i>IV</i>
<i>Hibridación.</i>	<i>V</i>
BIBLIOGRAFÍA.	<i>i</i>

GLOSARIO

ABA	Ácido Abscísico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
Ci	Curie
dCTP	Desoxicitidina Trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP en la misma concentración
EDTA	Ácido etilén-1,2-diamino-tetracético
FCI	Mezcla de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico
G	Gravedades
MOPS	Ácido 3-(N-morfolín)- propano sulfónico
MPa	Mega Pascales
pb	Pares de bases
PEG	Polietilén-glicol
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SSC	Amortiguador con Citrato de Sodio Salino
STE	Amortiguador con NaCl, TRIS y EDTA
TAE	Amortiguador con TRIS, ácido acético y EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetil propano-1,3-diol
U. A.	Unidad de Absorbencia
uv	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-5-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

INTRODUCCIÓN.

Maíz.

Desde los orígenes de la humanidad y hasta nuestros días, las gramíneas han sido de notable importancia para la sociedad humana; el trigo, el arroz y el maíz fueron factores importantes en la alimentación de los pueblos antiguos y de su cultivo se generaron las grandes civilizaciones antiguas que hoy en día nos maravillan por sus enormes logros. El hombre contemporáneo, heredero de aquellas grandes civilizaciones, hoy por hoy realiza investigación para alcanzar mayores logros y obtener de estos cereales otros elementos que generen herramientas para el porvenir.

En México, como en otros países, la investigación que sustenta este trabajo nos lleva a la idea de buscar en ella nuevas metas que mejoren la alimentación futura; hablamos entonces del maíz, cereal que se consume en muchos países del mundo y que es la base principal de esta investigación. El maíz es originario de América. Su nombre proviene de las Antillas, pero en México, los nahuas denominaron *centli* a la mazorca o *tlaolli* al grano. Existen pruebas concluyentes, aportadas por los hallazgos arqueológicos y paleobotánicos, de que en el valle de Tehuacán, Puebla al sur de México ya se

7
cultivaba maíz desde el año 2500 A.C. Es por ello que en toda América es considerada una planta con trascendencia económica y cultural. En España empezó a cultivarse en 1604, introducido en Asturias por el gobernador de la Florida y su cultivo se difundió de forma gradual por el resto de Europa hacia el siglo XVIII.

El maíz (*Zea mays* L.) es una angiosperma que pertenece a la familia de las gramíneas. Se encuentra dentro del género *Zea*, del cual es la especie representativa. Es también una monocotiledónea ya que solo presenta un cotiledón el cual está formado por un endospermo almidonoso y un pericarpio multicapa. Se considera inferior a otros cereales en cuanto a sus propiedades nutricionales, sin embargo constituye una fuente excelente de carbohidratos debido a su alto contenido de almidones (80%); un grano de maíz contiene un 13% de proteínas y un 7% de grasas, por lo que la dieta debe complementarse con alimentos proteicos (Kozlowski y Gunn, 1972; Jugenheimer, 1976).

Características de la Semilla.

El término "semilla" rara vez es utilizado para dar una definición morfológica, usualmente es empleado con un enfoque funcional. Es por ello que se considera a una semilla como un óvulo fertilizado maduro que contiene una planta en

estado embrionario, a la cual provee de reservas nutricias y de una o varias cubiertas protectoras (Kozlowski y Gunn, 1972). La semilla de las angiospermas (grupo al cual pertenece el maíz) se produce a partir de plantas unisexuales por lo que la fertilización del gameto femenino se realiza en un tejido independiente de aquel que contiene el polen.

Morfológicamente, una semilla en general (Figura 1) está formada por tres estructuras básicas: el embrión, constituido por el eje embrionario y por uno o más cotiledones; el endospermo que constituye la reserva nutritiva para el desarrollo y crecimiento del embrión y la cubierta seminal, de cuya composición y permeabilidad depende la interacción con el medio para el desarrollo de la semilla. El embrión y el endospermo se derivan a partir de material genético tanto materno como paterno, mientras que la cubierta seminal procede de células diploides maternas. El eje embrionario, por su parte, se compone de una raíz rudimentaria (radícula); de un hipocotilo, que es la parte que sirve de unión a los cotiledones y que conecta la radícula y la plúmula y de la plúmula, que formará el tallo y las hojas (Bidwell, 1979; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984).

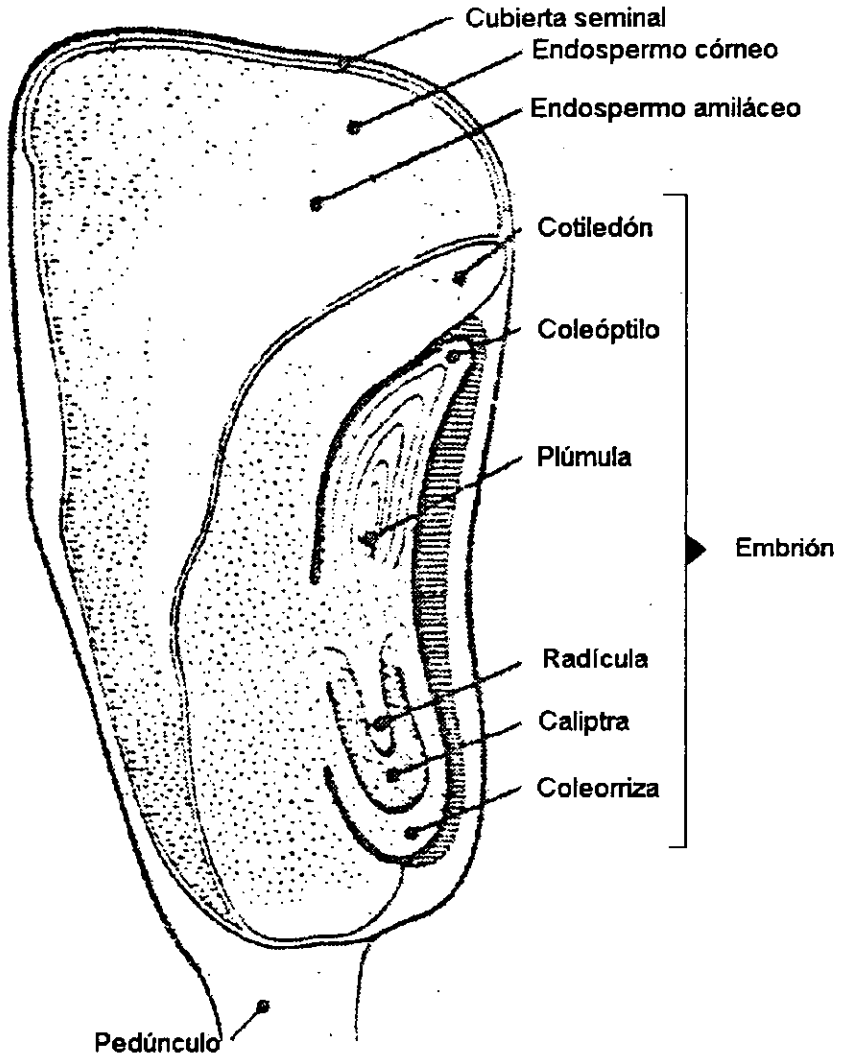


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.

Desarrollo de la Semilla.

En el ciclo de vida de un organismo en desarrollo se debe seleccionar dentro de toda la información genética, el o los mecanismos específicos de regulación de cada etapa (división, crecimiento o desarrollo) de modo que cada órgano en cada parte de la planta se desarrolle con su propia modalidad (Bidwell, 1979).

Con base en lo anterior se han propuesto tres tipos de controles durante el desarrollo de una planta:

1.- El control genético, que se realiza por medio de la regulación de genes en un momento del desarrollo y en una condición ambiental específica, ya sea mediante la expresión o represión de estos genes, o también la selección de la información genética necesaria para que se lleve a cabo la división, el desarrollo y crecimiento de cada órgano o tejido de la planta.

2.- El control celular, que se refiere a aquel que se encuentra mediado por estímulos generados en el interior de los órganos o como resultado de la organización celular.

3.- El control ambiental, que se produce por algún estímulo ambiental o externo a la semilla o planta, de la cual depende el camino para el desarrollo de la misma. Pueden formar parte de estos factores las sustancias químicas

producidas por otros organismos, pero la clase de factores que se consideran generalmente son los factores físicos: luz, temperatura, aire, gravedad, humedad de la tierra, etc. Estos factores se sobreponen y a menudo disminuyen los controles genéticos y celulares (Bidwell, 1979).

Específicamente, en la semilla, después de que se ha llevado a cabo la fusión de los gametos como consecuencia de la polinización, se establece un proceso de embriogénesis que dará origen a la estructura de la nueva planta (eje epicótilo-radicular y uno o más cotiledones), así como al desarrollo del endospermo, donde se acumularán las reservas que serán utilizadas para el desarrollo de la semilla (Bewley y Black, 1994). A este proceso le siguen una serie de eventos metabólicos que se han clasificado de la siguiente manera:

1.- Histodiferenciación: En esta etapa se producen extensas divisiones mitóticas en el cigoto dando como resultado la diferenciación de células para formar el cuerpo básico del embrión, el cual está constituido del eje embrionario y el cotiledón o cotiledones.

2.- Maduración: Esta etapa ocurre en ausencia de divisiones celulares y se caracteriza por una alta tasa de elongación celular, acumulación de reservas (lípidos, proteínas y/o carbohidratos) así como un incremento en la

concentración de ácido abscísico (ABA) en la semilla, terminando con la pérdida gradual de agua de los tejidos.

3.- Deseccación: En esta etapa la semilla empieza a perder agua de manera considerable hasta llegar a contenidos de agua de 5 - 10% lo que trae como consecuencia una reducción considerable en su metabolismo.

4.- Quiescencia: En este estado la semilla ha quedado con un metabolismo reducido y así permanecerá hasta encontrar las condiciones ambientales favorables para germinar (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984; Kermode, 1995).

Germinación.

Se conoce como germinación a una variedad de procesos que provocan la reanudación de procesos de desarrollo y crecimiento interrumpidos, tal es el caso de la germinación de semillas, la germinación de esporas de bacterias, hongos o levaduras, así como al desarrollo del tubo polínico después de que éste se fertiliza (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984).

De manera funcional y para los fines del presente trabajo, se ha establecido que la germinación empieza con la entrada o absorción de agua del

medio a la semilla (proceso denominado imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, que generalmente es la protrusión radicular.

Sin embargo, para los agrónomos y fisiólogos de plantas, la germinación comienza con la imbibición y termina para los primeros, con la emergencia de la plántula en el suelo mientras que para los segundos, la germinación termina con la elongación necesaria para emerger (Bewley y Black, 1994).

Durante el proceso germinativo se llevan a cabo una serie de eventos moleculares cuya combinación lleva a transformar a un embrión deshidratado, que posee un metabolismo muy bajo, en un embrión con un metabolismo activo.

