

22  
Rej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE UNA CLONA GENOMICA  
CORRESPONDIENTE A UN GEN GERMINACION  
ESPECIFICO DE MAIZ

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**FABIOLA JAIMES MIRANDA**

MEXICO, D. F.

1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

278491



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Quintero Ruíz Angelina

VOCAL: Prof. Hernández Montes Homero

SECRETARIO: Prof. Vázquez Ramos Jorge Manuel

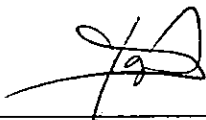
1er. SUPLENTE : Prof. Rodríguez Sotres Rogelio

2do.SUPLENTE : Prof. Ruiz Terán Francisco

Sitio donde se desarrollo el tema :

Laboratorio 114. Departamento de Bioquímica, Conjunto E. Facultad de  
Química. UNAM.

Asesor del Tema:



---

Jorge Manuel Vázquez Ramos

Supervisor Técnico:



---

Francisco Javier Plasencia de la Parra

Sustentante



---

Fabiola Jaimes Miranda

A mis padres **Felisa Miranda Y Jaime Jaimes** Por todo su apoyo, orientación e impulso que hicieron que todo su apoyo, orientación e impulso se agradeciera en estas líneas justo en este trabajo.

A mis hermanos **Vero y Jalme** por todas esas cosas que han hecho de nosotros un equipo inseparable.

A mi Abuela **Felisa Pérez** por brindarnos siempre lo mejor de ella.

A **Huemanzin** con mucho cariño.

A todos los amigos del Departamento de Bioquímica: **Maripaz, Manuela, Pilo, José Juan, Ivonne, Edurne, Alma, Alberto, Maritzel, Ricardo, Lahoucine.**

Al Dr. **Jorge Vázquez** quien hizo posible la realización de este trabajo.

Al Dr. **Javier Plasencia** por todo su apoyo que fue indispensable en este trabajo.

Al Dr. **Felipe Cruz García** por haber comenzado toda esta historia y enseñarme que la ciencia es una forma de ser.

A mis amigos **Katia y Marcos** que siempre tuvieron entusiasmo para compartir y a **Abigail** por ser una gran amiga.

A mi familia Cuicanzin: **Aida Margarita, Cecilia, Leticia, Ariadna, Daniel.**

Y en forma muy especial..... a **Abel Isaias.**

# ÍNDICE

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Germinación	2
Factores Intrínsecos: Fitorreguladores	4
Factores Extrínsecos	7
Osmoacondicionamiento de semillas de maíz	9
ANTECEDENTES INMEDIATOS	13
OBJETIVOS	17
METODOLOGÍAS Y ESTRATEGIAS	18
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	40
BIBLIOGRAFÍA	45
APÉNDICE	53

## RESUMEN

El gen de maíz denominado AA9.24.1, fue aislado durante el estudio de la expresión genética diferencial entre un estado de germinación acelerada por osmocondicionamiento y el estadio de germinación normal.

El gen AA9-24.1 se expresa durante la germinación subsecuente a un tratamiento de osmocondicionamiento encontrándose el transcrito desde las 15 horas mientras que en germinación normal se detecta a las 24 horas. La expresión de este gen es mayor en el meristemo radical que en el tallo.

La clona aislada de cDNA de AA9-24.1 tiene un tamaño de 690 pb y el RNA mensajero completo se ha estimado en 4000 pb.

Con el fin de aislar el gen correspondiente se realizó un sondeo de una biblioteca genómica de DNA de maíz, utilizando la clona de cDNA como sonda. El resultado del sondeo fue una clona genómica de 14 Kpb con un sitio interno de corte (Not I), lo que generó dos fragmentos, uno de 6.5 y el segundo de 7.5 Kpb, al cortar con esta enzima de restricción.

Estos fragmentos se clonaron en el vector de clonación Bluescript para facilitar su análisis por restricción y secuenciación.

Se consiguió secuenciar parcialmente una de las clonas encontrándose una región codificante de AA9-24.1 y una región no codificante que contiene en su secuencia regiones reportadas para algunos factores de transcripción.

## INTRODUCCIÓN

Las semillas pueden definirse ya sea como un componente esencial en la alimentación del mundo o bien como el órgano que da origen a una nueva planta.

Todos los componentes necesarios para dar origen a una nueva planta se encuentran en la semilla; con ésta, la independencia de una nueva generación se inicia, ya que contiene al embrión como una planta en miniatura, equipada estructural y fisiológicamente, con nutrientes de reserva para su crecimiento hasta que se establezca como un organismo totalmente independiente.

Cómo sale el embrión de la semilla en el momento preciso que termina todo un proceso metabólico, conocido como germinación, y como funciona todo este sistema a nivel molecular es una de las preguntas que aun no tiene una respuesta contundente.

### Germinación

La germinación es una etapa en el desarrollo de las plantas que comprende una serie de eventos metabólicos que permiten al embrión adoptar una condición metabólica propicia para iniciar la proliferación celular a partir de un estado de quiescencia, donde el contenido de agua es del 10 % o menor (Zuñiga, 1998).

Debido a los diversos enfoques en investigaciones realizadas sobre las semillas, se han establecido varias definiciones de germinación desde puntos de vista diferentes; uno de ellos indica que la germinación comienza con la entrada



de agua a la semilla (imbibición) y finaliza cuando una parte del embrión, generalmente la radícula, emerge (Bewley y Black, 1994). Desde el punto de vista bioquímico, la germinación puede definirse como la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera ronda de división celular (Meléndez-López y Vázquez-Ramos, 1991).

Los procesos bioquímicos dentro de la germinación se han dividido para su comprensión en tres fases. La primera etapa ó eventos tempranos de la germinación, inicia con la entrada de agua como única señal externa, que es suficiente para reactivar la actividad metabólica; en esta etapa se ha encontrado que existen reparación de DNA y síntesis de proteínas a partir de mensajeros residuales, que han sido asociados a procesos de desarrollo previos (Comai y Harada, 1990); es también en esta etapa, con la entrada de una mínima cantidad de agua que la membrana plasmática se recupera hasta su estado más estable. En la segunda fase de la germinación la entrada de agua a la semilla es constante y se ha encontrado que es donde existe el inicio de la replicación de DNA; en la tercera etapa hay un incremento de entrada de agua a la semilla en el tiempo y es aquí donde se lleva a cabo la división celular (Osborne, 1983).

Desde un inicio, todos los componentes para el reinicio de la síntesis de proteínas están presentes en el embrión maduro seco; en este estado los polisomas no existen, esto es, el conjunto de RNA ribosomales y proteínas unidos a RNA mensajero, aunque una vez que se inicia la hidratación se incrementa el número de polisomas (Dommes y Van der alle, 1990).

Al principio, la síntesis de proteínas depende de la existencia de ribosomas presentes dentro de la semilla seca. Una vez que se tiene síntesis "de novo" de ribosomas, éstos son utilizados en cuestión de horas (Dommes y Van der Walle, 1990). Además se han encontrado RNA mensajeros dentro del embrión en semilla seca, los que están relacionados con procesos de desarrollo previos. Presumiblemente, los nuevos RNA mensajeros sintetizados durante la germinación codificarán para proteínas esenciales para el metabolismo germinativo.

El propósito de todos estos eventos desencadenados en conjunto es transformar a un embrión deshidratado, con un metabolismo muy bajo, en un embrión activo, con un metabolismo vigoroso (Cruz- García, 1997).

Existen factores que afectan la germinación, los que se han dividido en factores de tipo intrínseco y de tipo extrínseco. Dentro de los factores extrínsecos se encuentran las condiciones ambientales, como la cantidad de agua disponible, la luz, etc. En el grupo de factores intrínsecos están las hormonas vegetales o fitorreguladores, como giberelinas, auxinas, ácido abscísico, etileno y citocininas.

#### Factores Intrínsecos: Fitorreguladores

**Auxinas.-** La auxina natural es el ácido indolacético que se sintetiza en la punta del tallo de las plantas jóvenes en crecimiento, y en las hojas jóvenes de las plantas maduras. En las semillas, la auxina, se sintetiza en la punta del coleoptilo y se transporta a través del sistema vascular de la planta. Se almacena

en forma de conjugados glucosídicos que liberan a la hormona activa (Cohen, 1983). Uno de los efectos de las auxinas es estimular la elongación celular además de ejercer efectos de inhibición sobre el florecimiento y el desarrollo de frutos.

Giberelinas. Dentro del grupo de estas hormonas la más estudiada es el ácido giberélico. Las giberelinas se sintetizan a partir del ácido mevalónico en los tejidos jóvenes y en las semillas en desarrollo. Estas hormonas provocan la hiperelongación de los tallos estimulando tanto la elongación como la división celular. En semillas inducen la germinación y regulan la producción de enzimas que hidrolizan reservas (Hill, 1977). Actúan como factores que desencadenan el florecimiento y el desarrollo de los frutos.

Etileno.- Se sintetiza a partir de metionina, en tejidos que responden al estrés (en maduración o envejecimiento); esta hormona se dispersa por difusión y provoca la maduración de los frutos y el envejecimiento de hojas y flores.

Ácido abscísico.- Se produce en las hojas como una respuesta al estrés hídrico. En la semilla en formación induce la síntesis de proteínas de reserva y la dormancia (Koorneef, 1984). Se le ha considerado como un modulador negativo de la germinación.

