



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

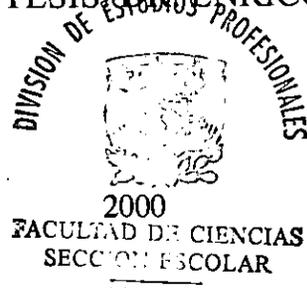
FACULTAD DE CIENCIAS

CLONACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS
EN LA REGULACIÓN DE LA MEIOSIS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A :
EMILIANO VILLORDO PINEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRICO PEROTTI



296637



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

CLONACION DE GENES INVOLUCRADOS EN LA REGULACION DE LA MEIOSIS.

realizado por **EMILIANO VILLORDO PINEDA**

con número de cuenta **8608454-9**, pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis **DR. ENRICO PEROTTI**
Propietario

Perotti
Sara Frias Vazquez

Propietario **DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ**

Propietario **M. en C. ELSA ESPINOSA HUERTA**

Espinosa Huerta

Suplente **DR. RENE CARDENAS VAZQUEZ**

Rene Cardenas Vazquez

Suplente **M. en C. MARIA BERENIT MENDOZA GARFIAS**

M.B.

**FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.**

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Edna Maria Suarez Diaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ.



DEDICATORIA

A:

*Mis Padres, Elia y Emiliano por ofrecerme siempre su confianza, apoyo y paciencia.
Y me han enseñado que trabajar es la mejor manera de triunfar como hijo y como persona.
A mi Mamá, Por que ha sacrificado parte de su vida por mi superación.*

*A Dolores Villordo, quien siempre me quiso en silencio a pesar de todo.
Por su apoyo y cariño. Por su fuerza y coraje.
Por su altruismo.*

*A Luis Villordo, quien tuvo la serenidad para hablar y callar.
Por su constancia y paciencia. Por su orgullo y comprensión.
Por su alegría.*

*A Erik Villordo, quien tuvo el coraje de soportar el peso de una familia.
Por su curiosidad e idealismo. Por su impetu y jovialidad.
Por su empeño.*

*A Carlos Flores, por la tranquilidad y el bienestar de su nueva familia.
Por su prudencia.*

*A Elsa Espinosa, quien siempre me a apoyado.
Por su cariño y alegría. Por su confianza y prudencia.*

*A Camila Villordo, Por la nueva alegría que trae dentro de ella.
Por su nueva esperanza.
Por su nueva luz.*

*A la memoria de
Miguel Pineda Oliver y mis abuelos Venancio y Ofelia Villordo
Descansen en Paz*

A TODOS GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios e investigación.

Al Dr. Enrico Perotti, Dra. Sara Frías, Dr. René Cárdenas, M.C. Elsa Espinosa y M.C. Berenit Mendoza, por aceptar formar parte de mi consejo. Por la orientación, apoyo y consejos al presente trabajo.

A el Dr. David Hoisington y el Dr. Yves Savidan, por el apoyo brindado.

A Enrico Perotti, Daniel Grimanelli, Mireille Khairallah y Marilyn Warburton, por sus consejos y su amistad.

A todos los compañeros del Centro de Biotecnología Aplicada del CIMMYT.

A mis profesores y compañeros de la Universidad.

A Isaac González, por su amistad, apoyo y por su ayuda durante todo este tiempo.

A Héctor Guillén por su amistad, apoyo y confianza en mi.

A Roberto Martínez e Isaac Rosas por su inolvidable compañía.

A Elsa por su amor e incondicionalidad.

El más sincero agradecimiento a Enrico Perotti, por haberme guiado en todo la investigación y redacción del trabajo, por dedicarme parte de su valioso tiempo, por su paciencia, enseñanza y sobre todo, por su amistad y respeto.
Gracias Perotti.