La entrada de agua a las semillas está caracterizada por tres fases subsecuentes: la fase I conocida como imbibición, es un proceso físico que ocurre en las semillas viables y no viables, en esta fase el contenido de agua de la semilla es mucho menor que el de su entorno (5 - 10 %). En la fase II el contenido de agua de la semilla es igualado con el de su entorno, en esta etapa ocurren muchos eventos metabólicos que preparan a la semilla para la emergencia de la radícula. Finalmente, en la fase III se presenta la protrusión radicular para dar origen al crecimiento de la plántula. La duración de cada fase depende de las propiedades inherentes (tamaño, permeabilidad, etc.) de las semillas (Bewley y Black, 1994).

Por otra parte, la imbibición y las condiciones ambientales óptimas como luz, humedad, temperatura, oxígeno, etc. son elementos que pueden promover el inicio de la germinación. En el maíz se ha observado que estos factores activan a las células del meristemo de la raíz y a las células de la coleorriza. La primera elongación o protrusión del eje embrionario de la semilla la realiza la coleorriza dando origen a la raíz y la segunda protrusión la realiza la plúmula (Kozłowski y Gunn, 1972).

Sin embargo, si alguno de estos factores es restringido, particularmente la humedad, la germinación puede ser afectada considerablemente, desde una disminución en su velocidad hasta la pérdida de viabilidad de las semillas. Por lo tanto, el hecho de que la germinación pueda continuar o no, depende del grado de avance que se haya alcanzado antes del déficit hídrico y del tiempo de su duración (Hegarty, 1978). Lo anterior ha llevado a sugerir que existe un punto de regulación fisiológico de la germinación, antes del cual el proceso germinativo puede continuar y no verse dañada la viabilidad de las semillas si la germinación fuera interrumpida por un déficit hídrico; sin embargo, si el déficit hídrico se presentase después de dicho punto de regulación, la germinación podría inhibirse parcialmente e inclusive podría presentarse una pérdida total de la viabilidad de las semillas (Côme y Corbineau, 1989).

Dada la existencia de un punto de regulación del proceso germinativo, se han sugerido una serie de metodologías que permiten manipular la cantidad de agua libre que ingresa a la semilla, lo que ocasiona que se inicien los eventos germinativos pero no concluyan, considerando que, teóricamente el punto de regulación no ha sido alcanzado, por lo que la viabilidad de las semillas no se ve afectada. Una de las metodologías diseñadas para este fin es el osmoacondicionamiento de las semillas (Heydecker y Coolbear, 1977; Bradford, 1986).

El osmoacondicionamiento de las semillas (OSMA).

El osmoacondicionamiento es una técnica que consiste en preimbibir a las semillas con un agente higroscópico inerte como el polietilén-glicol (PEG), el cual genera un potencial hídrico adecuado que permite controlar la cantidad de agua que ingresa a la semilla, con esto, la germinación inicia pero no concluye. Como requisito, las semillas que reciben este tratamiento no deben presentar emergencia radicular ni perder su viabilidad mientras dura el tratamiento; pero una vez que éste concluye, las semillas deben tener la capacidad de deshidratarse sin perder su viabilidad debido a los beneficios germinativos

ganados durante el osmoacondicionamiento. Por otro lado, si las semillas osmoacondicionadas son colocadas bajo condiciones óptimas de humedad, deben germinar en forma más rápida y uniforme que las semillas no osmoacondicionadas (Bradford, 1986).

Se ha propuesto que los procesos fisiológicos que se presentan en las semillas durante el osmoacondicionamiento son similares a los que ocurren durante la germinación temprana de las semillas, excepto por el bloqueo en el proceso de la germinación (Bewley y Black, 1994).

Estudios a nivel molecular han demostrado que durante el osmoacondicionamiento no hay un aumento detectable en el contenido de ADN en el tejido embrionario y en el endospermo de las semillas osmoacondicionadas de poro, lo que indicaría una división celular (Bray *et al.*, 1989). Una situación similar se observó en semillas de maíz donde no se detectó la síntesis replicativa de ADN y los bajos niveles de síntesis detectados durante el osmoacondicionamiento parecen deberse a la reparación de ADN ó síntesis en los organelos. Sin embargo, se ha observado una rápida reanudación de la síntesis replicativa del ADN y de la división celular durante la germinación subsecuente al osmoacondicionamiento de semillas (Ashraf y Bray, 1993; Cruz-García *et al.*, 1995).

En cuanto al contenido de ARN durante el osmoacondicionamiento, se ha observado que el contenido se incrementa considerablemente en relación la concentración del ADN. Este incremento se debe en gran medida a la síntesis y acumulación de ARNr. Por ejemplo, en semillas de poro, el ARNr constituye el 65% del ARN total al inicio del OSMA y el 85% hacia el final; en cambio, los niveles de ARNm se mantienen constantes en proporción al ARN total en el embrión y en el endospermo. También se ha detectado en estas semillas que el ARNr se encuentra parcialmente degradado en los primeros días del OSMA, pero al final del tratamiento no hay evidencia de dicha degradación, lo que indica que durante el OSMA existe un recambio de ARNr dañado, lo que beneficia el vigor de las semillas (Bray *et al.*, 1989).

Además, se ha visto que en la germinación subsecuente al osmoacondicionamiento el contenido de ARN total es mayor que en las semillas no osmoacondicionadas (Bray *et al.*, 1989; Cruz-García *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que la síntesis de proteínas en las semillas durante el osmoacondicionamiento es reiniciada minutos después de la hidratación, ya que la síntesis de proteínas es un requisito indispensable para que las semillas logren los beneficios proporcionados por este sistema y la germinación continúe con éxito (Hegarty, 1978).

Estudios realizados en semillas de chícharos indican que las proteínas sintetizadas durante el osmoacondicionamiento podrían estar asociadas con la germinación; sin embargo, en el poro se han identificado algunas proteínas que desaparecen durante la germinación subsecuente, se ha propuesto que esas proteínas sean inducidas por el déficit hídrico generado durante el osmoacondicionamiento (Dell' Aquila y Bewley, 1989; Davison y Bray, 1991).

Entonces, dado que durante el osmoacondicionamiento se inhibe la germinación por un déficit hídrico que somete a las semillas a un estrés, resulta interesante estudiar las respuestas moleculares que le confieren protección a las semillas. Existe un grupo de proteínas denominadas LEA (Late Embryogenesis Abundant) que se expresan al final de la embriogénesis, cuando la semilla se prepara para la desecación, por lo que se propone que éstas proteínas le dan protección a las células mediante la preservación de la estructura de otras proteínas.

Embriogénesis Tardía.

Como se mencionó con anterioridad, el final del estado de maduración y desarrollo de las semillas es caracterizado por presentar un período de desecación, en el cual se remueve hasta el 90 % del agua original, logrando con

ello que la semilla entre en un estado de dormancia, con un metabolismo imperceptible (Leprince *et al.*, 1993).

Debido a ello, los embriones de la semilla deben adaptarse a estos cambios osmóticos para no perder su viabilidad. La semilla seca permanece viable incluso después de largos períodos de almacenaje, indicando que el daño inducido al embrión a raíz de la desecación es prevenido durante el desarrollo y/o es fácilmente reparado en la germinación (Almoguera y Jordano, 1992).

Con base en lo anterior, la investigación realizada en torno a la tolerancia a la desecación se ha centrado en el estudio de transcritos que se acumulan durante el desarrollo del embrión. Estos incluyen a la familia de genes clase *LEA*, que están altamente conservados y que se expresan abundantemente durante la embriogénesis tardía (Almoguera y Jordano, 1992).

También se ha observado que en respuesta al déficit hídrico y/o a la adición o presencia del ácido abscísico (ABA), se expresan otros productos génicos como son las proteínas RAB (Responsive to ABA) o las dehidrinas. Se ha observado además que ambos tipos de proteínas se expresan abundantemente durante la embriogénesis tardía. Entre sus posibles funciones está el secuestro de iones o de agua, o la preservación de la membrana o de la

estructura de las proteínas y su renaturalización (función de chaperona) (Dure, 1993; Lisse *et al.*, 1996).

Se sabe además que el déficit hídrico no solo induce genes relacionados específicamente con este tipo de estrés, ya que también pueden inducirse diferentes clases de genes que codifican para proteínas de choque térmico, HSP (heat-shock protein) (Almoguera y Jordano, 1992).

Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant)

Las *LEA* son proteínas hidrofílicas, ricas en glicina y altamente estables al calor; algunas *LEA* pueden ser inducibles en las semillas por desecación prematura o por adición de ácido abscísico (ABA) y en el tejido vegetal de la planta, en respuesta al déficit hídrico o la adición de ABA (Mundy y Chua, 1988; Skriver y Mundy, 1990; Bostock y Quatrano, 1992). Se sugiere que estas proteínas juegan un papel de protección durante los procesos de desecación y rehidratación a través de la preservación y renaturalización de la estructura de otras proteínas (Galau *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que las proteínas *LEA* no son las únicas involucradas en dar protección a la desecación (Blackman *et al.*, 1991).

Se ha clasificado a la familia de las proteínas *LEA* en cinco grupos con base en su secuencia de aminoácidos (Dure, 1993). Algunos de estos grupos, el 3 o familia D-7 y la familia D-29 o grupo 5, poseen un motivo similar (11 residuos de aminoácidos) que se sugiere que forma una α -hélice anfipática, cuya cara hidrofóbica (interna) es importante en la formación de un homodímero y su cara externa cargada es la involucrada en el secuestro de iones cuya concentración se incrementa durante el déficit hídrico (Dure, 1993).

Otro grupo de proteínas *LEA* es la familia D-19 o grupo 1, que se ha sugerido que mejora la capacidad de unión de moléculas de agua. Estas proteínas poseen un alto porcentaje de aminoácidos cargados y glicina.

Se ha sugerido que las proteínas del grupo 4 (familia D-113) reemplazan a las moléculas de agua perdidas con la finalidad de preservar la estructura de la membrana. Estas proteínas poseen una pequeña secuencia conservada hacia el extremo carboxilo terminal.

Finalmente, la Familia D-11 o grupo 2, son proteínas también conocidas como dehidrinas, poseen una secuencia conservada de 15 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal. Se postula que su función podría ser como la de una proteína chaperona. Estas proteínas podrían estar involucradas en la

estabilización de proteínas citoplasmáticas o membranales para evitar posibles deformaciones generadas por la deshidratación. Se ha observado también que al presentarse condiciones de desecación, estas proteínas son las primeras que se inducen (Dure, 1993).

Las proteínas Rab (Responsive to ABA).

Se ha establecido que el ácido abscísico (ABA) interviene en un gran número de procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, tales como la maduración de embriones, la dormancia en las semillas y la respuesta de las plantas al estrés osmótico (Zeevaart, 1988). La respuesta de las células de las plantas a ABA comprende la modulación de los ARNs mensajeros específicos y de algunas proteínas en diferentes tejidos (Skriver, 1990; Quatrano, 1993). El efecto a nivel molecular del ABA sobre la expresión de genes ha sido sujeto de múltiples estudios, pero pocos son los datos que identifican a intermediarios de los caminos de señalización transduccional del ABA. Muchos de los genes que responden a él (*rab*) son controlados a nivel transcripcional, sin embargo, otros estudios han mostrado que la expresión de los genes *rab* es controlada por otros procesos adicionales a la concentración de ABA (Vierling y Sun, 1987; Howarth, 1990; Heikkila, 1993).