Citocininas.- Se producen en la punta de las raíces y se les ha descrito como estimuladores de la germinación de semillas (Van Staden, 1983). Las citocininas promueven la división y diferenciación en cultivos de tejidos

vegetales debido a que incrementan el ritmo de la mitosis y retrasan el envejecimiento de las hojas (Miller, 1956; Skoog and Miller, 1957). Asimismo, las citocininas pueden controlar el metabolismo de reservas energéticas almacenadas en los cotiledones (Muñoz, 1990), en sandía se ha observado que esta hormona puede tomar el papel de la luz al inducir la transcripción y traducción de los genes de la proteína cosechadora de luz y de unión a las clorofilas a y b (Longo, 1990). Provocan un aumento en la síntesis del RNA mensajero de la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5- bisfosfato Carboxilasa-Oxigenasa, así como en la tasa de biogénesis de cloroplastos (Harvey, 1974, Teysseidier, 1985).

Dentro de este grupo de fitorreguladores se ubica a la benciladenina( BA) que es una citocinina sintética; cuyo efecto sobre la germinación se ha estudiado en el departamento de Bioquímica en la Facultad de Química de la UNAM. Este fitorregulador estimula la síntesis total de DNA en más del 50% con relación a un control, así como un incremento en la síntesis reparativa de DNA en ejes embrionarios de maíz tratados con rayos  $\gamma$  , mientras que en los ejes control cambia el tipo de síntesis de un tipo indefinido a uno reparativo (Zaraín et al 1987; Reyes, 1988). Cuando estos mismos ensayos se llevan a cabo en presencia de inhibidores de la transcripción y traducción, se anula el efecto estimulador de BA sobre la síntesis de DNA (Vázquez-Ramos y Reyes 1990). La benciladenina adelanta el inicio de la replicación de DNA, de tal forma que un evento que ocurre normalmente en un plazo de 15 horas después de la entrada de agua ,

se presenta a las seis horas de germinación (Reyes et al, 1991). También se ha encontrado que aumenta la actividad de DNA polimerasa nuclear (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990) y promueve *in vitro* un cambio cuantitativo en la población de RNA mensajeros traducibles (Zuñiga, 1991).

### Factores extrínsecos

Temperatura. - La temperatura regula el ritmo de la germinación, el porcentaje de la germinación y el subsecuente crecimiento de la plántula. En general, el ritmo de germinación es lento a temperaturas bajas y existe una temperatura óptima; temperaturas mayores a ésta pueden causar daños a la semilla. Todas las semillas tienen un mínimo, un óptimo y un máximo de temperaturas para llevar a cabo la germinación y estas temperaturas difieren con la especie. La temperatura mínima es la temperatura más baja a la cual la germinación ocurre. La temperatura óptima para la germinación de semillas es cuando la mayoría de una población de plántulas es producida con el mejor ritmo. La variabilidad en las temperaturas depende de la especie; por ejemplo, se ha observado que semillas de brócoli y zanahoria son capaces de germinar a temperaturas de hasta 4.5°C. Algunas otras requieren fluctuaciones de temperatura (día y noche) de hasta 10°C (Arteca, 1995). En maíz se reporta una temperatura óptima de entre 28 y 30 °C (Raven, 1992).

Aereación.- Para obtener una rápida y uniforme germinación, el intercambio gaseoso es esencial. El oxígeno es requerido para los procesos

respiratorios normales dentro de la germinación de semillas y debe ser mantenido en una cantidad muy cercana al 21 %. El dióxido de carbono, producto de la respiración, inhibe la germinación cuando se acumula en el medio (Arteca, 1995).

Luz.- Este factor ha sido reconocido desde mitad del siglo XIX como un factor crítico de control en la germinación (Crocker 1930). El reactivo fotoquímico fitocromo, el cual está ampliamente distribuido en plantas, está involucrado en los mecanismos de sensibilidad a la luz en plantas (Bewley and Black 1985, Taylorson and Hendricks 1977). Cuando semillas en imbibición son expuestas a luz infraroja cercana (660-760 nm), hay una promoción de la germinación y el responsable es el fitocromo; mientras que si estas semillas bajo las mismas condiciones son sometidas a luz infraroja lejana (760-800), entonces la respuesta del fitocromo es la de inhibir la germinación (Borthwick et al, 1954). En las semillas de lechuga las citocininas están relacionadas con las respuestas del fitocromo, incrementando el efecto inhibitorio en el infrarojo lejano (Miller, 1956). El ácido abscísico inhibe la germinación en presencia o en ausencia de luz, en el caso del ácido giberélico, este no tiene efectos en la oscuridad pero si en presencia de luz.

Agua.- El agua es el principal elemento para el inicio de la germinación de semillas y para la sobrevivencia de la plántula. El potencial osmótico en el medio depende de la cantidad de soluto disuelto en el agua. Bajo condiciones de alta concentración de sales el potencial osmótico es muy negativo, lo que representa poca agua disponible causando la inhibición de la germinación (Ayers, 1952). Una interrupción en el suministro de agua durante la germinación puede disminuir

dentro de una población el porcentaje de germinación y hacer que las semillas experimenten estrés (Donnen and MacGillivray, 1943). Dentro de algunas especies de plantas, una exposición a una cantidad excesiva de agua da como resultado la producción de sustancias que reducen la cantidad de oxígeno disponible al embrión y eleva la cantidad de sustancias inhibitorias en la semilla y como consecuencia se reduce la germinación (Atwater, 1980; Heydeker, 1977).

Como se ha mencionado, los factores ambientales son determinantes en el proceso de germinación, en especial el contenido de humedad, que resulta tan determinante que puede ocasionar desde una disminución en el metabolismo germinativo hasta su inhibición total. Dependiendo de las condiciones de estrés a las que se someta a la semilla y en el punto en que la germinación se interrumpa, puede lograrse la germinación o no, al restablecer las condiciones óptimas de humedad.

#### Osmocondicionamiento de semillas de maíz

Se han desarrollado métodos que han permitido la manipulación de la cantidad de agua dentro de semilla durante la germinación, la cual se inicia pero no concluye; una de estas metodologías es el osmocondicionamiento de semillas (Heydecker y Coolbear, 1977; Bradford, 1986).

El osmocondicionamiento (OSMA) es un método para el control de agua libre en las semillas, brindando la suficiente cantidad para activar el metabolismo, pero insuficiente para que ocurra emergencia de la radícula.

Se ha demostrado que la germinación es más rápida y uniforme en semillas osmoacondicionadas que en semillas no tratadas (Brocklehurst and Dearman, 1983). Las condiciones a seguir para lograr el osmoacondicionamiento dependen de las especies a tratar, pero generalmente el contenido de humedad de las semillas es mantenido en 40-45 % (en base húmeda), lo que equivale a tener a la semilla en una humedad del 90 -95 % de la humedad con la que normalmente germinaría.

El osmoacondicionamiento se logra mediante la incubación a temperaturas específicas por un periodo de tiempo determinado, en polietilenglicol (PEG 6000) o en solución salina con un potencial osmótico que varía (según la especie) entre -1.0 y -1.5 MPa (Bray et al, 1989).

Se ha encontrado en diferentes especies de semillas que una consecuencia del OSMA es una rápida reanudación de los procesos de crecimiento durante la germinación subsecuente (Bray et al, 1989).

Se sugiere que el tratamiento de osmoacondicionamiento conduce a las semillas hacia el instante de la germinación, permitiendo que se lleven a cabo las fases I y II de la entrada y distribución de agua y extendiendo la duración de la fase II en la cual pueden permanecer en un periodo de 7 a 14 días permitiendo la reparación de daños. Esto permite que la semilla en el momento de una germinación subsecuente tenga un metabolismo sincronizado y rápido con relación a semillas no tratadas.



Las semillas osmoacondicionadas parecen incrementar su longevidad durante el almacenamiento, lo que se ha observado en semillas de pimiento (Georghiou et al, 1987) y cebolla (Dearman et al, 1987), pero se ha discutido que esto depende de las condiciones de almacenamiento.

Se ha demostrado en varias especies como poro (Bray et al, 1989), tomate (Coolbear and Grierson, 1979) y maíz (Cruz-García et al, 1995). que durante el osmoacondicionamiento no existe un incremento en el contenido de DNA nuclear en la semilla y tampoco existen evidencias de división celular. Los incrementos que han sido detectados en la cantidad de DNA durante el OSMA son debidos a la replicación mitocondrial o a la reparación del DNA nuclear (Ashraf and Bray, 1993).

Estudios realizados en poro indicaron que la replicación de DNA nuclear y la actividad de las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$  se inicia una vez que la semilla esta lista para germinar, es decir, que las condiciones del medio son las adecuadas (Ashraf and Bray, 1993).

Durante el periodo de osmoacondicionamiento se ha observado que existe reparación de la membrana plasmática y que ésta reparación es concluida antes de la germinación subsecuente (Woodstock and Tao, 1981).

Las actividades metabólicas que son detectadas durante el OSMA se potencian una vez que las semillas son transferidas a condiciones óptimas de germinación. Por ejemplo, se ha encontrado que la replicación de DNA en la

germinación subsecuente en las semillas osmoacondicionadas de jitomate, se inicia a las 20 horas de imbibición, mientras que en la germinación de semillas sin osmoacondicionar, la replicación se inicia a las 40 horas (Coolbear y Grierson, 1979).