Contenido

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
REVISIÓN DE LITERATURA	6
APOMIXIS	6
Generalidades.....	6
Clasificación.....	6
Genética.....	7
Importancia.....	8
Herramientas Alternas.....	10
MEIOSIS	12
Generalidades.....	12
Fases de la Meiosis.....	12
Reproducción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
REGULACIÓN GÉNICA	16
Expresión de Genes.....	16
Checkpoints de la Meiosis.....	17
Genes Involucrados en la Regulación de la Meiosis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
COMPARACIÓN ENTRE GENES INVOLUCRADOS EN LA MEIOSIS EN DIFERENTES ESPECIES	20
MATERIAL Y MÉTODO	23
MATERIAL BIOLÓGICO	23
MÉTODOS	23
Diseño General.....	24
Elaboración de <i>Primers</i>	25
Amplificación.....	26
Clonación de <i>SPO13</i> e <i>IME1</i>	28
Secuenciación y Comparación de Secuencias.....	30
Hibridación y Cartografía.....	30
RESULTADOS	32
PARTE I Gen <i>SPO13</i>	32
<i>SPO13</i> en Levadura.....	32
Hibridación.....	34
<i>SPO13</i> en Maíz.....	36
Cartografía.....	38
PARTE II Gen <i>IME1</i>	39
<i>IME1</i> en Levadura.....	39
Hibridación.....	42
<i>IME1</i> en Maíz.....	43
Cartografía.....	45
DISCUSIÓN	46
PARTE I Gen <i>SPO13</i>	46
PARTE II Gen <i>IME1</i>	48



CONCLUSIONES	51
LITERATURA CONSULTADA	53
APÉNDICE	58
Aislamiento de DNA genómico de Maíz	58
Aislamiento de DNA genómico de Levadura.....	59
Cuantificación de DNA.....	60
Electroforesis en gel de Agarosa	60
Transferencia a membrana de Nylon.....	61
Marcaje de sonda	62
Hibridación y detección de sondas marcadas con digoxigenina.....	63



R esumen

La apomixis es un tipo de reproducción asexual que se caracteriza por una falla en la meiosis (apomeiosis). La apomixis fija el vigor híbrido, cualquier combinación que presente la variedad cultivada conservará el genotipo de origen materno. La producción de semilla híbrida y el proceso de selección podrían simplificarse si la característica apomíctica fuera transferida a cultivos de reproducción sexual como el maíz. Y mucho mejor si esta característica se presentará en el mismo genoma de maíz, como gen ortólogo para el gen que controla la apomixis, es decir, que se presente el mismo gen en diferentes especies, pero que su forma alélica sea posiblemente diferente.

En la apomixis aún se desconoce la cantidad de genes involucrados, por lo que el fin del presente estudio es contribuir a la investigación y localización de aquellos genes que participan en el proceso apomíctico, principalmente en la apomeiosis.

La meiosis es un proceso altamente conservado y evolutivamente importante. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se conocen los genes que regulan tal proceso. Por lo que en el presente estudio se postula la existencia de genes ortólogos para la falla de la meiosis entre *S. cerevisiae* y *Zea mays*. Para ello se estudian dos genes importantes en la inducción de la meiosis en levadura: *SPO13* e *IME1*, genes *checkpoint* de la meiosis.

El objetivo del presente estudio es la clonación de los posibles genes *checkpoint* en la meiosis del maíz de acuerdo con genes de levadura. Así mismo, estos genes se postulan como ortólogos, como una alternativa a la posible presencia de la apomixis (apomeiosis) en las plantas sexuales.

Se clonaron los genes *SPO13* e *IME1* de levadura: *Y SPO13* y *Y IME1*. Para *SPO13* la homología fue de un 97.1% en 517 pares de bases (pb) comparadas con el gen *SPO13* de *GenBank* de NCBI, además se demostró que en 153 aminoácidos comparados existe una similitud del 96% con la proteína específica de la meiosis. Para el clon *Y IME1*, la homología con el gen de *IME1* de *GenBank*, fue del 98.5% en 686 pb comparadas, en 207 aminoácidos comparados tiene una homología del 99% con la proteína inductora de la meiosis en *S. cerevisiae*. Todo lo anterior confirma que los clones obtenidos son amplificadores de los genes *SPO13* e *IME1*, por lo que el manejo y las técnicas utilizadas durante el proceso experimental fueron adecuadas.

Sin embargo, la comparación de secuencias entre el clon de maíz *18 SPO13* y el gen *SPO13* de *GenBank* demostró un porcentaje del 31.4% de similitud con 560 pb involucradas. Para el caso del clon *H1 IME1*, se observó únicamente el 31.9% de homología con 700 pb involucradas. Por lo tanto, podemos mencionar que los clones obtenidos no se trata de los genes ortólogos de levadura en maíz.