En el maíz se ha descrito la expresión del gen *rab 17* en diferentes partes de la planta en respuesta a la adición de ABA exógeno y al estrés osmótico. El producto proteínico de *rab 17* parece participar en el programa de desarrollo del embrión y se expresa específicamente durante la embriogénesis tardía; se ha observado también, que la expresión de *rab 17* no requiere de altas concentraciones de ABA endógeno.

En semillas la expresión de este gen es independiente de las alteraciones del embrión derivadas del estado de dormancia o desecación. Su correspondiente proteína se distribuye entre el núcleo y el citoplasma, sitios donde presenta diferentes estados de fosforilación, y donde además podría ayudar en el transporte de proteínas nucleares a través de su unión con péptidos que indican la localización nuclear (nls) (Goday *et al.*, 1994).

Las proteínas HSP (Heat Shock Protein).

Cuando se somete a un organismo a temperaturas extremas (choque térmico), se induce la expresión de grupos de genes conservados que codifican para proteínas denominadas HSP (Heat-Shock protein). Ese estrés térmico provoca la activación de los genes característicos *hsp* como respuesta celular

de preservación del organismo, tanto en procariotes como en eucariotes (Lindquist y Craig, 1988).

En plantas, la respuesta al choque térmico es caracterizada por una síntesis abundante de *HSPs* de bajo peso molecular (Low Molecular Weight, LMW). Estas proteínas, con peso molecular entre 15 y 28 kDa, forman parte de un pequeño grupo de cuatro familias de genes, dos de las cuales (clase I y clase II) codifican principalmente para polipéptidos localizados en el citoplasma.

Aunque se ha identificado la presencia de los genes *hsp* en sistemas animales durante los estados de embriogénesis y gametogénesis, en las plantas son pocos los casos en los cuales se ha comprobado la expresión específica de los genes *hsp*, por ejemplo durante el desarrollo del polen en la alfalfa y el tabaco, en la esporulación de microesporas del maíz, en embriogénesis de células somáticas y durante la maduración de semillas de plantas en campo (Györgyey *et al.*, 1991; Zársky *et al.*, 1995; Magnard *et al.*, 1996).

Estudios realizados en plantas de girasol han podido establecer que los transcritos de los genes de las *HSP-LMW* (principalmente la *HSP 17.6* y la *17.9*) se acumulan en las semillas durante la embriogénesis en respuesta al ácido abscísico (ABA) y en estrés osmótico, mientras que dicha expresión en

tejidos vegetales de plantas maduras sólo se observa durante la respuesta al estrés hídrico.

Al igual que las proteínas *LEA*, las proteínas *HSP* (17.6 y 17.9) se localizan en el citoplasma y son principalmente hidrofílicas (Dure, 1993). Además, se ha observado que también se acumulan durante la maduración de las semillas, primordialmente durante el período de desecación de éstas. La expresión de la *HSP* 17.9 durante la embriogénesis es paralela a la acumulación de proteínas de reserva y lípidos durante el desarrollo de las semillas del girasol (Robertson *et al.*, 1978; Allen *et al.*, 1985). Durante la germinación, sólo algunas proteínas *LEA* persisten en altas concentraciones durante las 12 - 24 horas post-imbibición (Dure, 1993). Las *HSP* 17.6 y 17.9, desaparecen después de la mayoría de las proteínas de reserva, las cuales se degradan antes de los 3 días post-imbibición. La persistencia de las *HSP-LMW* más allá de este estado puede estar supeditado a su relación con la movilización de los lípidos de reserva.

Se ha propuesto que las *HSP* 17.6 y *HSP* 17.9 pueden estar involucradas en asistencia a la translocación de proteínas estructurales o enzimas entre el citoplasma y la membrana de algunos organelos (Chirico *et al.*, 1988).

ANTECEDENTES.

Para lograr el osmoacondicionamiento (OSMA), debe someterse a las semillas de maíz a un potencial osmótico de -1.7 Mega Pascales (MPa) mediante tratamiento con una solución de polietilén-glicol (PEG) por un período de hasta 10 días a 25°C.

En condiciones de OSMA, las células de los ejes embrionarios pueden incorporar ^3H -timidina, lo que ocurre preferentemente en el citoplasma de la célula y rara vez en el núcleo. La síntesis del ADN está asociada con la reparación del ADN, ya que no existen evidencias en el maíz de que exista replicación durante el osmoacondicionamiento (Cruz-García *et al.*, 1995).

Durante las primeras horas de la germinación subsecuente, los niveles de incorporación de ^3H -timidina aumentan considerablemente y la replicación de ADN se inicia alrededor de las 6 horas, mientras que dicho evento parece suceder después de las 12 horas en las semillas no osmoacondicionadas (Cruz-García *et al.*, 1995).

Experimentos realizados en células meristemáticas de embriones, evaluaron el índice mitótico y mostraron que las células sometidas al osmoacondicionamiento son incapaces de dividirse, lo que sí se observa en la germinación subsecuente hacia las 15 horas de imbibición en el tejido radicular.

Esto comúnmente ocurre hacia las 24 - 28 horas en la germinación control (Cruz-García *et al.*, 1995).

Los resultados anteriores indicaron que, al menos en el maíz, las células meristemáticas de los ejes embrionarios permanecen en la fase G1 del ciclo celular durante el osmoacondicionamiento; al presentarse la germinación después del OSMA se reanuda rápidamente el ciclo celular y se inician las fases S y M alrededor de las 5 y 15 horas de imbibición, respectivamente.

Además, se ha observado que el osmoacondicionamiento es capaz de revigorar semillas que han sido deterioradas artificialmente, de tal forma que germinan con mayor velocidad que el control (Cruz-García *et al.*, 1995; Sánchez-Jiménez *et al.*, 1997).

Dado que se presenta un déficit hídrico en las semillas osmoacondicionadas del maíz similar al que se presenta en las semillas al encontrarse en la etapa final de la embriogénesis y además existe reparación de ADN o síntesis del ADN en los organelos, pero no se presenta replicación nuclear del ADN, se ha sugerido que el osmoacondicionamiento podría representar un estado metabólico intermedio entre la embriogénesis tardía de la semilla y los primeros momentos de la germinación. Para esclarecer este punto, el presente trabajo se enfocó a estudiar el efecto del

osmocondicionamiento sobre la expresión de genes específicos de embriogénesis tardía.

HIPÓTESIS.

Dado que durante el osmoacondicionamiento se presenta un déficit hídrico que somete a estrés a las semillas, bajo estas condiciones se induce la expresión de algunos genes involucrados en la tolerancia a la desecación, como aquellos que se inducen durante la embriogénesis tardía.

OBJETIVO GENERAL.

- Determinar la expresión de genes que codifican para proteínas propias de la embriogénesis tardía durante el osmoacondicionamiento y germinación de semillas de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES .

- ✓ Estudiar la expresión de los genes Rab (17 y 28), HSP (17.6, 17.9 y la homóloga de maíz, ZmHsp 17.6) y Dehidrina, durante el osmoacondicionamiento y germinación Subsecuente.
- ✓ Comparar la expresión de estos genes con su expresión durante la Germinación Normal.

MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Reactivos empleados

Los reactivos empleados para el desarrollo experimental fueron los siguientes:

Reactivo	Casa Comercial
Agarosa (Grado analítico y grado biología molecular)MOPS, Tris, TRIZOL®,	Gibco-BLR.
Ácido acético glacial, Etanol Absoluto, Cloroformo, Alcohol Isoamílico, HCl, EDTA	MERCK
NaCl, NaOH, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , Acetato de Sodio, Isopropanol	J.T. Baker
DEPC, X-Gal, Bromuro de Etidio, Polietilén-glicol, Glioxal	Sigma Chemicals
RNasa libre de DNasa, DNasa I libre de RNasa, Glucógeno, EcoRI, Hind III, XhoI, XbaI, SalI, Fenol	Boehringer Mannheim
Random Primer Extension Labeling System [α - ³² P]-dCTP	NEN® - DuPont.
Sephadex G-25	Pharmacia LKB Biotechnology.

Material Biológico.

- Ejes embrionarios de Maíz de la variedad *Chalqueño*
- *Escherichia coli* cepa INV α F' del Kit de Invitrogen.
- Plásmidos con los insertos correspondientes a cada sonda proporcionados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Inserto	Procedencia	Enzimas de Restricción	Plásmido	Tamaño (pb)
Dehidrina	Cebada	Hind III	pTZ 19R	1300
HSP 17.6	Girasol	Eco RI	pSK + 11 (N)	697
HSP 17.9	Girasol	Eco RI	pSK + 11 (N)	500
HSP 17.6	Maíz	Xba I/ Sal I	pZL1	650
RAB 17	Maíz	Eco RI/ Xho I	pSK + 11 (N)	800
RAB 28	Maíz	Eco RI/ Pst I	-	500

Otros Materiales.

- Papel 3MM de Whatman.
- Membranas de Nylon HybondTM-N⁺ (cargadas Positivamente) de Amersham.
- Tubos de 0.5, 1.5 mL, puntas para micropipeta RT- 10, RT- 20, RT- 200, RT - 1000, RT - 5000, de RAININ Instrument Co. Inc.
- Película Autorradiográfica Biomax-MR de Eastman Kodak Co.

Equipo

- Centrifugas Sorvall® Super T-21 y Sorvall® MC 12V de Dupont.
- Aparato de Electroforesis Horizon® 11•14.
- Fuente de Poder Modelo 250 de Life Technologies, Inc.

- Horno de Hibridación HIBAYD de LabNet
- Transiluminador U.V. de UVP Inc.
- Incubadora Thermoline
- Autoclave AESA MOD. CV. 300
- Campana de Flujo Laminar CFL NUAIRE
- Horno de Entrecruzamiento SPECTROLINKER™ XL-100 de Spectronics Corporation.

Metodología

La metodología empleada se describe de acuerdo al orden en el cual el proyecto lo fue requiriendo.

La preparación de las soluciones que a continuación se mencionan se detalla en el Apéndice.

Osmoacondicionamiento.

Primeramente se eligieron 100 semillas con buen aspecto, esto es, que no se encontraran maltratadas o presentarán hongos.

El lote de semillas antes mencionado se lavó 3 o 4 veces con agua destilada y finalmente se le dió otro lavado con agua estéril. A continuación las semillas se volvieron a lavar, pero esta vez con una solución de Captán (fungicida, ver apéndice, pág. I) por 5 min. Terminado el tiempo de lavado se

retiró esta solución y se dejaron secar las semillas sobre sanitas en condiciones de esterilidad (Campana de Flujo Laminar).

Las semillas se colocaron en cajas petri (10 por cada caja) con solución de polietilenglicol 8000 (PEG, ver apéndice, pág. I). Se incuban a 25° C por diferentes tiempos: 3, 5 y 10 días. Transcurrido el tiempo correspondiente se extrajeron los ejes embrionarios y se colocaron a - 70°C para la posterior extracción de ARN.