Dentro de nuestro grupo de trabajo se han establecido las condiciones de osmoacondicionamiento para semillas de maíz y frijol donde se encontró que para el caso del frijol las condiciones ideales de potencial osmótico para tener semillas osmoacondicionadas es de  $-0.8$  Mpa; para esto se utilizó como agente osmótico polietilenglicol (PEG) 8000 (Sánchez et al, 1997) El PEG es un polímero que ha sido utilizado como la mejor opción en el osmoacondicionamiento por sus características de retención de agua y por ser inerte para las células. Para las semillas de maíz se encontró que el potencial osmótico ideal para tener semillas osmoacondicionadas por más de tres semanas es de  $-1.7$  MPa ( Cruz-García et al, 1995). Estas condiciones permitieron que, al restablecer las condiciones de germinación las semillas conservaran su viabilidad.

## ANTECEDENTES INMEDIATOS

Dentro del grupo de investigación donde se realizó este trabajo, se investigó la existencia de cambios en la expresión génica durante el osmoacondicionamiento y la germinación subsecuente de semillas de maíz; es decir, si en el estado pregerminativo que se presenta durante el osmoacondicionamiento, el genoma expresa genes de respuesta a esa condición ambiental, provocado por el déficit hídrico; y si en el estado germinativo subsecuente, la expresión génica se puede relacionar con eventos de la proliferación celular.

Una de las estrategias seguidas para evaluar estas diferencias en la expresión, fue la técnica de expresión diferencial a partir de RNA mensajeros obtenidos de semilla seca, semillas con diez días de OSMA y semillas con 24 horas de germinación subsecuente al OSMA.

Se encontró un RNA mensajero que se expresa diferencialmente, del cual se obtuvo su cDNA al que se denominó AA9-24.1. La expresión de este gen fue corroborada por experimentos de Northern blot y se encontró transcrito a las 15 y 24 horas de germinación subsecuente al OSMA, encontrándose a niveles mayores a las 15 horas. Este gen no se expresa durante OSMA. Se estudió también el tiempo en que este gen se expresa en la germinación normal, ya que como se ha mencionado anteriormente, el OSMA adelanta los eventos germinativos. Los resultados que se obtuvieron demuestran que este gen es detectable desde las

24 horas de germinación normal; esto es, 9 horas más tarde que en la germinación subsecuente al OSMA (Cruz-García, 1997). Esta investigación confirma que ese mensajero corresponde a un gen que se expresa diferencialmente en la germinación subsecuente. Además, el mensaje tiene una mayor expresión en el meristemo radical y no se detectó expresión ni en el tallo ni en la hoja (Cruz-García, 1997).

Las citocininas también afectan la expresión de AA9-24.1. Se encontró que bencil adenina (BA) aumenta considerable los niveles del transcrito a las 6 horas en relación con un control; para las 15 horas, el tiempo en el que el mensaje se expresa con mayor intensidad en la germinación postOSMA, ya no hay un incremento considerable de la cantidad de este mensaje (Zuñiga-Aguilar, 1998). Este gen parece inducirse en tiempos más tempranos por el tratamiento hormonal que por el tratamiento por OSMA.

Al ser un gen inducido por procesos que estimulan la germinación, es interesante conocer y estudiar su región promotora con el fin de caracterizar los elementos que podrían regular su expresión durante esta etapa del desarrollo, y para lograr este objetivo es necesario conocer la estructura del gen correspondiente.

Los promotores son regiones de DNA implicadas específicamente en el inicio de la transcripción. La RNA polimerasa reconoce y se une a una región de DNA que marca el inicio de la síntesis del RNA; esta región es conocida como región promotora. Es probable que la holoenzima reconozca inicialmente

secuencias apareadas dentro de dobles hélices intactas; sin embargo, casi inmediatamente después de la unión ocurre un desenrollamiento muy localizado del DNA que permite la síntesis de una cadena naciente de RNA sobre la hebra simple.

Actualmente se conocen las secuencias de bases de muchos promotores. Estas revelan que las bases que reconoce la RNA polimerasa no son transcritas al RNA: una vez establecida la unión al lugar de reconocimiento de la RNA polimerasa, esta se moviliza hacia un punto cercano al inicio de la transcripción, conformado por un grupo de bases ricas en adenina (A) y timina (T), al cual se une más firmemente (Watson, 1976).

Existe mucha variación tanto en la longitud como en la secuencia de los diferentes promotores para el lugar de reconocimiento inicial; en cambio, el del ligamiento más firme de unión de la polimerasa generalmente comprende una secuencia de siete pares de bases, todas ellas son variaciones de la serie:

5' TATPuATG

3' ATAPyTAC

El hecho de que ambas secuencias ligadoras sean ricas en adenina (A) y timina (T), puede ser la causa de su facilidad de desnaturalización en comparación con regiones ricas en guanina (G) y citosina (C), por lo que

constituyen un punto de apoyo obvio para una enzima como la RNA polimerasa, cuya actividad requiere una desnaturalización local(Watson,1976).

Se ha tratado de explicar el desarrollo de una semilla y su germinación argumentando que estos eventos sean gobernados por grupos de genes que se expresan específicamente durante la embriogénesis o en el cambio germinación–crecimiento ( Goldberg *et al* 1989 ); todo esto podría estar fuertemente relacionado con la expresión de AA9-24.1, del cual se podría sugerir que es un gen relacionado al crecimiento. La clonación y la caracterización de este gene pueden colaborar para la mejor comprensión de los procesos moleculares regulatorios dentro de la germinación de semillas.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar la estructura del gen AA9-24.1. de maíz mediante el análisis de una clona genómica.

### Objetivos particulares

Sondeo de un banco genómico de DNA utilizando como sonda el cDNA del gen AA9-24.1.

Obtener subclonas genómicas del gen AA9-24.1 de maíz.

Analizar las secuencias de las subclonas genómicas obtenidas

## METODOLOGÍAS Y ESTRATEGIAS

### Sondeo de una biblioteca genómica

Una biblioteca genómica de DNA se refiere a fragmentos de DNA de un tipo de célula que son clonados en DNA de bacteriófagos y guardados dentro de éste, conformando una colección de fagos recombinantes que contienen cada uno una parte diferente del genoma total de la célula (Cooper M. G., 1997).

El banco genómico utilizado en este estudio se construyó a partir de plántulas etioladas del híbrido Missouri 17. Esta biblioteca acepta insertos de 9-23 Kb

Se infectaron células de *E.coli* cepa Y1090 (crecidas toda la noche a 37 °C), con el fago  $\lambda$  FIX II, vector de clonación donde se hizo el banco genómico de DNA, por 15 min a 37°C y se plaqueó en cajas Petri con agar NZYDT y 4 mL de agar suave; las cajas se incubaron por 6h a de 37 °C, transcurrido este tiempo, se observaron placas de lisis. Las cajas Petri que contenían las placas de lisis resultado de la infección efectiva de las células de *E.coli*, se refrigeraron a 4°C por dos horas, con el fin de mantener el agar firme para su manipulación posterior.

El DNA liberado debido a la lisis, se transfirió a filtros de nylon por contacto directo de éstos con el agar donde se encontraban los fagos responsables de la lisis celular. Posteriormente, la membrana de nylon, se desnaturalizó por 2 min, con



una solución desnaturante (ver Apéndice). El DNA en la membrana de nylon se neutralizó sumergiendo el filtro en una solución neutralizante durante 5 min y posteriormente la membrana se lavó durante 30 seg con la solución de lavado. Después, el filtro se secó sobre papel Whatman 3-MM y el DNA se entrecruzó covalentemente a la membrana de nylon usando luz UV.

### Hibridación

Las membranas de nylon con el DNA inmovilizado se incubaron con la solución de hibridación a una temperatura de 63 °C durante una hora y posteriormente se hibridaron con el cDNA de la clona AA9-24.1 a 63°C por 14 horas. La marca radiactiva inespecífica se eliminó lavando las membranas 4 veces con la solución de lavado, dos veces durante 5 min para eliminar restos del líquido de hibridación y dos veces por 15 min para eliminar híbridos imperfectos. Los filtros se envolvieron en película plástica y se expusieron a éstas placas de rayos X a -70 °C con pantallas amplificadoras.

Una vez revelada la placa fotográfica, se compararon las señales obtenidas con la posición de las placas de lisis en las cajas petri y se tomaron las placas positivas de la caja petri cortando el agar y se colocó en tubos eppendorf. Los fagos se eluyeron con medio SM y se obtuvo la suspensión de éstos que serviría para el siguiente sondeo.

Una vez que se obtuvo un 100 % de placas positivas, es decir que todas las células contenían un fragmento homólogo a AA9-24.1, se agregaron a las cajas

Petri donde se hizo la infección, 4 mL de medio SM para hacer la elución y se mantuvieron a 4°C por 18 horas. Al sobrenadante recolectado se le adicionó cloroformo de tal manera que se tuviera en una concentración final de 5 %, se agitó vigorosamente en vortex, se mantuvo a temperatura ambiente por una hora y se centrifugó a 2000 rpm por 10min. Esta fue la suspensión de fagos que se utilizó para la extracción del DNA con homología a AA9-24.1.