La hibridación para ambos clones de maíz con los respectivos clones de levadura, demuestra un reconocimiento entre la secuencia de levadura y algunas bandas de maíz, ya que son capaces de reconocerse e hibridarse, aún ante una fuerte astringencia. Esto nos puede indicar la existencia de posibles genes ortólogos entre ambas especies. Para corroborar esto, debemos probar otros clones, clones que posiblemente presente diferente peso molecular al esperado, ya que desconocemos la presencia de intrones en el genoma de maíz.

Los resultados del presente trabajo permiten demostrar la existencia de cierta homología u ortología de estos genes entre dos organismos distantes, por lo que es probable que podamos demostrar la homología entre diferentes genomas.



*I*ntroducción

En las plantas existen diferentes tipos de reproducción: la sexual y asexual. En la primera existen cambios génicos debido a la mezcla de genomas durante la meiosis y la fecundación. La meiosis, es la división celular que está destinada a dar origen a los gametos, esto implica dos divisiones celulares originando células con la mitad del número cromosómico de su progenitor, a este proceso celular se le considera altamente conservado y evolutivamente importante.

La reproducción asexual se basa principalmente en la duplicación íntegra del organismo a partir de la célula madre. Existen diferentes formas de reproducción asexual entre ellas la apomixis. La apomixis, es la reproducción asexual por medio de semilla en donde la apomeiosis (falla de la meiosis) y la partenogénesis (desarrollo del embrión sin fecundación) son dos fases importantes del proceso.

Ambos tipos de reproducción presentan ciertas ventajas. La reproducción sexual origina variabilidad del genoma por medio de la recombinación y la fecundación de los gametos. Mientras que en la reproducción asexual, la fijación de las características fenotípicas y genotípicas son una ventaja importante para la conservación de variedades y/o razas de especies.

La introducción del carácter apomíctico a una planta sexual, es decir, el remplazo de la reproducción sexual por la asexual, tiene muchas implicaciones biológicas, genéticas y evolutivas; sin embargo, puede representar grandes ventajas en cultivos de interés para el hombre. Introducir el carácter apomíctico a especies cultivables resulta importante en el mejoramiento genético, debido a que fija el vigor híbrido en las semillas híbridas originadas.

Actualmente se intuye que el carácter apomíctico se encuentra regulado por un gen o un grupo de genes ligados, dentro de los cuales se encuentran aquellos que están regulando la apomeiosis, es decir la falla de la meiosis. Por lo que sería importante saber cuáles son los genes que están regulando dicho proceso celular.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* representa un excelente modelo para tal propósito, debido a que está completamente determinada su secuencia de DNA, y es un



organismo que se reproduce en forma asexual o sexual de acuerdo a su medio. Se han identificado aquellos genes que regulan la meiosis.

La inducción de la meiosis es regulada por un conjunto de genes tempranos en *S. cerevisiae*, y que estos genes podrían presentar una homología entre diferentes especies, por ser una función conservada y de suma importancia a través del tiempo evolutivo. Entonces, se puede suponer que el proceso apomíctico o específicamente la apomeiosis, se debe a la falla de un o algunos genes que participan en la meiosis.

En el presente trabajo, se presenta un estudio de clonación de los posibles genes *checkpoint* en la meiosis de maíz, en base a genes *checkpoint* de levadura, como genes ortólogos a una alternativa a la posible presencia de la apomixis en las plantas sexuales, el cual tuvo como objetivos generales:

1. Amplificar, aislar y clonar las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes *SPO13* e *IME1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de *Zea mays*.
2. Comparar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los clones con una base de datos (*GenBank*), para determinar la homología de las secuencias entre ambas especies.
3. A través de un análisis cartográfico, se determinará la posición cromosómica de los clones *SPO13* e *IME1* en maíz, y su posible relación con el gen *elongate (ell)*, que se postula como ortólogo del gen que controla la apomixis.



*R*evisión de *L*iteratura

APOMIXIS

Generalidades

Apomixis se define como la reproducción asexual por medio de semilla, en donde se presenta un fracaso en la meiosis (apomeiosis) y el desarrollo de un embrión sin fecundación (partenogénesis), originando una descendencia genéticamente igual a la planta madre (Stebbins, 1950; Nogler, 1984a). Asker y Jerling (1992) la definen como la capacidad de formar un embrión sin la reducción en su número cromosómico. El embrión apomíctico puede formarse directamente de una megaspora madre no reducida, o de una célula somática de la nucela o del ovario.