Para estudiar la germinación subsecuente al OSMA, las semillas con el tratamiento completo (10 días) se colocaron en sanitas con agua para propiciar con ello su germinación (5, 15 y 24 horas), y se extrajeron los ejes embrionarios.

Los ejes embrionarios se obtuvieron manualmente con ayuda de navajas de un filo, procurando que al obtenerlos no se dañara su estructura.

Semilla Seca.

Se tomó un lote de semillas independiente de los anteriores, al cual no se le realizó ningún tratamiento. De este lote se obtuvieron los ejes embrionarios y se guardaron a -70° C para la posterior extracción de ARN.

Germinación Normal.

Se pusieron a germinar semillas que tampoco no osmoacondicionadas ya que se requería tener un control de germinación en condiciones normales. Se germinaron por 5, 15 y 24 horas.

Una vez que se obtuvieron los ejes embrionarios de cada uno de los tiempos a probar, se procedió a extraer el ARN.

Purificación de ARN a partir de ejes embrionarios por el Método desarrollado por Chomczynsky y Sacchi (TRIZOL®)

Se tomaron 10 ejes embrionarios de cada uno de los tiempos anteriormente mencionados, se trituraron en un mortero con 1mL de TRIZOL® (isotiocianato de guanidina y fenol) y la suspensión formada se agita en vortex, con el fin de aislar ARN total (tanto de alto como de bajo peso molecular) de células y tejidos. El homogeneizado se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó el homogeneizado a 7245 G durante 3 min.

Se tomó cuidadosamente el sobrenadante (la fase acuosa) con una pipeta y se colocó en un tubo estéril limpio, se le adicionó 1/10 del volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (50:1, ver apéndice, pág. I) con el fin de

desproteínizar la muestra. Se agitó fuertemente en el vortex. En seguida se centrifugó a 7245 G por 3min.

Se tomó nuevamente la fase acuosa, se colocó en otro tubo estéril y se le agregaron 500 μL de TRIzol®. Se incubó 10 min y se repitió la extracción.

El ARN obtenido en el sobrenadante se precipitó con un volumen de isopropanol frío (-20°C) manteniendo la mezcla por 20 min a -20°C . Transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó a 7245 G por 15 min y posteriormente el paquete de ARN se lavó 2 veces con etanol al 70%.

A continuación se retiró cuidadosamente el etanol, se dejó secar el paquete de ARN a temperatura ambiente por 5min y se resuspendió en aproximadamente 200 μL de agua libre de RNasa (ver apéndice, pág. I). La pureza del ARN obtenido se visualizó a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (ver apéndice, pág. II) y se procedió a la calibración de su cantidad.

Calibración de ARN.

Para llevar a cabo la calibración del ARN de cada una de las muestras se requiere tener todos los ARN a la misma concentración, para lo cual se tomó 1 μL de cada una de las muestras y se separó el ARN en un gel de agarosa 1.2 % (30 mL, ver apéndice, pág. II), el cual que contenía como revelador bromuro de

Etidíó 0.1 % y una amortiguadora con Tris-ácido acético-EDTA (TAE, ver apéndice, pág II). Antes de cargar la muestra en el gel, la solución de ARN en 4 μ L de agua libre de RNasa (ver apéndice, pág. I) se desnaturalizó 15 min a 65°C y posteriormente se colocó 5 min en hielo. Se corrió la electroforesis a 80 volts por 30 min.

Transcurrido el tiempo de corrimiento, se observó el gel en el transiluminador de luz uv. Se determinó cualitativamente cual era el ARN más concentrado, y en base a él se ajustaron los volúmenes del resto de los ARN. A continuación se volvió a correr un gel hasta que todos los ARN quedaran en la misma proporción.

Una vez que todos los ARNs estuvieron visualmente a la misma concentración, se corrió un gel desnaturalizante para corroborar dicha calibración y posteriormente se determinó cuantitativamente la concentración para poder llevar a cabo el gel para Northern-blot.

Cuantificación del ARN por espectrofotometría.

Se colocó 1 μ L del ARN que presentó mayor concentración en una celda de cuarzo de 1 mL, se completa con agua destilada a 1 mL y se agitó por inversión. Se determinó la absorbencia a 260 nm de longitud de onda.

La concentración se obtiene tomando en cuenta que :

$$1 \text{ U.A. } (260\text{nm}) = 40 \text{ } \mu\text{g/mL de ARN}$$

Por lo que, multiplicando el valor de la absorbencia por el factor se obtiene la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ARN de la muestra original.

Con el valor de la concentración se calculó el volumen (μL) que debía tomarse por muestra de ARN para llegar a una concentración final de 20 μg .

Análisis tipo Northern-blot

Separación de los ARNs por Electroforesis.

Se elaboró un gel de agarosa al 1.5 % (aprox. 150 mL), en el cual se cargaron todos los ARNs obtenidos de los diferentes tiempos de osmocondicionamiento, germinación subsecuente y germinación normal, previamente desnaturalizados con una mezcla de 6 μL glioxal, 16.6 μL DMSO, 3.3 μL MOPS 1x (ver apéndice, pág. II) y agua libre de RNasa (ver apéndice, pág. I) para completar 31.9 μL . Se incubó por 1 hora a 50°C.

A continuación se corrió la electroforesis por un tiempo de alrededor de 4 horas a 90 volts. Posteriormente, el gel se tiñó con una solución que contenía acetato de amonio 0.1 M (ver apéndice, pág. III) y bromuro de etidio 0.1% por 20 min. Finalmente se reveló con luz Ultravioleta.

A continuación el gel se lavó con agua libre de RNasa (ver apéndice, pág. I), para eliminar el exceso de bromuro de etidio y pueda ser transferido.

Transferencia del ARN a una membrana de nylon.

El gel se colocó bajo un sistema de transferencia que contenía una pila de papeles secos que iban a permitir la transferencia del ARN por capilaridad hacia una membrana de nylon mediante un sistema de difusión de agua.

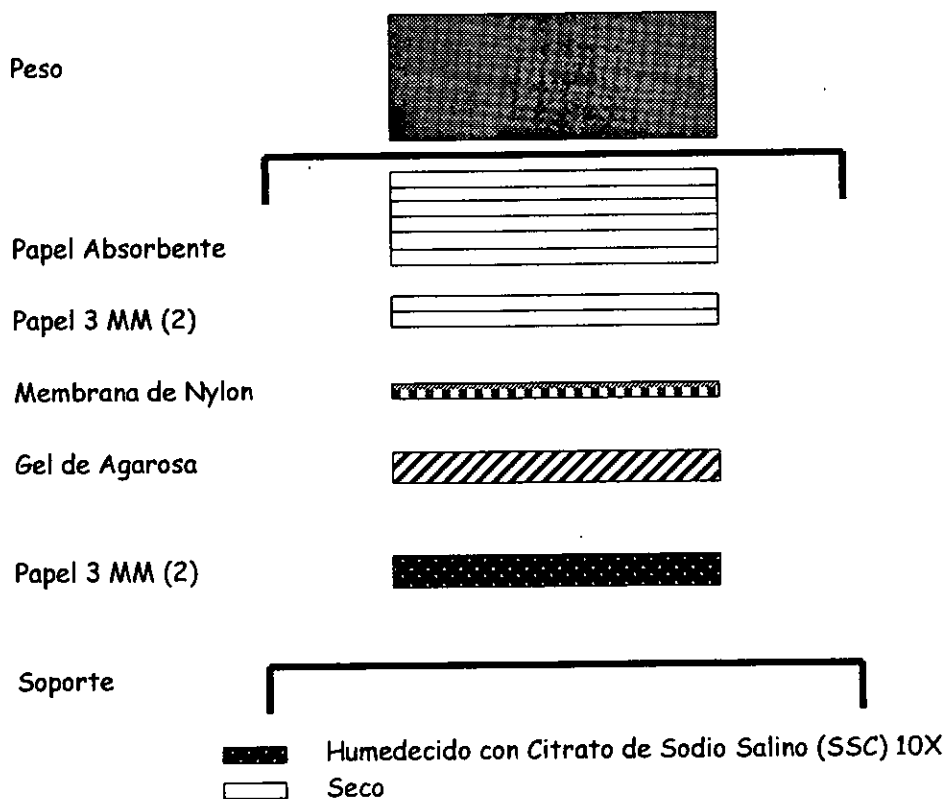


Figura 2. Diagrama de transferencia de ARN a una membrana de Nylon

Para llevar a cabo la transferencia se colocaron los papeles 3MM previamente humedecidos con solución amortiguadora con Citrato de Sodio Salino (SSC) 10x (ver apéndice, pág. III) sobre un acrílico limpio. A continuación se colocó sobre ellos el gel con los pozos mirando hacia abajo y con ayuda de un tubo de ensayo se retiraron las burbujas que pudieran formarse. Inmediatamente se colocó la membrana de nylon y nuevamente se eliminaron las burbujas.

Una vez concluido lo anterior se colocó el papel 3MM seco y sobre él, la pila de papeles absorbentes (Figura 2).

La transferencia se permite por alrededor de 12 horas.

Una vez transferido el ARN a la membrana de nylon se lavó con SSC 6x para quitarle los restos de agarosa adheridos y los cristales de sal, se dejó secar a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar, y posteriormente se fijó con luz ultravioleta en un horno de entrecruzamiento de luz uv a $120\ 000\ \mu\text{J}/\text{cm}^2$ durante 30 seg.

Dado que el siguiente paso en el análisis por Northern-blot es poner a hibridar dicha membrana de nylon con la sonda radiactiva correspondiente, se debió contar ya en este momento con la sonda contra la cual se iba a hidridar,

para lo cual se multiplicó la cantidad de plásmido que contenía la sonda a estudiar mediante la transformación de bacterias.

Reacción de Transformación.

Se partió de dos tubos que continúan 50 μL de células competentes de *E.coli* INV α F', las cuales fácilmente permiten la introducción de ADN extraño, además de que no requieren que se les adicione X-Gal para su detección ya que no expresan al represor *lac*. A cada tubo se añadieron 2 μL de β -mercaptoetanol (0.5 M). Se mezcló con la punta de la pipeta suave y cuidadosamente.

A continuación se adicionaron 2 μL de la solución que contenía al plásmido resuspendido (ver tabla en la sección de materiales, pág. 28) y se volvió a agitar con suavidad. Se incubó exactamente 30 min en hielo.

Concluido el tiempo, se dió un choque térmico a las bacterias a 42°C por 30 seg y posteriormente se colocaron nuevamente en hielo por 2 min.

En seguida se agregaron 450 μL de medio SOC (ver apéndice, pág. III) y se agitaron los tubos a temperatura ambiente por 1 hora a 37°C a 2.67 g en un agitador orbital.

Posteriormente se tomaron 50 y 100 μL del medio y se sembraron en dos cajas petri respectivamente que contenían medio Luria (LB) con 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ampicilina.