#### Extracción del DNA del vector lambda Fix II

Para hacer la extracción de DNA se siguió el protocolo descrito en el "kit" de Qiagen, para purificar DNA del bacteriofago lambda a partir de lisados. Para esto, se hizo una infección bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores y las cajas petri donde se llevó a cabo la infección fueron eluidas con medio SM y agitación, al sobrenadante obtenido de la elución (10 mL) se le agregó 30 µl de solución L1 y se incubó a 37 °C por 30 min. A esto se le agregó 2 mL de solución L2 fría, se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo por 60 min; posteriormente se centrifugó a 10000 x g por 10 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento que resultó se resuspendió con 1 mL de la solución L3 y se le adicionó 1 mL de la solución L4, se mezcló suavemente, se incubó a 70 °C por 10 min y finalmente se enfrió en hielo durante 5 min. Se adicionó 1 mL de la solución L5 y se centrifugó a 10000 x g a una temperatura de 4 °C por 10 min, este último paso se repitió dos veces más con la finalidad de limpiar el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido mediante la metodología anterior se pasó a través de columnas de intercambio aniónico previamente equilibradas con 1 mL de la solución QBT. Estas columnas se lavaron con 2 mL de una solución QC, evitando que la columna se seque y el DNA fue eluido con una solución QF. Finalmente el DNA se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 4 °C por 30 min a 15000 x g. El DNA obtenido se lavó con etanol al 70 % y se secó con aire seco por 5 min.

El DNA extraído se cortó con la enzima de restricción Not I (*Nocardia otitidis-cavarium*) cuyo sitio de reconocimiento y corte es: GG ↓ GGCCGC, misma enzima con la cual se hizo el banco genómico de DNA, para liberar el fragmento que se siguió durante todo este procedimiento.

Para verificar la presencia del DNA, se utilizó la técnica de electroforesis utilizando geles de agarosa de bajo punto de fusión (Gibco) a una concentración de 1.5 %. El voltaje utilizado fue de 75- 80 volts. El gel teñido con bromuro de etidio se observó en el transiluminador de luz uv y se cortó el fragmento de agarosa que contenía el DNA, el gel se fundió a 70°C por 15 min y se llevó a un volumen final de 500 µl con agua estéril, se le agregó 5 µL glucógeno (20 mg/mL) con el fin de precipitar al DNA a la parte acuosa. Se agregó un volumen igual de fenol absoluto amortiguado y se agitó vigorosamente con vortex, se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente, con el fin de eliminar la agarosa; se hicieron dos lavados más con una solución de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1. Finalmente, el DNA disuelto en el sobrenadante se precipitó con 0.7 volúmenes de

isopropanol y se mantuvo 20 min a una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó por 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 12 000 rpm. El sedimento obtenido se lavó con etanol al 70 % y se secó con aire seco.

Una vez que se obtuvo el DNA se prosiguió a subclonarlo en un plásmido que es un vector que permite obtener una mayor cantidad de DNA para ensayos posteriores.

### Subclonación

La subclonación se llevó a cabo en el vector de clonación BluescripTKS, con un tamaño de 2.96 Kb que cuenta con un sitio de corte correspondiente a la enzima de restricción Not I. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina a la bacteria que lo contenga.

El vector digerido con la enzima de restricción se desfosforiló, con el propósito de reducir las posibilidades de autoligación. La reacción de desfosforilación se llevó a cabo con 4 U/ $\mu\text{L}$  de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 horas. El DNA se purificó mediante la extracción con fenol-cloroformo y se precipitó con 2 veces el volumen de isopropanol. Una vez disuelto el plásmido se utilizó para hacer una reacción de ligación con el DNA que sería clonado, por la acción de la DNA ligasa del bacteriófago T4. La reacción de ligación en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  se incubó a  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 14h.

## Transformación de células competentes

### Células competentes

Se crecieron células de *E.coli* hasta la fase exponencial, se centrifugaron por 10 min a 3500 r.p.m. el sedimento bacteriano se resuspendió en 1/10 del volumen original con solución TSS, se mezcló suavemente y la suspensión se almacenó -en alícuotas de 100  $\mu$ L a -70°C.

Para la transformación de las células competentes se utilizó el siguiente protocolo: Se mezclaron 5  $\mu$ L de la reacción de ligación con 100  $\mu$ L de células competentes, se incubaron durante 30 min exactamente a 30 °C, se dió un choque térmico a 42 °C por exactamente 30 seg, al terminó las mezclas fueron colocadas en hielo por 2 min, se agregó 400  $\mu$ L medio de cultivo luria adicionado con 20 mM de glucosa y se agitaron los viales a 37 °C a 225 rpm por exactamente 1 hora, se plaquearon cajas Petri con agar LB (Gibco BRL), previamente adicionadas con ampicilina, XGAL (5-bromo-4 cloro-3 indol- $\beta$ -D-galactopiranosido) e IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido). Las cajas petri se incubaron por 18 horas a 37 °C.

Las células de color blanco que se encontraron en las cajas Petri, eran células recombinantes; estas presentaban la resistencia a ampicilina debida a la presencia del vector de clonación y no eran capaces de degradar el sustrato X-GAL porque es en esta región del plásmido donde se encuentra la zona de clonación, misma donde se insertó el DNA extraño.

### Extracción del DNA del vector BluescripTKS

La extracción del DNA subclonado se realizó de la siguiente manera. La cepa DH5 $\alpha$  de *E.coli* se hizo crecer en medio Luria por 14 horas a 37 °C después de lo cual el cultivo fue centrifugado 4000 rpm por 10 min, el sedimento se resuspendió con agitación vigorosa en 200 $\mu$ L de solución 1 fría, se le adicionaron 400 $\mu$ L de una solución 2, se agitó suavemente y se le agregó posteriormente 300 $\mu$ L de solución 3, se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se dejó en reposo en hielo por 3.5 min; una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a una temperatura de 4°C, al sobrenadante se le hizo una extracción con FCI (Fenol-cloroformo alcohol isoamílico) y posteriormente el DNA se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol. El DNA obtenido se resuspendió en agua estéril.

Una vez obtenido el DNA circular, se cortó con la enzima de restricción NotI para extraer finalmente el inserto del vector, y los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa al 1.5 %.

### Southern Blot

El DNA fue transferido a una membrana de nylon usando como amortiguador de transferencia SSC 10x.

La membrana de nylon se hibridó con el cDNA de la clona AA9-24.1 a una temperatura de 65°C por 14 horas, la marca radiactiva inespecífica fue

eliminada lavando las membranas 4 veces con SSC 0.1X y SDS 0.1% a 60°C, dos de ellos por 5 min para eliminar los restos del líquido de hibridación y dos de 15 min para eliminar híbridos imperfectos. Las membranas después de este tratamiento se envolvieron en película plástica y se expuso a las membranas una placa de rayos X esto a -70°C.

### Ensayos de restricción

Los plásmidos con los insertos se incubaron durante 3 horas a 37 °C con las enzimas de restricción: Eco RI, Hind III, BamHI, XbaI, KpnI y el amortiguador correspondiente para tener una concentración final de 1X tanto de amortiguador como de enzima de restricción. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa y se observaron mediante la tinción de bromuro con etidio.

### Secuenciación de DNA utilizando la técnica de la termosecuensa

Se prepararon las reacciones de terminación (una para cada nucleótido que está marcado radiactivamente) para cada una de las secuenciaciones a realizar, las cantidades de amortiguador, cebador y DNA dependerán de la cantidad de DNA que se tenga, pero la cantidad de DNA polimerasa fue siempre de 8 unidades. Las condiciones de amplificación de este DNA con diferentes terminaciones fue de 95°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 60 °C 10 min, 40 ciclos. esto es con la finalidad de abrir la doble cadena, alinear los cebadores y elongar, lo que ocurre de manera exponencial. Los productos de secuenciación se corrieron en un gel de

poliacrilamida al 8 % durante 12 horas(Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit. Amersham Life Science)



## RESULTADOS

### A. ESCRUTINIO DEL BANCO DE DNA GENÓMICO DE MAÍZ

Se realizaron sondeos en un banco de DNA genómico de maíz con el fin de encontrar una clona dentro de esta biblioteca que contuviese la secuencia del gen correspondiente al cDNA AA9-24.1. Del sondeo se obtuvieron placas positivas y una de ellas se purificó mediante tres sondeos subsecuentes hasta encontrar 100% de placas positivas; es decir, se encontraron tantas señales de hibridación como unidades formadoras de placas se tenían en la caja petri. La Fig. 1 muestra la autorradiografía del último sondeo donde se observa 100% de placas de hibridación positivas. Estas placas de lisis se almacenaron por separado y se utilizaron para obtener el DNA del vector.

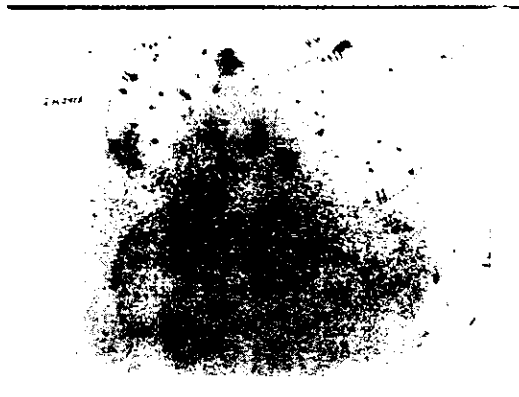


Fig.1 Placas de lisis en el último sondeo de un banco genómico de maíz, usando como sonda AA9.24.1.

## B. PURIFICACION DE DNA DEL FAGO LAMBDA

De este último tamizado se tomaron placas de dos de las seis cajas petri donde se llevó a cabo el crecimiento de bacterias infectadas y se procedió a la extracción del DNA contenido en el vector de clonación  $\lambda$  Fix II. Para esto se infectaron las bacterias con una suspensión de bacteriófagos proveniente de una sola clona. En la Fig. 2 se muestra el patrón de corrimiento en electroforesis en agarosa del DNA del bacteriofago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción Not I (*Nocardia otitidis-cavarium*). Se observa la liberación de un inserto de aproximadamente 14 Kpb, el cual fue llamado GAA9, con un sitio interno (Not I) que genera dos fragmentos de 6.5 (GAA9-a) y 7.5 Kpb.(GAA9-b). La presencia del gen en esta clona se corroboró por un ensayo de Southern blot (Fig. 3) donde se observó una hibridación positiva con el inserto de mayor tamaño (7.5 Kpb).