La apomixis, representa un potencial económico importante debido a la fijación y conservación del genotipo de origen materno, generación tras generación. La producción de semilla híbrida y el proceso de selección podrían simplificarse siempre y cuando, la característica apomíctica fuese transferida a cultivos de reproducción sexual como el arroz, trigo o maíz (Hanna y Bashaw, 1987; Hanna, 1995).

Clasificación

El carácter apomíctico se ha identificado entre otras plantas en las angiospermas, aproximadamente en 300 especies incluidas en 35 familias (Asker y Jerling, 1992) de las cuales, las familias *Gramineae*, *Compositae* y *Rosaceae* integran el 75% de las plantas apomícticas (Nogler, 1984a; Richards, 1986).

Existen dos formas principales para la formación de los embriones apomícticos. La primera, es denominada apomixis esporofítica o embrionía adventicia, y la segunda, apomixis gametofítica o agamosperma gametofítica (Gustafsson, 1946; Asker y Jerling, 1992).



En la apomixis esporofítica, se desarrolla una planta a partir de un embrión que se origina de una célula somática del ovario (nucela o integumento) de la planta madre, sin el desarrollo de un saco embrionario. Este tipo de apomixis se presenta en plantas emparentadas con naranjos o limoneros (Asker y Jerling, 1992; Koltunow, 1993).

Dentro de la apomixis gametofítica existen dos modalidades: la diplosporia y la aposporia (Rieger *et al.*, 1976; Asker y Jerling, 1992). En la diplosporia se desarrolla el saco embrionario a partir de la célula reproductora (megaspóra), la falla en la meiosis forma directamente una megaspóra funcional, que a su vez experimenta mitosis, formando 8 núcleos en donde todos tendrán un número cromosómico diploide (figura 1). Este proceso se presenta en plantas de los géneros *Elymus* (emparentado con el trigo), *Tripsacum* (emparentado con el maíz) y en las compuestas como *Taraxacum* (Richards, 1986; Asker y Jerling, 1992). En la aposporia, el saco embrionario se forma cuando una célula somática de la nucela (tejido central del ovario) forma de manera directa la megaspóra, ésta se divide por mitosis dando origen al saco embrionario (figura 1), el cual puede tener cuatro u ocho núcleos según el tipo de aposporia (Nogler, 1984b).

Genética

En los estudios de genética de la apomixis, mencionan que se presenta una herencia simple y dominante sobre la sexualidad. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud el tipo de herencia que presenta (Mogie, 1988; Hanna, 1995).

La mayoría de los trabajos sobre el control genético de la apomixis son acerca de la apomeiosis, específicamente en la aposporia. Por ejemplo, en *Bothriochloa-Dichanthium* (Harlan *et al.*, 1964), *Panicum maximun* (Savidan, 1982) y *Ranunculus auricomus* (Nogler, 1984b) se demostró que la apomeiosis en las especies apospóricas es de herencia simple y dominante sobre la sexualidad (Savidan y Dujardin, 1992). Lo que fue confirmado por estudios realizados en especies como *Cenchrus ciliaris* (Sherwood *et al.*, 1994), en el género *Brachiaria* (Do Valle y Savidan, 1996) y en una población híbrida F1 entre *Zea mays* y *Tripsacum* (Leblanc *et al.*, 1995; Grimanelli, 1997; Espinosa, 1998).