Se incubaron alrededor de 18 horas a 37°C y se eligieron las colonias blancas para realizar la purificación del plásmido, ya que estas colonias contenían el plásmido recombinante que tenía interrumpido el gen de la β -galactosidasa por el inserto de ADN que contiene la sonda molecular.

Se realizaron minipreparaciones de las colonias seleccionadas.

Mini-Prep para extracción de Plásmidos.

Para llevar a cabo esta técnica de purificación de plásmidos, se requirió cultivar a las células que contenían el plásmido en estudio, en medio líquido LB (Luria) con ampicilina, a 37°C por un tiempo mínimo de 8 horas.

Una vez logrado un crecimiento bacteriano adecuado, se centrifugaron las células a 842.4 G por 10 min a 4°C .

El paquete bacteriano se resuspendió en 200 μL de solución I (ver apéndice, pág. IV) fría (4°C) y dicha suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf. Se homogeneizó con vortex.

A continuación se adicionan 400 μL de la solución II (temperatura ambiente). Se homogeneizó manualmente. No debe usarse vortex.

Se agregó a la solución anterior 300 μL de solución III fría. Se homogeneizó por 10 seg con vortex y se colocó posteriormente por 3.5 min en hielo.

Transcurrido el tiempo, se centrifugó por 5 min a 7245 G a una temperatura de 4°C.

A continuación se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf y se extrajeron las proteínas con un volumen de la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (FCI).

Se tomó la fase acuosa y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100%) y 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.2 (ver apéndice, pág. IV), a -70°C por 15 min.

Posteriormente se centrifugó a 4°C, 15min a 7245 G. Se lavó el paquete con etanol al 70% (2 veces) y se resuspendió con agua.

Es conveniente verificar la purificación del plásmido por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%.

A continuación, los plásmidos purificados se cortaron con enzimas de restricción (EcoRI, XhoI, Hind III, XbaI, SalI) para liberar con ello el inserto,

que corresponde a un fragmento del gen que se estudia. Para ello, se colocaron 3 μL de algunas de las enzimas, más 3 μL de amortiguador que contiene la concentración de sales necesarias para la actividad óptima de la enzima, todo lo anterior más el volumen en el cual se resuspendió el paquete del plásmido. Se incubó a 37 °C por lo menos dos horas.

Hecho lo anterior, se volvió a realizar una electroforesis en gel de agarosa para verificar que las enzimas hubieran cortado el plásmido. Posteriormente se procedió a la purificación del inserto por medio de agarosa de bajo punto de fusión.

Purificación de fragmentos de ADN a través de una electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión.

Se corrió la electroforesis por 30 min a 80 volts y se separaron los fragmentos del ADN plasmídico. A continuación se cortó la banda de interés.

El trozo de gel se colocó dentro de un tubo Eppendorf y se licuó a 70°C por 15 min. Transcurrido el tiempo se completó con agua destilada a un volumen de 500 μL . A continuación se agregaron 5 μL de Glucógeno (20 mg/mL).

En seguida se desproteinizó la muestra con 1 volumen de Fenol absoluto amortiguado con Tris pH 7.4. Se mezcló vigorosamente en vortex (15 seg) y se centrifugó 5 min a 7245 G.

Se tomó la fase acuosa y se le agregó 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico. Se agitó en vortex y se centrifugó por 3 min a la misma velocidad. Se repitió esta extracción una vez más.

Se volvió a tomar la fase acuosa y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3 M por 15 min a -70°C .

Posteriormente se centrifugó durante 15min a 7245 G a 4°C . Se lavó el paquete de ADN con etanol al 70% (2 veces) y se resuspendió con un mínimo de agua (10 μL).

A continuación se utilizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % para identificar los insertos purificados y cuantificarlos. Para ello, se cargaron en el gel 2 μL de cada una de las soluciones con los purificados, junto con 2 μL de DNA mass ladder (marcador de masa molecular). Este marcador permitió observar el tamaño y la concentración del inserto.

Con este dato se procedió al marcaje del inserto que va a servir como sonda para llevar a cabo la hibridación.

Marcaje de la sonda Radiactiva por Cebador Aleatorio (Random Primer).

Se desnaturalizaron de 10 - 30 ng del inserto incubando a 100°C por 5 min. Transcurrido el tiempo se colocó en hielo por 5 min.

A continuación se añadieron 6 μL de amortiguador de $\text{Tris-SO}_4\text{-(NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-Mg}_2\text{SO}_4$, 6 μL de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) menos dCTP, aprox. 30 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP, agua hasta completar 30 μL y 1 μL del fragmento Klenow de la DNA pol I de *E.coli*. Se incubó a 37°C por 1 hora.

Concluido el tiempo se adicionaron 8 μL de EDTA (250 mM pH=8) y 160 μL de amortiguador con NaCl-Tris-EDTA (STE, ver apéndice, pág. IV) para detener la reacción.

En seguida se purificó la sonda marcada haciéndola pasar por una columna de Sephadex G-25.

Columna de Sephadex G-25.

Para la preparación de esta columna lo que se requirió es empacar una jeringa de insulina de 1 mL con la resina Sephadex G-25 hidratada con STE mediante centrifugación a 474 G por 4 min a temperatura ambiente.

Terminado este proceso, la columna se equilibró con 100 μ L de una solución de STE (2 veces), centrifugando nuevamente a 474 G por 4 min a temperatura ambiente.

A continuación se colocó la solución con la sonda marcada y se da una tercera centrifugación a la misma velocidad y temperatura.

Hibridación.

Primeramente se llevó a cabo la prehibridación, que consiste en colocar la membrana, que se obtuvo al transferir el ARN total y fijarlo con luz uv, en un tubo de hibridación con un volumen de alrededor de 15 mL de la solución de hibridación (ver apéndice, pág. V), por 1.5 horas, en un rango de 58 - 65°C (dependiendo de la sonda) en el horno de hidridación.

Durante este tiempo se realizó el marcaje radiactivo de la sonda con la cual se va a hibridar. Concluido el tiempo de prehibridación, la sonda marcada se desnaturalizó a 94°C por 5 min y posteriormente se colocó en hielo otros 5 min. En seguida se colocó la sonda radiactiva en el tubo de hibridación que contenía la membrana adecuada junto con 5 mL de solución nueva de hibridación atemperada. Se dejó hibridando con rotación continua a la temperatura designada durante 12 - 20 horas.

Transcurrido el tiempo de hibridación se realizaron dos lavados de 10 min cada uno con la solución A o B (ver apéndice, pág. V), a la temperatura de la hibridación.

Terminados los lavados, la membrana se envolvió en una película plástica y se expuso a una película autorradiográfica. El tiempo de exposición depende de que tan intensa sea la marca en la membrana.

RESULTADOS.

Con el fin de cumplir con el objetivo planteado en el presente trabajo, se llevaron a cabo ensayos tipo Northern-blot, para los cuales era necesario contar con membranas que tuvieran unido covalentemente el ARN total, con la finalidad de hibridar con sondas de ADN marcadas radiactivamente y así tener híbridos ARN-ADN que pudieran ser detectados. Las sondas empleadas para los experimentos fueron donadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para lograr lo anterior, primeramente se llevó a cabo la purificación del ARN total a partir de semillas secas, de semillas osmoacondicionadas por 3, 5 y 10 días, de semillas germinadas por 5, 15 y 24 horas previo tratamiento de 10 días de osmoacondicionamiento y de semillas no osmoacondicionadas (control) germinadas por 5, 15 y 24 horas.

Una vez que las muestras de ARN de todos los tiempos se purificaron por el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi a base de isotiocianato de guanidina modificado comercialmente y denominado Trizol®, fue conveniente llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con la finalidad de observar el grado de pureza y la calidad del ARN recién obtenido.

En el gel de la Fig. 3 se observan dos bandas bien definidas, las cuales corresponden al tamaño de los dos ARN ribosomales. La nitidez de estas bandas es un indicativo de la pureza del ARN aislado.

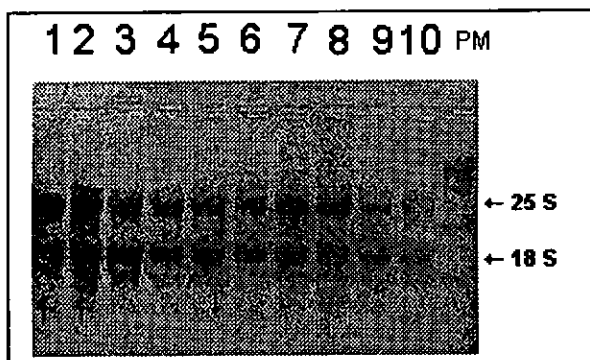


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del ARN total obtenido de ejes embrionarios de maíz. Semilla seca (**carril 1**), semillas osmoacondicionadas por 3, 5 y 10 días (**Carriles 2-4**), semillas germinadas por 5, 15 y 24 horas post-osmoacondicionamiento (**carriles 5-7**) y semillas control germinadas por 5 y 15 horas (**carriles 8 y 9**).

Por otro lado, se llevó a cabo la purificación de la sonda con la cual se llevaría a cabo la hibridación.

Primeramente se transformaron bacterias con el plásmido que contenía la sonda correspondiente; una vez amplificado éste en la bacteria, se purificó y

finalmente el plásmido se cortó con enzimas de restricción para liberar el inserto que contenían. Lo anterior se verificó mediante otro gel de agarosa (Figura 4).

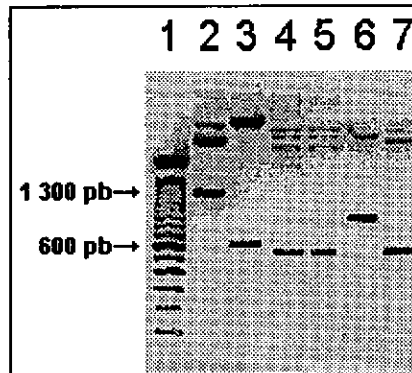


Figura 4. Purificación de Plásmidos y liberación de insertos con enzimas de Restricción. **Carril 1:** Peso Molecular (100 pb), **Carril 2:** Sonda para dehidrina de cebada liberada con Hind III, **Carril 3:** Sonda para HSP 17.6 de maíz liberada con Xba I y Sal I, **Carril 4:** Sonda para HSP 17.6 de girasol liberada con EcoR I, **Carril 5:** Sonda para HSP 17.9 de girasol liberada con EcoR I, **Carril 6:** Sonda para Rab 17 de maíz liberada con EcoR I y Xho I y **Carril 7:** Sonda para Rab 28 de maíz liberada con EcoR I.

Con ambos ácidos nucleicos ya listos, se llevó a cabo la hibridación, probando para cada sonda diferentes condiciones de temperatura y astringencia, con el fin de obtener la mejor señal.

A continuación, se describirán las condiciones empleadas para cada sonda y as características propias de cada una.

Genes Rab

Rab 17 (maíz).