Carriles

1

3

5

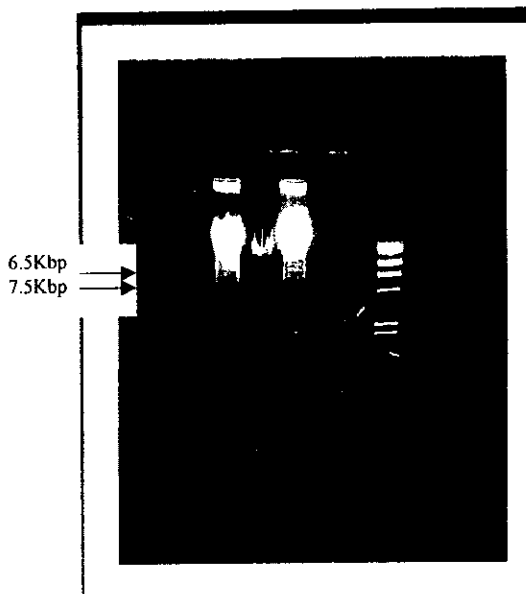


Fig.2 Separación de los productos de la digestión del vector  $\lambda$  Fix II en un gel de agarosa. Carril 1  $\lambda$  Fix II con el inserto sin liberar, carril 3  $\lambda$  Fix II con el inserto liberado, carril 5 marcadores de peso molecular de DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III.

1

3

5

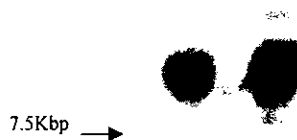


Fig.3 Southern blot de los productos de la digestión. Corroboración de la homología con AA9.24.1 Carril 1  $\lambda$  Fix II con el inserto sin liberar, carril 3  $\lambda$  Fix II con el inserto liberado, carril 5 marcadores de peso molecular de DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III.

### C. SUBCLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS EN EL VECTOR BLUESCRIPT SK

Con la finalidad de facilitar el análisis del inserto encontrado, se subclonaron los dos fragmentos GAA9-a y GAA9-b que componen la clona genómica de 14 kpb en el sitio Not I del vector de clonación Bluescript SK, (Fig. 4 y 5). Para verificar que el fragmento de DNA clonado fuera el gene correspondiente a AA9-24.1, el DNA del plásmido digerido con la enzima Not I se resolvió en un gel de agarosa (1.5%), se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda de cDNA. En la figuras 4 y 5 se muestra la subclonación de ambos insertos y en la Fig. . 5A se muestra el resultado del Southern blot para el fragmento GAA9-b donde se observa hibridación únicamente del fragmento GAA9-b, lo que indica que en esta clona genómica se encuentra AA9-24.1.

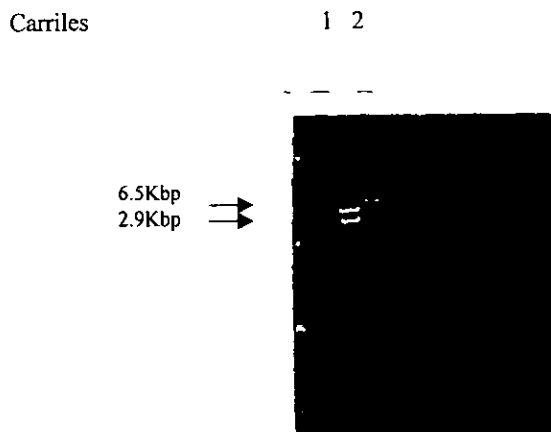


Fig.4 Subclonación del fragmento de 6.5 Kpb en el plásmido Bluescript extraído del vector de clonación  $\lambda$  Fix II. Carril 1 digestión del plásmido(2.9 Kpb) con el inserto(6.5 Kpb). Carril 2 marcadores de pesos moleculares de DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III.

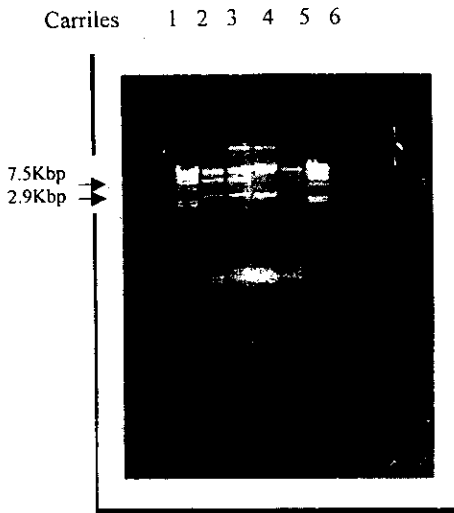


Fig. 5 Subclonación del fragmento de 7.5 Kpb en el plásmido Bluescript y corroboración de su homología con AA9.24.1 por un ensayo de Southern blot. Carriles 1 y 6, marcadores de peso molecular de DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III. Carriles 2 y 3 vector digerido con inserto, carri 4 vector digerido sin inserto, carril 5 control negativo.

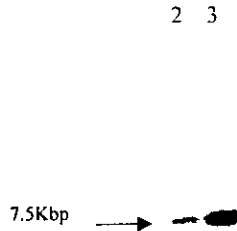


Fig. 5A Confirmación de homología de las clonas con AA9-24.1 por ensayo de Southern blot. Carriles 1 y 6, marcadores de peso molecular de DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III. Carriles 2 y 3 vector digerido con inserto, carri 4 vector digerido sin inserto, carril 5 control negativo.

#### D. CARACTERIZACIÓN DE LA CLONA GENÓMICA (GAA9) POR ENSAYOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Un primer paso en la caracterización de GAA9 se logró realizando ensayos con diferentes enzimas de restricción usando las subclonas GAA9-a y GAA9-b. Las enzimas de restricción fueron: para GAA9-a, Xba I (*Xanthomonas campestris*) y Eco RI (*Escherichia coli*); para GAA9-b fueron: Xba I, Sst I (*Streptomyces stranford*) y Eco RI y se observó el patrón de corte en un gel de agarosa al 1% (Fig. 6 y 7). Para GAA9-b se hizo un ensayo de Southern blot y se observó en la autoradiografía hibridación positiva con algunos de los fragmentos que se obtuvieron de la digestión enzimática (Fig. 7A), lo que indicó que en estos fragmentos se encontraba AA9-24.1 o al menos parte de este cDNA. Se purificaron los fragmentos resultantes de la digestión con la enzima de restricción Xba I que resultaron positivos en el ensayo de Southern blot, con el fin de subclonarlos

Carriles

1 2 3 4

8

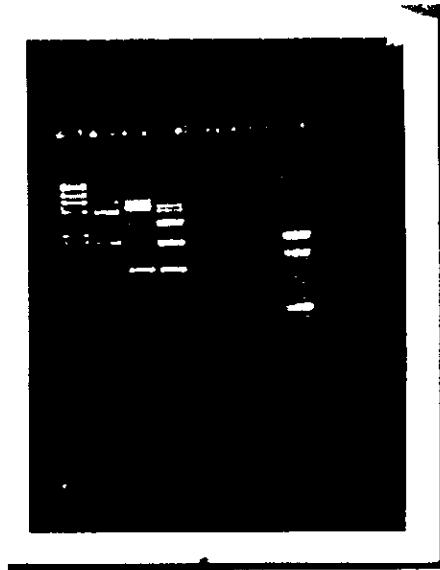


Fig.6 Ensayos de restricción del fragmento de 6.5 Kpb. Carril 1. Marcadores de peso molecular  $\lambda$  digerido con Hind III, Digestión del fragmento con Eco RI (carril 2), con Xba I (carril 3), digestión con Eco RI y Xba I (carril 4), carril 8 marcadores de pesos moleculares de 100 pb.

Carriles 1 3 5 7 8

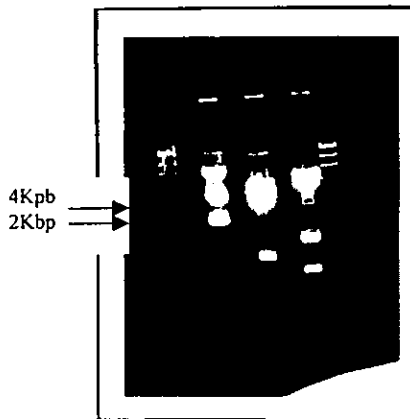


Fig. 7 Ensayos de restricción del fragmento de 7.5 Kpb. (GAA9-b). Carriles 1 y 8 marcadores de peso molecular  $\lambda$  Hind III, carril 3 digestión con Xba I, carril 5 digestión con Sst I, carril 7 digestión con Eco RI.

1 3 5 7 8



Fig. 7A Corroboración de homología con AA9.24.1 de algunos de los fragmentos obtenidos de la digestión con enzimas de restricción. Digestión de GAA9-b con Xba I (carril 3), digestión con Sst I (carril 5), digestión con Eco RI. (carril 7).