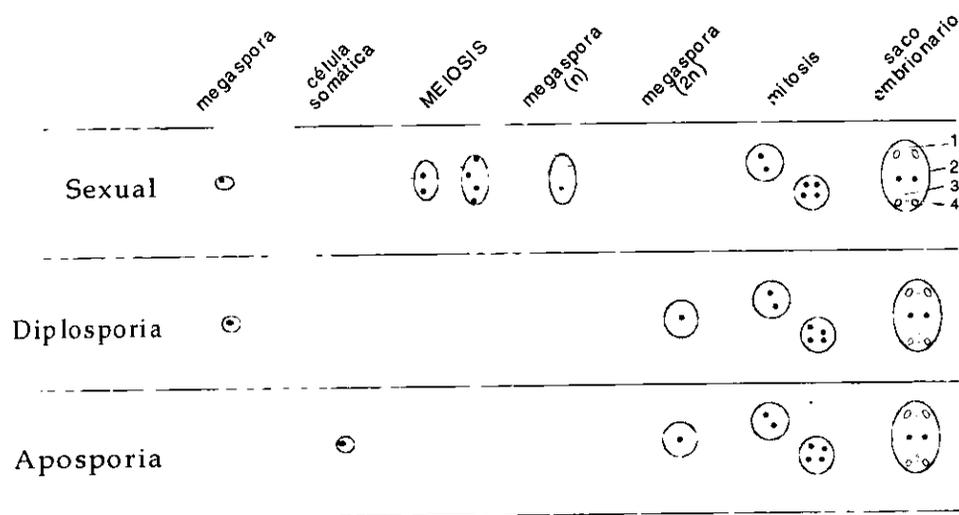


Figura 1. Esquema general comparativo entre la apomixis gametofítica y el proceso sexual (1. células antipodales; 2. núcleos polares; 3. oosfera y 4. sinérgidas).

Estudios recientes demuestran que la regulación de la apomixis no está controlada por un conjunto de genes, sin embargo, sugieren la posibilidad de un conjunto de loci ligados. Es decir, cualquiera que sea el número de genes involucrados se comportan como un solo gen. Ya que se observa una restricción a la recombinación de los marcadores ligados a la zona responsable de la diplosporia (Grimanelli, 1997; Espinosa, 1998).

Así como es importante definir la herencia genética de la apomeiosis, también lo es para la herencia genética de la partenogénesis. Savidan (1982) y Mogie (1992), plantean la hipótesis de que la partenogénesis es una consecuencia pleiotrópica de la ausencia de la meiosis, es decir, que él o los genes que controlan la apomeiosis tienen efectos sobre la regulación de la partenogénesis, debido a que la partenogénesis es cosegregante con la apomeiosis.

Importancia

En las prácticas tradicionales de cultivo cuando se crea una variedad híbrida mejorada, la siguiente generación presentará diferencias fenotípicas originadas por la segregación. Es difícil mantener a un cultivo con características constantes de



generación en generación, por lo que puede ser interesante encontrar una estrategia que pueda facilitar las prácticas de cultivo, y la conservación del germoplasma. La apomixis podría ayudar a fijar el vigor híbrido (cualquier germoplasma) generación tras generación, y facilitar las prácticas de cultivo (favoreciendo los mecanismos de fertilización) (Savidan y Dujardin, 1992; Savidan y Berthaud, 1994; Hanna, 1995).

La apomixis es un modo de reproducción que permite simultáneamente la conservación de un genotipo a través de varias generaciones, y su multiplicación por medio de semillas, esto beneficiaría a especies como el maíz (Savidan y Dujardin, 1992).

Sin embargo, se sabe muy poco acerca de su control genético y del impacto potencial en las poblaciones de cultivo naturales en el campo. Se menciona que para la transferencia del carácter apomíctico a especies cultivables como el maíz, se debe realizar una cruce híbrida entre variedades de una misma especie (hibridación intraespecífica) o de especies próximas (hibridación interespecífica) (Savidan y Dujardin, 1992). Tal es el caso del maíz (especie sexual) y *Tripsacum* (especies apomícticas) (Leblanc *et al.*, 1995 y Grimanelli, 1997).

En cultivos de maíz, la introducción del carácter apomíctico ha sido impedido por factores tales como: la restricción a la recombinación entre los cromosomas de la especie silvestre y la cultivada, la ocurrencia de la esterilidad en los híbridos, y una pobre producción de semillas en la progenie de las plantas (Rieger *et al.*, 1976; Asker y Jerling, 1992; Leblanc *et al.*, 1995; Grimanelli *et al.*, 1997).

La mayoría de las plantas presentan un ciclo de vida sexual. El maíz por ejemplo, se reproduce sexualmente, es decir, intervienen gametos haploides para dar origen a un nuevo individuo. En el maíz como en otros organismos, se presenta un ciclo de vida con alternancia de generaciones, en donde se observa un esporofito diploide y un gametofito haploide, separadas por la meiosis y la fecundación. La meiosis y la fecundación, permiten a la progenie tener una combinación genética única y diversa, incrementando la variabilidad genética y la adaptabilidad a los cambios ambientales.