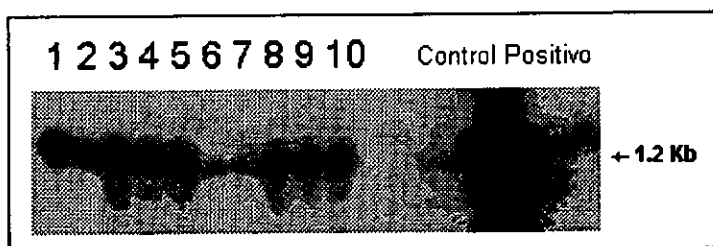
Se sabía de antemano que esta sonda era homóloga para maíz, por lo cual se procedió a realizar la hibridación a alta temperatura por 20 horas. Posteriormente se retiró la sonda y la membrana se lavó dos veces con una solución de SSC 0.2x y SDS 0.1% por un tiempo de 5 min. A continuación se llevaron a cabo otros dos lavados con la misma solución, manteniendo también para este caso una temperatura de 65°C.

Hecho lo anterior, la membrana hibridada se dejó exponiendo con una película fotográfica por dos días. Transcurrido el tiempo se reveló y se observó el siguiente comportamiento (Figura 5,A):

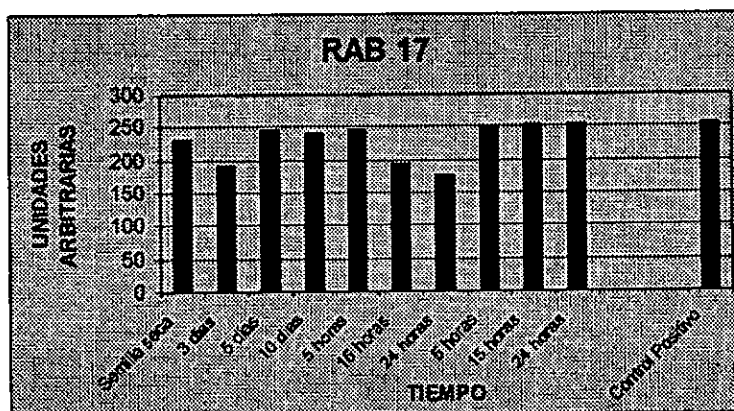
La expresión de *rab 17* presenta un transcrito que se encuentra presente en buena cantidad en semilla seca (carril 1). Una vez que se somete a las semillas a OSMA por 3 días, la cantidad de este mensaje disminuye drásticamente (carril 2), para volverse a incrementar, incluso por arriba del nivel en semilla seca, hacia los 5 días de OSMA (carril 3) y permanecer así hasta los 10 días de tratamiento (carril 4). Sin embargo, una vez que a las semillas se les removió el polietilén-glicol (PEG) y se colocaron en condiciones óptimas de humedad para que ocurra la germinación, la cantidad de ARN mensajero volvió a disminuir conforme transcurrió la germinación,

para desaparecer casi totalmente a las 24 horas (carriles 5 - 7). Durante la germinación de las semillas control no se observa cambio alguno en la cantidad de ARN mensajero, puede decirse que permanece constante. No existe inducción de la expresión del gen durante la germinación de semillas control mientras que si existe durante el Osmocondicionamiento.

A



B



C

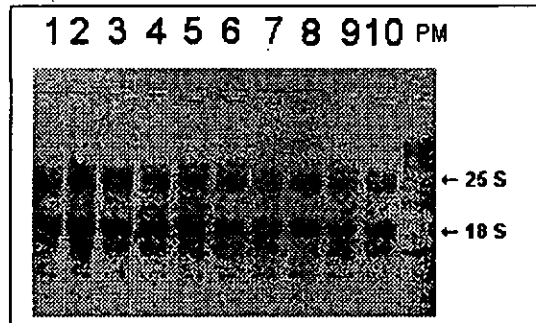


Figura 5. A. Northern-blot del gen rab 17 a partir de ARN total de ejes embrionarios de maíz. **Carril 1** (Semilla Seca); **Carriles 2 - 4** (Semillas OSMA de 3, 5, 10 días); **Carriles 5 - 7** (Germinación de semillas por 5, 15 y 24 horas después de OSMA); **Carriles 8 - 10** (Germinación Normal de 5, 15 y 24 horas).

B. Porcentaje relativo de marca radiactiva incorporada correspondiente a cada una de las señales observadas en **A**.

C. Control de Cargado de ARN total. El número de carril corresponde a las muestras en **A**.

Rab 28 (maíz).

Para lograr la hibridación de esta sonda se probó inicialmente una temperatura de 65° C pero la hibridación no se observó, por lo que se requirió probar otras condiciones específicas (tanto de temperatura como de concentración de sales para los lavados). El tiempo de lavado de 10 min.

Temperatura de Hibridación (° C)	Condiciones de lavado (astringencia)
65	0.2x SSC 0.1% SDS
62	0.1x SSC 0.1% SDS
60	1x SSC 1% SDS
58	1x SSC 1% SDS
55	1 x SSC 1 % SDS

Una vez probadas todas las condiciones antes mencionadas de hidridación, también se dejó exponiendo tiempos prolongados ya que la señal proporcionada por el contador de centelleo era demasiado débil para ser detectada inmediatamente. Se expuso por 5, 8 y 15 días. Pero a pesar de lo anterior, esta sonda no mostró señal alguna de hidridación. Para desechar la posibilidad de que la falta de señal se debiera a que las condiciones de hibridación no fueran las adecuadas, en cada membrana se cargaba además del ARN total de cada uno de los diferentes tiempos, un control positivo que correspondía a la misma sonda, el cual siempre daba la señal positiva.

Genes Hsp

Hsp 17.6 y Hsp 17.9 (girasol).

Dado que estas sondas eran heterólogas, se probaron diferentes condiciones de hibridación para obtener una buena señal de hibridación con el ARN total de maíz.

Se probaron las siguientes condiciones :

Temperatura de Hibridación (° C)	Condiciones de lavado (astringencia)
65	0.2x SSC 0.1% SDS
62	0.1x SSC 0.1% SDS
60	1x SSC 1% SDS
58	1x SSC 1% SDS
55	1 x SSC 1 % SDS

Al igual que para la sonda de *rab 28*, estas sondas no muestran hibridación ADN-ADN y tampoco con el ARN total de maíz.

Hsp 17.6 (maíz).

A pesar de que se trataba de una sonda homóloga, se tuvo que probar una condición menos severa de hibridación ya que a 65°C de temperatura no se encontró señal. Se encontró que a 62°C de temperatura y dos lavados de 0.1x SSC y 0.1%

SDS por 10 min a la misma temperatura, y exponiendo 5 días, se obtenía una excelente señal.

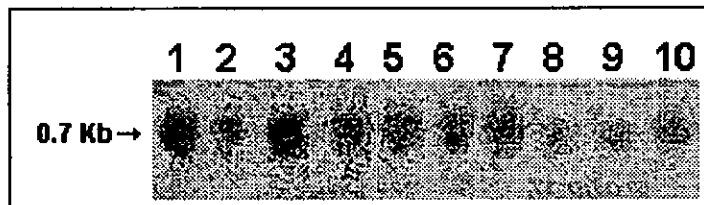
La autorradiografía reveló lo siguiente :

Como se puede observar en la en la figura 6,A la expresión del gen que codifica para la *hsp 17.6* presenta un transcrito que se encuentra en la semilla seca (carril 1). Una vez que las semillas se someten al tratamiento de OSMA, la cantidad del mensaje disminuye durante los primeros 3 días de osmoacondicionamiento (carril 2), para volverse a incrementar, incluso por arriba del nivel en semilla seca, hacia los 5 días de OSMA (carril 3) y disminuir ligeramente, hacia los 10 días de OSMA (carril 4) y permanecer así hasta las primeras horas de la germinación subsecuente al osmoacondicionamiento (carril 5).

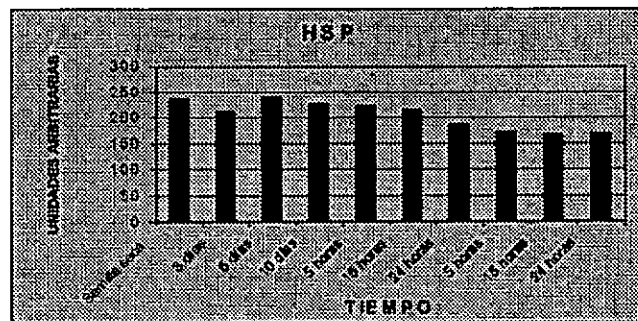
Sin embargo, la cantidad de ARN mensajero vuelve a disminuir conforme transcurre la germinación, hasta casi desaparecer hacia las 24 horas (carriles 6 y 7). Durante la germinación de semillas control (Germinación normal), la cantidad de ARN mensajero no varía apreciablemente. Este resultado es similar a lo que ya se había observado para *Rab 17*, lo cual también indica que la expresión del gen únicamente es estimulada por las condiciones hídricas características del osmoacondicionamiento y que el tratamiento de OSMA de alguna manera

desestabiliza al mensaje pues este desaparece durante la germinación subsecuente, a diferencia de la germinación normal.

A



B



C

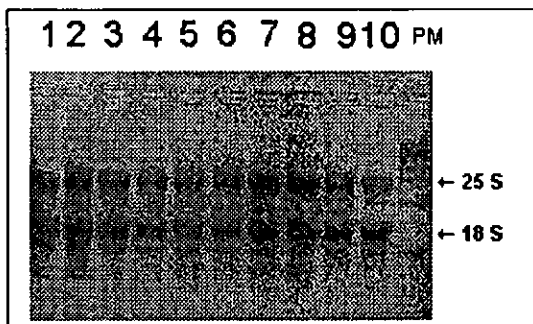


Figura 6. A. Ensayo tipo Northern-blot para el gen *hsp 17.6* a partir de ARN total de ejes embrionarios de maíz. **Carril 1** (semilla seca); **Carriles 2 - 4** (semillas OSMA de 3, 5, 10 días); **Carriles 5 - 7** (germinación de semillas por 5, 15 y 24 horas después de OSMA); **Carriles 8 - 10** (germinación normal de 5, 15 y 24 horas).

B. Porcentaje relativo de marca radiactiva incorporada correspondiente a cada una de las señales observadas en **A**.

C. Control de Cargado de ARN total. Los carriles corresponden a los tiempos en **A**.

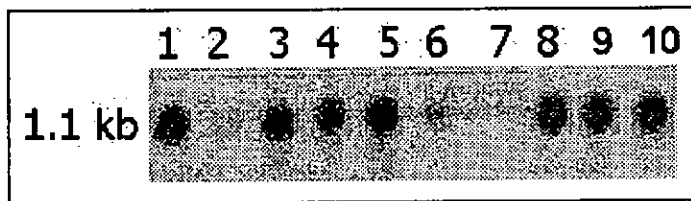
Dehidrina (cebada).

Para esta sonda también se requirió de probar diferentes condiciones de hibridación y se encontró que a 60°C de temperatura y dos lavados de con la mezcla 0.1x SSC y 0.1% SDS por 10 min a la misma temperatura, y un tiempo de exposición de 5 días, se obtenía una excelente señal.