### E.SUBCLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS RESULTANTES DE LA DIGESTIÓN DE GAA9-b

Como resultado de la digestión de GAA9-b con enzimas de restricción, se obtuvieron fragmentos con homología al cDNA AA9-24.1; se eligió purificar los fragmentos resultantes de la digestión con la enzima XbaI, cuyos tamaños fueron



de aproximadamente 4 y 2 kpb (Fig. 8); a estos fragmentos se les llamó GAA9-c y GAA9-d respectivamente. GAA9-c Y GAA9-d se clonaron en el vector de clonación Bluescript SK en el sitio XbaI. En la Fig. 8A se muestra un ensayo de Southern blot para estos fragmentos, donde se corrobora que GAA9-c y GAA9-d contienen cada uno una parte diferente del cDNA llamado AA9-24.1 utilizado como sonda, es decir que se obtuvieron dos clones genómicos para AA9.24.1.

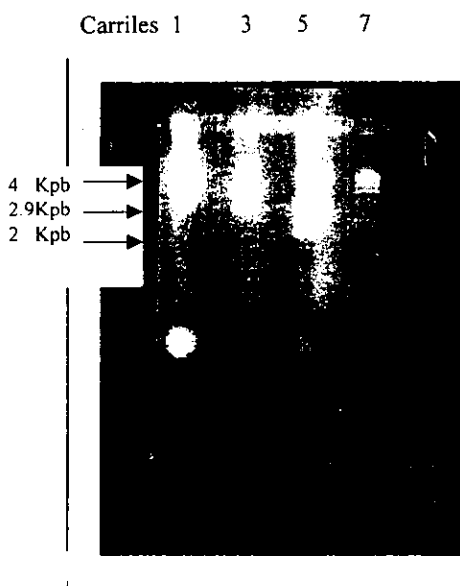


Fig. 8 Subclonación de los fragmentos obtenidos de la digestión con la enzima XbaI que resultaron homólogos con AA9.24.1. Carril 1, vector con inserto sin digerir, carril 3 digestión vector con inserto de 4 Kpb, carril 5, digestión del vector con inserto de 2 Kpb, carril 7, marcadores de peso molecula  $\lambda$  Hind III.

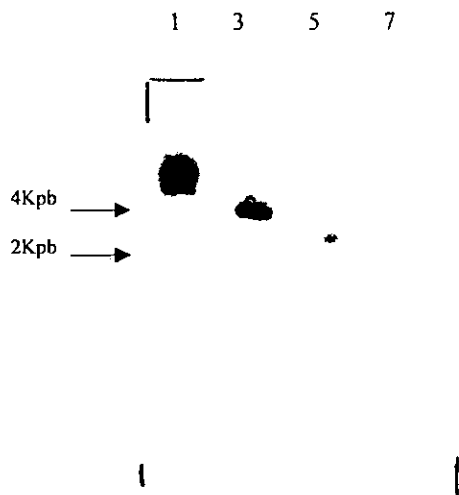


Fig. 8A Corroboración de homología por ensayo Southern blot. Carril 1, vector sin digerir, carril 3 vector digerido con inserto de 4 Kpb, carril 5, vector digerido con inserto de 2 Kpb.

## F. SECUENCIACIÓN

Con la finalidad de encontrar una secuencia que contuviera la región codificante de AA9-24.1 o parte de ella y región no codificante, esperando con esto tener regiones promotoras y su relación con AA9-24.1, se eligió secuenciar a GAA9-d (2Kpb), y de esta se secuenciaron 1400 pb, 700 pb utilizando el cebador M13 (3'TGACCGGCAGCAAATG 5') y 700 pb con el cebador Reverse (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'). La secuencia hacia 3' de GAA9-d (M13) resultó en un alineamiento con AA9-24.1 virtualmente idéntico en 270 pb correspondiente a las bases 120 a 390 y la secuencia hacia 5' de GAA9-d de la 15 a la 285. El resto de GAA9-d es región que no corresponde al cDNA AA9-24.1 y se sugiere que se tiene parte de un intrón que divide a AA9-24. Adicionalmente, se comparó la secuencia con secuencias reportadas en un banco de datos resultando tener homología con la enzima fitoquelatina sintetasa, (ver discusión).

Secuencia a partir de M13

AAAAAAGTTCCCCATTGGCGATTATTCCAGGCATTCCATCACATGAATTGCCAATT  
GTGCAAGCCGGAGTGGTAAAACCTTTAACCAGGACCCAGCAAATGCGCTTCTC  
CTTCCAGATCAGTGTGGTCTTGCTGGAACCTACCAATTAACCTGTTAAGGTGCCA  
AGGAACTTCACTTCTTAAGACTCCAGGCCCTGGGACACATGTGGGCGTGCCATT  
GTTGGCAGGCCTACAAAGTTTTTCACCGCGGATGGGCGCAGGGCAACCCAAGC  
TCTAA\*GTAAGTTGCCCATGTAAGTGAATTTTTACATTTTACTTGCTATCAGTTGCTTATG  
TATGTTCTGGAGGTGAGGTACAGCTACATCATATTATTTAGTGTGTTCTGTTCTTCTGAC  
CATGATTCCAAATTTTCAGGTTACATTAGTTGCCAGGCTAGTAAAAATGGAAACAATCTA  
ACAAGAGGAATTTGTTCAAAAGGATTAATGCTAATTGATATTTGCTGACAATAAGTTAC  
TACTAGGATCAACAAAAATGCAGTCTCTTTTCTTTCTTTTTGTTTGTCTTCAAAAATA  
ATATATTCTAATCGCAGATAGTCCTAGGAAGAATTCCATACAAGTTGCACTTTTGTCTAG  
A

**\*AA9-24.1**

Resultado de la comparación de la secuencia en el programa blast

gi\_3559805|gnl|PID|e1300537 Putative Phitoquelatine Synthetase.... 1.6e-72

La secuencia se obtuvo a partir del cebador reverso cuando se comparó con una base de datos(<http://transfac.gbf-braunschweig.de/cgi-bin/matSearch>) para regiones de promoción, en la cual se encontró que esta secuencia tiene un gran

número de secuencias consenso de promoción, algunas de las cuales se muestran en la secuencia. (Quandt, 1995)

Secuencia a partir de Reverso

TCTAGAGCGGCC<sup>E<sub>2</sub>F</sup>**CGCG**CTCCTCCTCTCCGCACCGACTCGAACAGGTTCGGCACTTCGGTT

TCTTCGGTTCTCCTCGTCCGTCTCCCTACGCCTCTCCTCGTTT<sup>E<sub>2</sub>F</sup>CGCG**CGGAAGTT**CGAA

GCTGGTTT<sup>RFX</sup>AGATCCGCCGCCGATCGCC<sup>E<sub>2</sub>F</sup>**GTTG**CGTCTGAT**GCAACGG**GAGCTC**GGCGA**

GCTGTGATGATGCTCCCGCTCCGTGTGCT<sup>STAT</sup>**TTCCG**CT<sup>E<sub>2</sub>F</sup>**GCGCTG**<sup>AP<sub>1</sub></sup>**GAC**ACTGTCAGTGTCCG

GTGGCTCCAGTCCAGCGTCGGTGGCTTCTAGTTTTGGTCCCACTGCACTCCAATTCAAGC

TCAAGCTCGATCTTTCGAGCTTGCCCTCAGCTATGAATCCAATTAAGTAGGCTTAGCT<sup>STAT</sup>**TCC**

TGCAACTATACATGGAGCTGCATCTCAGCTTATTTAACTAAGCTCCACTGTCTGTTCAAC

CTGTCGCGAGCTGTTTACACCTATACCTGGTAGTAGATCTGTTAAGAAGCGAAAACTGC

TAAGACTTACTAATTATAGTAACATTAAGGATCAGTGCAACTAACT<sup>AP<sub>1</sub></sup>**GACGA**ATACTCAT

.....GATA  
GATGGG**GATA**TATCTATATGGACTGGACT

La secuencia CGCG corresponde a la región de unión del factor transcripcional E2F factor que se encuentra unido a la proteína inhibidora del ciclo celular pRb (proteína del retinoblastoma); pRb es hiperfosforilada hacia la mitad de G1, después de lo cual se libera E2F, funcionando como un factor de transcripción genes relacionados con el metabolismo del DNA (PCNA, DNA polimerasa  $\alpha$  entre otros).

La secuencia TGAC corresponde a la región de unión del factor transcripcional AP1; este factor se ha encontrado y estudiado en Arabidopsis y ha sido asociado a diferenciación celular.

TTCC es la secuencia de unión correspondiente al factor conocido como STAT que se ha visto involucrado en transducción de señales y en la activación de la transcripción.

GATA es la secuencia que ha sido asociada a un gran número de genes reconocidos por unir proteínas con dedos de zinc; se ha implicado en la regulación de genes de diferenciación celular.

GCAACG es la secuencia que corresponde al factor llamado RFX, que es un dominio de unión a DNA, relacionado con eventos de regulación en eucariotes .

## DISCUSIÓN

Nuestro grupo de trabajo estableció el osmoacondicionamiento (OSMA) para semillas de maíz con el fin de lograr una sincronía celular durante la germinación.

Esta técnica permite iniciar el metabolismo germinativo sin que éste concluya con la emergencia de la radícula, ocasionando que al restablecerse la germinación sea rápida y uniforme. En estas condiciones la semilla adelanta su germinación.

Para conocer si por efecto del OSMA la semilla expresa genes relacionados con el crecimiento durante la germinación, se realizaron experimentos con los cuales se detectaron cambios transcripcionales entre el periodo de OSMA y la germinación subsecuente al OSMA. Se identificaron tres mensajes que se expresaban diferencialmente; solo uno de ellos fue confirmado y fue llamado AA9-24.1. La caracterización de AA9-24.1 es importante debido al poco conocimiento que se tiene de genes relacionados con cambios de quiescencia a proliferación en la germinación de semillas

Por este motivo, AA924.1 ha sido objeto de estudio en el laboratorio y actualmente se ha secuenciado el 70% del cDNA (Gómez Gutierrez, 1999). La secuencia presenta un alto grado de identidad con secuencias reportadas para *Arabidopsis thaliana* y arroz y corresponde a la codificación para la proteína fitoquelatina sintetasa, enzima responsable de la síntesis de fitoquelatinas que son pequeños péptidos responsables de quelar metales pesados (Leuchter et al.,1998).

Uno de los metales que son preferentemente quelado es el zinc, elemento importante para el metabolismo de los ácidos nucleicos. Debido a que durante la

germinación la síntesis reparativa del DNA y su replicación son procesos vitales, sería importante que la semilla disponga de un sistema que se mantenga bajo control la concentración disponible del zinc y de aquí la posible importancia de esta proteína.

Ya que la expresión de AA9-24.1 se manifiesta en tejidos en proliferación. Nos preguntamos si la región promotora de este gen nos daría información sobre los elementos de control de su expresión. La clona genómica aislada, GAA9, podría entonces darnos la información requerida. Las dos subclonas genómicas obtenidas, GAA9-a y GAA9-b fueron estudiadas. GAA9-a no produjo hibridación con AA924.1 mientras que GAA9-b fue mucho más informativa. Por los ensayos de restricción realizados a este fragmento de DNA se obtuvieron dos subfragmentos de 4 y 2 Kpb y ambos hibridaron con la sonda de AA924.1, los que se denominaron GAA9-c y GAA9-d respectivamente.

Por ser la clona más pequeña, se determinó la secuencia parcialmente de GAA9-d desde ambos extremos obteniéndose aproximadamente secuencias de 700 pb desde cada lado. La secuencia de bases obtenida desde el extremo 3' resultó contener 270 pb presentes en AA924.1 hacia el extremo amino de la proteína putativa; no obstante, las bases siguientes en GAA9-d diferían totalmente de la secuencia. Lo anterior nos indica que el resto de la secuencia alrededor de 430 pb, corresponden a un intrón presente en la clona genómica y que divide al gen. La secuenciación desde 5' nos indicó la presencia de múltiples señales de reconocimiento para factores transcripcionales como E2F, AP1, STAT, GATA y

otros, factores que participan en la regulación de la expresión de genes de proliferación. Pareciera evidente que en la región 5' de GAA9-d se encuentra la región promotora, los elementos 5' UTR y el comienzo del mensaje para AA924.1, incluyendo la región interrumpida por el intrón.

GAA9-c también hibrida con AA924.1 y colinda con GAA9-d por lo que podemos inferir que en GAA9-c estará el resto del mensaje para AA924.1, quizá conteniendo otras regiones interrumpidas por intrones, lo que sería interesante analizar.

En la Fig 9 se presenta un esquema donde se representa a GAA9-d y su posible relación con el cDNA AA9-24.1 y la ubicación de GAA9-c.

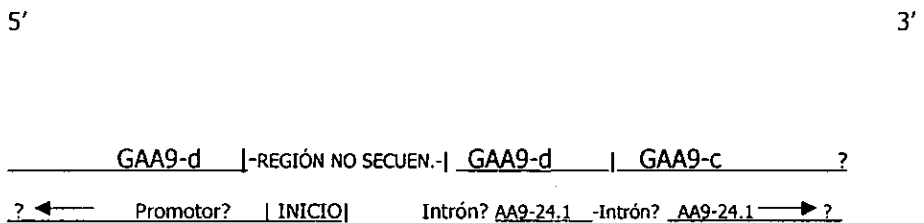


Fig. 9

Adicionalmente se secuenció un extremo de GAA9-a (6.5 Kpb), con la finalidad de identificar sobre el tipo de regiones génicas que flanquearían a AA9-24.1. El fragmento que no hidrida con AA9-24.1 contiene secuencias tipo cajas Mad que representan genes que regulan procesos de diferenciación en vegetales y que aparentemente son comunes en el genoma de maíz. Posteriormente sería



interesante investigar si este tipo de secuencias funcionales tiene relación con la expresión del gen clonado AA9-24.1.

El gen AA9-24.1 se aisló por su expresión diferencial durante la germinación postOSMA en contraste con la germinación normal, en donde se expresa a tiempos posteriores (24 horas) (Cruz-García 1997) Asimismo este gen se expresa durante la germinación estimulada con citocininas pues a las seis horas ya se detecta el transcrito mientras que en el control se encuentra a las 15 horas (Zuñiga Aguilar, 1998) Tanto en la germinación postOSMA como en la germinación en presencia de citocininas se adelantan los eventos moleculares por lo que es importante caracterizar los genes que son activados por estos tratamientos. El resultado de esta investigación ha sido el identificar el gen AA9-24.1 como un interesante marcador molecular de estos procesos.

Por estas características es importante conocer los factores que regulan su expresión y es interesante conocer la región promotora completa de este gen ya que se podrían identificar elementos de respuesta a citocininas, que hasta la fecha no han sido caracterizados.

Adicionalmente, dentro del grupo de investigación donde se realizó este trabajo se esta tratando de obtener la secuencia completa del cDNA para así tener la caracterización de este gen.

Con el aporte de este trabajo se podrían hacer estudios posteriores, fusionando la región promotora de este gen a un gen reportero, como la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

y estudiar la expresión transitoria que permitiría identificar elementos mínimos de respuesta en el promotor del gen.

## BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Arteca, R. N.(1995) Plant growth substances: Principles and applications New York USA. Chapman and Hall Pp.116-120
- ◆ Ashraf. M., and Bray, C.M. (1983) DNA Synthesis in Osmoprimed Leek Seeds and Evidence for Repair and Replication. Seed Sci. Res. 3:15-23.
- ◆ Atwater, B. R. (1980) Germination Dormancy and Morphology of Seeds of herbaceous ornamental plant. Seed Sci Tech 8:523-573
- ◆ Ayers, A.D. (1952) Seed germination as Affected by Soil moisture and Salinity. Agron. J 44:82-84.
- ◆ Bewley, J. D. and Black, M (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination (New York:Plenum Press).Pp 653
- ◆ Borthwick, H. A., Hendricks, S.B. Toole, E.H. and Toole, V.K. (1954) Action of Light on Lettuce Germination Bot.Gazette 115:205-225
- ◆ Bradford, K. J. (1986 ) Manipulation of Seed Water Relations Via Osmotic Priming to improve germination under stress conditions. Hort. Sci.59:672-676

- ◆ Bray, C.M., Davison P. A and Taylor R.M. (1989) Biochemical Changes During Osmopriming of Leek Seeds. *Ann. Bot.* 63:185-193
  
- ◆ Brocklehurst, .P.A. and Dearman, J.(1983) Interaccion Between Seed Priming Treatments and Nine Seeds Lots of Carrot, Celery and Onion Laboratory Germination. *Anns Bot* 102:577-584.
  
- ◆ Cohen, J. D. (1983 ) Identification and Quantitative Analysis of Indole-3-acetyl-I-Aspartate From Seeds of Glycine Max L. *Plant Physiol.*70:749-754
  
- ◆ Comai, L and Harada, J.J..(1990). Transcriptional Activites in Dry Seed Nuclei Indicate the Timig of the Transition From Embryogeny to Germination. *Pro.Natl. Acad. Sci. USA* 87:2671-2674
  
- ◆ Coolbear, P. and Grierson, D. (1979) Studies on the Chances in the Major Nucleic Acid Components of Tomato Seeds (*Lycopersicom esculentum* Mill) resulting from osmotic presowin treatment. *J Exp.Bot.*30: 1153-1162.
  
- ◆ Cooper, M.G. *The Cell* ASM Press Washington USA 1997 Pp 118.

- ◆ Crocker, W. Effect of Visible Spectrum Upon The Germination of Seed and Fruits in Biological Effects of Radiation. Mc Graw Hill. New York USA 1930 Pp 791-828
- ◆ Cruz-García, F. Cambios Bioquímicos y Moleculares en los Estados Pregerminativo y Germinativo en las semillas de maíz. Facultad de Química 1997.Pp.55-78
- ◆ Cruz-García, F., Jiménez, L.F. y Vázquez-Ramos, J. M (1995) Biochemical and Cytological Studies on Osmoprimed Maize Seeds. Seed Sci. Res. 5:15-23
- ◆ Dearman, J., Brocklehurst, P.A. and Drew, R.T.K. (1986) Effects of Osmotic Priming and Aging on The Germination and Emergence of cCrrot and Leek Seed. Annals Appl Biol 111:717-722
- ◆ Dommes, J. and Van der Walle, C. (1990) Polysome Formation and Incorporation of New Ribosomes into Polysomes During Germination of the Embryonic Axis of Maize. Plant Physiol. 79:289-296
- ◆ Donnen, L.D and Mac Gillivray J.H. (1943) Germination (emergence) of Vegetable Seed as Affected by Different Soil Conditions Plant Physiol. 18:524-529.