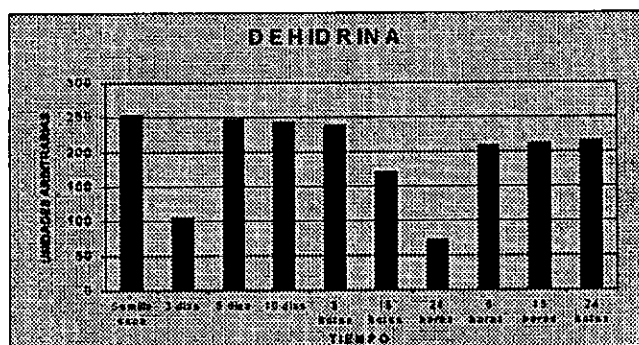
En la Figura 7,A se observa que el transcrito del gen que codifica para la *Dehidrina*; al igual que el de *rab 17* y *Hsp 17.6* se encuentra muy abundante en la

semilla seca (carril 1) y una vez que se somete a las semillas al Osmoacondicionamiento la cantidad de este mensaje disminuye drásticamente hacia los primeros 3 días de tratamiento (carril 2), para volverse a incrementar, aunque por debajo del nivel en la semilla seca, hacia los 5 y 10 días de OSMA (carril 3 y 4). Sin embargo, una vez que las condiciones hídricas son restablecidas, la cantidad de ARN mensajero vuelve a disminuir conforme transcurre la germinación, para desaparecer totalmente hacia las 24 horas (carriles 5 - 7). Durante la Germinación normal la cantidad de ARN mensajero no varía, aunque dicha cantidad es menor a la observada en la semilla seca.

A



B.



C.

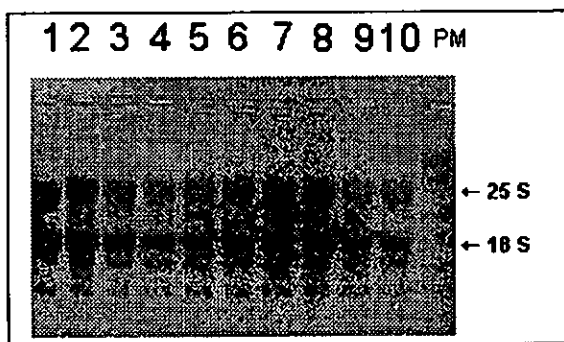


Figura 7. A. Northern-blot para el gen *Dehidrina* realizado a partir de ARN total de ejes embrionarios de maíz. **Carril 1** (semilla seca); **Carriles 2 - 4** (semillas OSMA de 3, 5, 10 días); **Carriles 5 - 7** (germinación de semillas por 5, 15 y 24 horas después de OSMA); **Carriles 8 - 10** (germinación normal de 5, 15 y 24 horas).

B. Porcentaje relativo de marca radiactiva incorporada correspondiente a cada una de las señales observadas en **A**.

C. Control de Cargado de ARN total. El número de carril corresponde a los tiempos establecidos en **A**.

DISCUSIÓN.

El Osmoacondicionamiento es una técnica mediante la cual se puede controlar la cantidad de agua que ingresa a la semilla; este hecho permite que la semilla realice procesos fisiológicos similares a los que ocurren durante la germinación temprana, sin que la germinación concluya. Lo anterior llevó a pensar que durante el osmoacondicionamiento se tenía un estado metabólico intermedio, ya que no se establece la germinación propiamente dicha, aunque esta se acelera cuando las condiciones óptimas de humedad se reestablecen; por otro lado, se tienen evidencias que la restricción en la cantidad de agua puede dar como resultado la expresión de respuestas moleculares que permiten la protección de las semillas a la desecación, sugiriendo que la semilla durante el osmoacondicionamiento pudiera encontrarse también en el estado metabólico anterior, el de embriogénesis tardía.

Con base en esto, resultó de gran interés estudiar si el osmoacondicionamiento es una técnica que permite observar únicamente los eventos que ocurren durante los primeros momentos de la germinación o si

efectivamente en el estado de osmoacondicionamiento se presentan características de ambos estados metabólicos (embriogénesis y germinación).

Se decidió estudiar el efecto del OSMA sobre la embriogénesis tardía, para lo cual se eligieron tres tipos de genes los cuales son inducidos durante esta etapa. Dichos genes codifican para proteínas *LEA* (dehidrina), proteínas *RAB* y proteínas *HSP*, los cuales se expresan cuando el potencial hídrico de las semillas disminuye al final de su desarrollo, lo cual permitiría establecer si el estrés generado durante el osmoacondicionamiento puede reproducir las condiciones hídricas presentes al final de la formación de las semillas y por lo tanto ocasionar la expresión de estos genes.

Al analizar los resultados obtenidos se observó que tres de los seis genes estudiados presentan comportamientos similares en las condiciones que se probaron (Osmoacondicionamiento, germinación subsecuente al OSMA y germinación control). Dichos genes son *rab 17*, *dehidrina* y *hsp 17.6*. El comportamiento observado fue el siguiente: Al iniciarse el tratamiento de Osmoacondicionamiento, la expresión de estos genes y/o la cantidad de mensaje presente disminuye casi totalmente, lo cual podría deberse a que la

semilla se embebe para reactivar su metabolismo, lo que indicaría que la germinación comienza, condición en que los mensajeros propios de la embriogénesis son degradados. Al continuar el tratamiento de OSMA, la semilla percibe que la cantidad de agua presente en su entorno no es suficiente para proseguir con el proceso germinativo, lo que aparentemente ocasiona una resíntesis de productos del estado metabólico anterior, la embriogénesis, en respuesta al estrés que está sintiendo; así, los mensajes se reacumulan a niveles similares o mayores a los presentes en semilla seca. Cuando las condiciones hídricas son reestablecidas durante la germinación subsecuente, el mensaje es degradado conforme ésta transcurre.

En todos los casos anteriores se vio que durante la germinación control, es decir, semillas que no fueron tratadas con polietilén-glicol (PEG), la cantidad de mensaje permanece aparentemente constante, al menos hasta las 24 horas de germinación, lo que puede explicarse si se considera que durante este tiempo, las semillas control están llevando a cabo los rearrreglos necesarios para poder pasar al siguiente estado metabólico, el establecimiento de la plántula, de una manera asincrónica; en las semillas osmoacondicionadas este reajuste debió ocurrir durante el tratamiento; es por ello que cuando las

ESTAS SEMILLAS NO DEBEN
VERSE EN ESTA VISTA
SINO EN LA BIBLIOTECA

condiciones hídricas son reestablecidas, se acelera la degradación de moléculas que no son necesarias para la germinación pero que podrían ser importantes para proporcionar los elementos necesarios para la restauración celular y tisular durante el establecimiento de la plántula.

De acuerdo a los resultados encontrados, los genes propios de embriogénesis tardía fueron expresados durante el tratamiento por Osmoacondicionamiento, sugiriendo que el Osmoacondicionamiento simula algunas de las condiciones presentes durante la embriogénesis tardía.

También ha sido importante estudiar el efecto del osmoacondicionamiento sobre algunos procesos de la germinación, ya que comprender la regulación a nivel molecular del proceso germinativo resulta una labor complicada, debido a la asincronía que presentan las células de las semillas dentro de una población en vías de germinar, como resultado de las diferencias en composición genética de cada individuo y en la heterogenidad celular en los ejes embrionarios de las semillas, lo cual hace sumamente difícil ubicar los tiempos durante el proceso germinativo en los cuales se reactiva y regula la continuación del crecimiento del embrión. El osmoacondicionamiento

permite sincronizar la germinación de las semillas e iniciar el metabolismo germinativo sin que se concluya con la emergencia de la radícula, ocasionando que cuando las condiciones hídricas son reestablecidas la germinación sea rápida y uniforme y los eventos metabólicos ocurran en tiempos similares en las células de los diferentes tejidos proliferativos. El estudio del ciclo celular bajo estas condiciones ha sido abordado en forma intensiva por nuestro grupo de trabajo.

CONCLUSIONES.

- ↶ El osmoacondicionamiento es un estado de estrés hídrico que permite la expresión de genes propios de embriogénesis tardía; entre estos se encuentran los genes que codifican para las proteínas Rab 17, HSP 17.6 homóloga de maíz y Dehidrina.

- ↶ La expresión de estos genes es "sui generis" ya que dicha expresión es precedida de la rápida desaparición de los correspondientes mensajes presentes en la semilla seca, durante las primeras horas del OSMA.

- ↶ Lo anterior sugiere que las semillas expuestas a OSMA atraviesan por 2 estados metabólicos durante el tratamiento, que simulan una transición de un proceso germinativo a uno semejante a la embriogénesis tardía.

- ↶ Los objetivos propuestos fueron cubiertos y la hipótesis establecida se comprobó.

APÉNDICE.

Osmoacondicionamiento.

- ♦ *Captán* (0.15%): Se pesan 0.300 g de *Captán* y se disuelven en 200 mL de Agua destilada.
- ♦ *Polietilén-glicol 8000* (38%): Pesar 190 g de polietilén-glicol y disolverlo en 500 mL de agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Purificación de ARN a partir de ejes embrionarios por el Método de Chomczynski y Sacchi (TRIZOL®)

- ♦ *Cloroformo-alcohol isoamílico* (50:1): Se mezcla 1 mL de alcohol isoamílico con 49 mL de cloroformo.

- ♦ *Agua libre de RNasa* : Se agrega 1 mL de dietilpirocarbonato (DEPC) a 1 L de agua destilada y desionizada, se agita por toda la noche y se esteriliza 15 min. a 20 lb² en Autoclave.

Calibración de ARN.

- ♦ *Amortiguador Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 50x*: Se pesan 121g de Tris base, se le adicionan 28.55 mL de ácido acético glacial y 50 mL de EDTA 0.5 M pH= 8. Se afora a 500 mL con agua destilada y se esteriliza en autoclave.
- ♦ *Amortiguador TAE de carga (2x)*: TAE 2x, glicerol 50 % y azul de bromofenol.
- ♦ *Gel de agarosa (1.2%)*: Pesar 0.360g de agarosa y se disuelven en agua destilada. Se calienta hasta lograr su disolución. Se deja enfriar a temperatura ambiente hasta aprox. 40°C y se le adicionan 600 µL de amortiguador TAE y 5 µL de bromuro de etidio. Se afora a 30 mL.

Análisis tipo Northern-blot

- ♦ *Ácido etilén-1,2-diamino-tetracético (MOPS) 10x*: Se pesan 41.2 g de MOPS y se disuelven en 800 mL de agua destilada, a continuación se adicionan 13.33 mL de solución de acetato de sodio 3 M. La mezcla

anterior se ajusta a pH=7 con NaOH. Enseguida se añaden 10 mL de EDTA 0.5 M pH=8. Se esteriliza por filtración.

- ♦ *Amortiguador MOPS de carga (2x)*: MOPS 2x, glicerol 50 % y azul de bromofenol.
- ♦ *Acetato de Amonio (7 M)*: Se pesan 26.98 g de acetato de amonio y se disuelven en agua destilada. Se aforan a 50 mL y se esterilizan en autoclave.

Transferencia de geles

- ♦ *Solución SSC (20x)*: Disolver 100 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH=7 con un poco de solución de NaOH 10 N. Aforar a un volumen de un litro. Esterilizar en autoclave.

Reacción de Transformación

- ♦ *Medio SOC* : Se mezcla peptona al 2%, con 0.5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM de MgCl₂ y 20 mM de glucosa.

- ♦ *Medio Luria (sólido)*: Se mezcla peptona al 1e, con Extracto de levadura 0.5% y NaCl al 1% pH=8. Para medio sólido agregar 15 g/L de agar-agar. Se esteriliza en autoclave.

Mini-Prep para extracción de Plásmidos

- ♦ *Medio Luria (LB)*: Para preparar 100 mL se pesan 1.0 g de peptona, 0.5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl y agua destilada para aforar a 100 mL. Se esteriliza en autoclave.
- ♦ *Solución I*: glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM (pH=8).
- ♦ *Solución II*: NaOH 0.2 N y SDS 1%
- ♦ *Solución III*: acetato de potasio 5M (60%), ácido acético glacial (11.5%) y agua (28.5%).
- ♦ *Acetato de Sodio (3M)*: Se pesan 204.05 g de acetato de sodio • 3 H₂O y se disuelve en 400 mL de agua destilada. Se ajusta el pH = 5.2 con ácido acético glacial y posteriormente se afora a 500 mL.

Marcaje de Sonda Radiactiva por Cebador Aleatorio (Random Primer).

- ♦ *Amortiguador con NaCl-Tris-EDTA (STE)*: Se coloca Tris -HCl 10 mM pH=8, EDTA 1 mM pH=8 y NaCl 100 mM.

Hibridación.

- ◆ Solución de Hibridación : Se mezcla fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 150 mM con fosfato disódico (Na_2HPO_4) , 7 % de SDS y 1 mM EDTA pH=8.
- ◆ *Solución A* : Contiene SSC 0.1 x y SDS 0.1 %
- ◆ *Solución B* : Contiene SSC 1 x y SDS 1 %

BIBLIOGRAFÍA.

- » Allen, R.D., Nessler, C.L., Thomas, T.L., "Developmental expression of sunflower 11s storage protein genes", *Plant Mol Biol*, 5:165-173, (1985).
- » Almoguera, C., Jordano, J., "Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and *Lea* mRNAs", *Plant Mol Biol*, 19:781-792, (1992).
- » Ashraf, M., Bray, C.M., "DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrum* L.) seeds and evidence for repair and replication", *Seed Sci Res*, 3: 15-23, (1993).
- » Atkinson, B.G., Raizada, M., Bouchard, R.A., Frappier R.A., Waalden D.B., "The independent stage-specific expression of the 18 kDa heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays* L.", *Dev Genet*, 14:15-16, (1993).
- » Baker, J., Steele, C., Dure, L. III, "Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton", *Plant Mol Biol*, 11:277-291, (1988).
- » Bewley, J.D., Black, M., "SEEDS. Physiology of Development and Germination", 2nd ed., Plenum Pub. Corp., New York, USA., p. 653, (1994).
- » Bidwell, R.G.S., "Fisiología Vegetal", A.G.T. Editor, 1^a. edición en Español, México, p. 753 - 761, (1979).
- » Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L., Leopold, A.C., "Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean", *Plant Physiol*, 96:868-874, (1991).
- » Bostock, R.M., Quatrano, R.S., "Regulation of *Em* gene expression in rice. Interaction between osmotic stress and abscisic acid", *Plant Physiol*, 98: 1356-1363, (1992).

- » Bradford, K.J., "Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions", *Hort. Sci.* 59:672-676, (1986).
- » Bray, C.M., Davison P.A., Ashraf, M., Taylor, M., "Biochemical changes during priming of leek seed", *Ann of Bot* 63:185-193, (1989).
- » Bray, E.A., "Molecular Responses to water Deficit", *Plant Physiol*, 103:1035-1040, (1993).
- » Coca, M.A., Almoguera, C., Jordano, J., "Expression of sunflower low molecular weight heat shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications", *Plant Mol Biol*, 25:479-492, (1994).
- » Côme, D., Corbineau, F., "Some aspects of metabolic regulation of seed germination and dormancy", In R.B. Taylorson (ed.), *Recent advances in the development and germination of seeds*. Plenum Press, New York, p. 245-258, (1989).
- » Cruz-García, F., Jiménez, L.F., Vázquez-Ramos, J.M., "Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds", *Seed Sci Res*, 5: 15-23, (1995).
- » Cruz, F., "Cambios Bioquímicos y Moleculares en los estados pregerminativo y germinativo en Semillas de Maíz", Tesis Doctoral, p. 1-23, 40-56, Facultad de Química, UNAM., (1997).
- » Chirico, W.J., Waters, M.G., Blobel, G., "70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes", *Nature*, 332:805-810, (1988).
- » Davison, P.A., Bray, C.M., "Protein synthesis during osmopriming of leek (*Allium porrum*) seeds. *Seed Sci Res*, 1: 29-35, (1991).

- » Dell' Aquila, A. Bewley, J.D., "Protein synthesis in the axes of polyethylene glycol treated pea seeds and during subsequent germination", *J of Exp Bot*, 40: 1001-1007, (1989).
- » Dure, L. III, "The LEA proteins of higher plants", In: Verma DPS (ed) *Control of Plant gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 325-336 (1993).
- » Dure, L. III, Crouch, M., Harada, J., Ho T-HD., Mundy, J., et al., "Common amino acid sequence domains among the Lea proteins of higher plants", *Plant Mol Biol*, 12:475-486, (1989).
- » Dure, L. III, "A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation", *Plant J.*, 3(3): 363-369, (1993).
- » Galau, G.A., Wang, HY-C., Hughes, D.W., "Cotton Lea 5 and Lea 14 encode atypical late embryogenesis-abundant proteins", *Plant Physiol*, 101:695-696, (1993).
- » Galau, G.A., Hughes, D.W., Dure, L. III, "Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (LEA) mRNAs", *Plant Molecular Biology*, 7:155-170, (1986).
- » Galau, G.A., Bijaisoradat, N., Hughes, D.W., "Accumulation Kinetics of cotton late embryogenesis abundant mRNA and storage protein mRNAs: Coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid", *Dev. Biol.*, 123:198-212, (1987).
- » Goday, A., Jensen, A.B., Culianez-Macia, F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pagès, M., "The maize abscisic acid-responsive protein rab 17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals", *Plant Cell*, 6:351-360, (1994).

- » Gómez, A., "Modificación de la Expresión Génica por Bencil-Adenina en Ejes Embrionarios de Maíz, determinada por Differential Display", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM., p. 1- 11, (1997).
- » Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E., Dudits, D., "Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis", *Plant Mol Biol*, 16:999-1007, (1991).
- » Heikkila, J. J., "Heat shock gene expression and development". II. An overview of mammalian and avian development system. *Devel Genet*, 14:87-91, (1993).
- » Hergaty, T.W., "The physiology of seed hydration and dehydration and the relation between water stress and control of germination" : a review, *Plant Cell and Env.* 1: 101-119, (1978).
- » Heydecker, W., Coolbear, P., "Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis", *Seed Sci. and Tech.*, 5: 353-425, (1977).
- » Howarth, C., "Heat shock proteins in *Sorghum bicolor* and *Pennisetum americanum*. II. Stored RNA in sorghum seed and its relationship to heat shock protein synthesis during germination", *Plant Cell Envir*, 13:57-64, (1990).
- » Jugenheimer, R.W., "Corn. Improvement, Seed Production and Uses", John Wiley & Sons., U.S.A., p. 256 -274, (1976).
- » Kermode, A.R., "Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment", In: Kigel, J. and G. Galili (eds.). *Seed development and germination*. Marcel Dekker, Inc., U.S.A., p. 273-332, (1995).
- » Kozlowski, T.T., Gunn, C.R., "Importance and Characteristics of Seeds", In: Vol. 1, *Importance and Characteristics, Seed Biology: Physiological Ecology Series*, Academic Press, Inc., U.S.A., p. 1-7, 228-251, (1972).

- » Leprince, O., Hendry, G.A.F., McKersie B.D., "The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds", *Seed Sci. Res.*, 3:231-246, (1993).
- » Lindquist, S., Craig, E.A., "The heat-shock proteins", *Annu Rev Genet*, 22:631-677, (1988).
- » Lisse, T., Bartels, D., Kalbitzer, H.R., Jaenicke, R., "The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional in its native state", *Biol. Chem.* 377:555-561, (1996).
- » Magnard, J.L., Vergne, P., Dumas, C. "Complexity and genetic variability of heat shock protein expression in isolated maize microspores", *Plant Physiology*, 111: 1085-1096, (1996).
- » Mayer, A.M., Poljakoff-Mayber, A., "The Germination of Seeds", 4th ed., Pergamon Press, Great Britain, p. 1-21, (1989).
- » Mundy, J., Chua, N-H., "Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene", *EMBO J.*, 7(8): 2279-2286, (1988).
- » Quatrano, R.S., Gultinan, M.J., Marcotte, K.B., "Regulation of gene expression by abscisic acid", In: Verma DPS (ed) *Control of Plant Gene Expression*, Telford Press, Caldwell, NJ, p. 351- 357, (1993).
- » Riccardi, F., Gazeau, P., De Vienne, D., Zivy, M., "Protein Changes in Response to Progressive water Deficit in Maize", *Plant Physiol*, 117:1253-1263, (1998).
- » Ried, J.L., Walker-Simons, M.K., "Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.)", *Plant Physiol*, 102:125-131, (1993).
- » Robertson, J.A., Chapman Jr., G.W., Wilson Jr., R.L., "Relation of days after flowering to chemical composition and physiological maturity of sunflower seed", *J Am Oil Chem Soc*, 55:266-269, (1978).

- » Sánchez, M.P., "Osmocondicionamiento de Semillas de Frijol y su efecto en eventos Bioquímicos pre y post Osmocondicionamiento", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, p. 4-17, (1996).
- » Sánchez-Jiménez, M.P., Cruz-García, F., Covarrubias, A., Vázquez-Ramos, J.M., "Osmopriming of bean seeds: set up and characterization", *Agrociencia*, 31: 305-311, (1997).
- » Schöffl, F., Prändl, R., Reindl, A., "Regulation of the Heat-Shock Response", *Plant Physiol*, 117:1135-1141, (1998).
- » Skriver, K., Mundy, J., "Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress", *Plant Cell*, 2:503-512, (1990).
- » Vierling, E., Sun, A., " Development expression of heat shock proteins in higher plants", In: Cherry J (ed) *Environmental Stress in Plants. Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance in Plants*, pp. 343-354. Springer-Verlag, New York, (1987).
- » Zársky, V., Garrido, D., Eller, N., Tupy, J., Vicente, O., Schöffl, F., Heberle-Bors, E., "The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation", *Plant Cell Environ*, 18:139-147, (1995).
- » Zeevaart, J.A.D., Creelman, R.A., "Metabolism and physiology of abscisic acid", *Plant Mol Biol*, 39:439-473, (1988).