- ◆ Georghiou, K., Thanos C. A. and Passam H.S. (1987) Osmocondition as a Means of Counteracting the Aging of Pepper Seeds During High-Temperature Storage. *Ann Bot* 60:279-285
- ◆ Goldberg, R. B., Baker, J. and Perez-Grau, L.(1989) Regulation of Gene Expression Durin Plant Embryogenesis. *Cell* 56:149-160.
- ◆ Gómez Gutiérrez (1999) tesis en preparación
- ◆ Harvey, B. M., Lu, B. C. and Fletcher, R. A. (1974) Accelerates Chloplast Differentiation and Stimulates Photosynthetic Enzyme Activity in Cucumber Cotyledons, *Can.J. Bot.* 52, 2481.
- ◆ Heydecker, W. and Coolbear,P.(1977) Seed Treatments for Improved Performance Survey and Attempted Prognosis. *Seed Sci and Tech.* 5: 353-425
- ◆ Hill, A. T. *Hormonas Regulatoras del Crecimiento Vegetal*, Ed. Omega, Barcelona, España.1997
- ◆ Kigel, J. *Seed Development and Germination* Marcel Dekke, Inc New York. USA. Pp767-787. 1995

- ◆ Koornneef, M., Reuling, G. and Karssen, C. M. (1984) The Isolation and Characterization of Abscisic Acid-Insensitive Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 61. 377-389
- ◆ Leuchter, R., Wolf, K. and Zimmermann, M. (1998) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA Complementing a *Schizosaccharomyces pombe* Mutant Which is Deficient in Phytochelatin Synthesis. *Plant Physiol.* 117:1526-1540
- ◆ Longo, G. P. M., Bracale, M., Rossi, G. and Longo, C. P. (1990) BA Induces the Appearance of LHCP-m-RNA and of the Relevant Protein in Dark-grown Excised Watermelon Cotyledons, *Plant Mol. Biol.* 14, 569-580
- ◆ Melendez-López, S y Vázquez-Ramos, J. M. (1991). Nuclear DNA Polymerase Activities of Germination in Maize Embryo Axes. *J. Plant Physiol.* 137:581-585.
- ◆ Miller, C.O., Skoog, F., Okamura F., Saltz, F. S. and Strong, F. M. (1956) Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1345-1362
- ◆ Muñoz, J. L., Martín, L. Nicolás, G. and Villalobos, N. (1990) Influence of Endogenous Cytokinins on Reverse Mobilization in Cotyledons of *Cicer arietinum* L. *Plant Physiol.* 93:1011-1016

- ◆ Osborne,D.J.(1982) Deoxirribonucleic acid integrity and repair in seed germination:the importance in viability and biochemistry of seed development dormancy and germination.347-369.Elseviere Biomedical Press New York
- ◆ Quandt, K. Frech, K. Karas, H. Wingender, E. and Werner, T.(1995) MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence. Nucleic Acids Research 23:4878-4884.
- ◆ Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhom, S. M. Biology of Plants Worth Publishes USA 1992
- ◆ Reyes, J., Jiménez- García L., González M. y Vázquez Ramos, J. M. (1991) Benzyladenine Stimulation of Nuclear DNA Synthesis and Cell Division in Germinating Maize. Seed Science Res,1:113-117
- ◆ Reyes-Jiménez, J.(1988) Estimulación de la Síntesis de ADN Durante las Primeras horas de la Germinación de Zea mayz por benciladenina, Facultad de Ciencias. UNAM.
- ◆ Sambrook,J.,E.F.Fritsch and T. Maniatis .(1989).Moleculkar cloning: a laboratory manual.Cold Spring Harbord Laboratory Press, New York



- ◆ Sánchez Jiménez Ma de la Paz (1996) Osmoacondicionamiento de Semillas de Frijol y su Efecto en Eventos Bioquímicos Pre y Post Osmoacondicionamiento. Facultad de Química.Pp30-32
- ◆ Taylorson and Hendricks (1985) Response of Weed Seeds to Ethylene and Related Hydrocarbons. Weed Sci.27:7-16
- ◆ Teyssendier de la Serve, B., Axelos, M. and Péaud-Lenoël, C.(1985) Cytokinins Modulate the Expression of Genes Encoding the Protein of the Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex, Plant.Mol.Biol.5:155-170
- ◆ Van Standen, J.(1983) Seeds and Citikinins Physiol. plant 55:60
- ◆ Vázquez-Ramos, J. M. and Reyes, J. (1990) Stimulation of DNA Synthesis and DNA Polymerase Activity During Early Germination of Maize Embryo Axes, Can. J. Bot.45, 649.
- ◆ Watson,J.D.(1976) Biología Molecular del Gen. Fondo Educativo Interamericano 3ª Edición Pp.297-300

- ◆ Woodstock, L. M., and Tao, K. L.J (1981) Prevention of Imbibition Injury in Low Vigor Soybean Embryonic Axes by Osmotic Control of Water Uptake. *Plant Physiol* 5:133-139
  
- ◆ Zaráin, H. M., Bernal-Lugo, I. and Vazquez-Ramos. J. M. (1987) Effect of Benzyladenine on the DNA Synthesis During Early Germination of Maize Embryo Axes, *Mut. Res.*181:103-110
  
- ◆ Zuñiga Aguilar J. J. Efecto de Citocininas a Niveles Transcripcional y Traduccional Durante la Germinación de Maíz. Facultad de Química UNAM.1998.40-45

## APÉNDICE

### Medios y Soluciones empleadas.

#### Sondeo de biblioteca de DNA

##### ◆ Medio NZYDT con MgSO<sub>4</sub> y Maltosa

Peptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	0.5%
Agar	1.5%
MgSO <sub>4</sub>	0.01M
Maltosa	0.2%

##### ◆ Top Agar

Peptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	0.5%
Agar	0.7%

##### ◆ Solución desnaturalizante

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

##### ◆ Solución neutralizante

NaCl	1.5M
------	------

Tris -HCl pH8. 0.5M

◆ Solución de lavado

Tris-HCl (pH 7.5) 0.2 M

SSC 2x

◆ SSC. 20X

Para preparar 1 L de solución.

NaCl 3M

Citrato de sodio 0.3M

Ajustar pH 7

Extracción del DNA del vector Lamda

◆ Medio SM

NaCl 0.1M

MgSO<sub>4</sub> 0.01M

Tris HCl pH7.5 0.05M

Gelatina 0.01%

◆ Solución L1

NaCl 300mM

Tris.Cl pH7.5 100mM

EDTA 10mM

RNasaA, 0.2 mg/ml

DNasa I 6mg/ml

◆ Solución L2

Polietilen glicol al 30 %(PEG 6000)

NaCl 3 M

◆ Solución L3

NaCl 100mM

Tris.Cl 100mM.

EDTA 25 mM,

◆ Solución L4

dodecil sulfato de sodio (SDS) al 4 %

◆ Solución L5

Acetato de potasio 3 M pH 5.5

◆ Solución QBT

NaCl 750 mM,

MOPS 50 mM pH7.0

etanol 15 %

Triton X-100 al 0.15%

◆ Solución QC

NaCl 1.0 M

MOPS 50mM a pH 7.0

Etanol 15%

◆ Solución QF

NaCl 1.25 M

Tris.Cl	50 mM pH 8.5
Etanol	15%

### Hibridación

#### ◆ Solución de hibridación.

para 70 mL

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M	10.5mL
NaHPO <sub>4</sub> 1M	10.5mL
SDS(20%)	24.5mL
EDTA pH=8 (0.5)	140μL
H <sub>2</sub> O	24.4mL

#### ◆ Solución de lavado.

SSC	0.1 X
SDS	0.1 %

#### ◆ TSS(células competentes)

PEG 8000	10%
DMSO(Dimetil sulfoxido)	5%
MgCl <sub>2</sub>	35mM
Ajustar pH 5	

## Extracción del DNA del vector BluescripKS

### • Medio Luria

peptona	1g
extracto de levadura	0.5g
NaCl	0.5 g
H <sub>2</sub> O	100mL
♦ Solución 1	
Glucosa	50mM
Tris-Cl	25 mM pH 8
EDTA	10 mM pH 8
♦ Solución 2	
NaOH	0.2 N
SDS	1%
♦ Solución 3	
CH <sub>3</sub> COOK 5M	60%
ácido acético glacial	11.5 %
H <sub>2</sub> O	28.5 %
♦ FCI.	
Fenol	50%
Cloroformo	49%
Alcohol isoamilico	1%

## Secuenciación

DNA polimerasa termosecuensasa	4 U/ $\mu$ L
Pirofosfatasa inorgánica de <i>termoplasma acidophilum</i>	0.0006 U// $\mu$ L
Tris-HCl pH8	50mM
Ditiotrietol(DTT)	0.1M
ácido etilendiaminatetracético (EDTA)	0.1mM
Tween-20	0.5%
Nodinet P-40	0.5%
Glicerol	50%
◆ Amortiguador de reacción	
Tris HCl pH9.5	260mM
MgCl <sub>2</sub>	65mM
◆ Mezcla de terminación dITP	
dATP;dCTP,dTTP	7.5 $\mu$ M
dITP	37,5 $\mu$ M
◆ solución stop	
formamida	95%
EDTA	20mM
Azul de bromofenol	0.05%
Cianol xileno FF	0.05%
◆ Gel para secuenciación 8%	
Acrilamida	7.6%



Bis acrilamida	0.4%
Urea	42%
TTE 20X	4%
NH <sub>4</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.6%
TEMED	0.02%

- ◆ Amortiguador para secuenciación tolerante a glicerol 20X (TTE)

para preparar 1L

Tris Base	216g
taurina	72g
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	4g

Se esteriliza en la autoclave.

Este amortiguador se utilizó a una concentración de 0.8X para llevar a cabo la secuenciación.

- ◆ Cebadores utilizados para la reacción de PCR.

Cebador de amplificación Forward M13 : 5'-CCCAG TCACG ACGTT GTAAA ACG-3'

Cebador de amplificación Reverso M13: 5'-AGCGG ATAAC AATTT CACAC AGG-3'

**ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**