Herramientas Alternas

El análisis de segregación no es suficiente para concluir acerca de un modelo genético sencillo de la apomixis, debido a que no se sabe con certeza si la apomixis esta regulada por uno o varios genes, como es el caso de la apomixis en *Tripsacum* (Leblanc *et al.*, 1995). Sin embargo, existen otras alternativas para identificar él o los genes que están involucrados en el proceso apomíctico. Por ejemplo, los elementos transponibles (transposones) y la utilización de genes candidatos.

Los elementos transponibles o transposones son secuencias de DNA de tamaño variable, "saltan" y se incorporan al azar a lo largo del genoma, produciendo mutaciones e inhibiendo la función del gen receptor, no dependen de la recombinación y en algunos casos son secuencias conocidas (Walbot, 1996). Producen diversidad genética y son elementos tan numerosos que pueden llegar a representar del 10 al 50% del genoma de un organismo (Capy *et al.*, 1998). Estos elementos pueden ser interesantes debido a que pueden inhibir de manera aleatoria la función de nuestro interés, y de esta manera sería posible identificar el gen de interés, para nuestro caso el gen que controla la apomixis.

Los genes candidatos son aquellos que se encuentran relacionados con una característica específica en genomas de diferentes especies, es decir, que se trate de genes similares. En el caso de la apomeiosis, se postula encontrar estos mismos genes en el maíz, pero no con las mismas formas alélicas (Ahn y Tanksley, 1993). Otra de las razones para pensar esto, es la existencia de relaciones de parentesco entre *Tripsacum* y maíz. Esto sugiere que los genes involucrados en la expresión apomíctica en *Tripsacum*, se podrían encontrar en el genoma de maíz, es decir, que existan genes ortólogos (genes que divergen de un solo gen y que al paso del tiempo evolucionaron junto con la especie, presentando diferentes formas alélicas).

Como ejemplo tenemos el estudio de un mutante de maíz *elongate* (*ell*), con características similares al proceso apomíctico. El mutante *elongate*, presenta un número variable de gametos no reducidos fecundados, característica similar a la diplosporia. Grimanelli, 1997 y Espinosa, 1998, mencionan que debido a la alta colinearidad de genomas entre maíz y *Tripsacum* (apomíctico) para la zona que controla la diplosporia, hace suponer que se trate del mismo gen pero en diferentes formas alélicas.



Posiblemente, algunos de los genes que participan en la meiosis de la levadura sean ortólogos en otros organismos. Nugroho y sus colaboradores (comunicación personal), realizan estudios con genes que inducen el proceso meiótico en *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo una homología del 70% en 375 pares de bases, entre el posible gen homólogo *RIM11* de levadura y arroz, *RIM11* codifica para una cinasa encargada de la inducción para los genes *IME1* e *IME2*. De esta manera se puede hallar una alternativa molecular al estudio de la apomixis.

La levadura *S. cerevisiae*, se ha utilizado como un modelo para el estudio de la biología molecular, siendo uno de los eucariotas más útiles para estudiar la regulación génica, debido a su pequeño genoma y a la duración de su ciclo celular, por lo que su manipulación experimental resulta sumamente fácil (Watson *et al.*, 1983). Actualmente se ha secuenciado su genoma completamente que consta de aproximadamente 6,200 genes (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau *et al.*, 1997; Wodicka *et al.*, 1997).

Al mismo tiempo, en la levadura se pueden estudiar algunos fenómenos muy complejos propios de los eucariotas, como la estructura de los cromosomas, las división meiótica y mitótica, etcétera (Watson *et al.*, 1983). Se han aislado y localizado cientos de mutaciones que afectan a la nutrición, la sexualidad, la división celular y la sensibilidad a las radiaciones en este organismo (Watson *et al.*, 1983).

La levadura es particularmente interesante para el estudio genético, porque puede mantenerse en estado haploide o diploide de acuerdo a su medio ambiente; se puede inducir a la meiosis en las células diploides y obtener células haploides. La ingeniería genética molecular en levadura ha permitido avanzar considerablemente en la biología molecular de los eucariotas (Watson *et al.*, 1983; Darnell *et al.*, 1986), lo que ha convertido a este organismo en un modelo adecuado para el estudio de genes. Ahí la importancia del estudio de genes involucrados en la meiosis de la levadura para este trabajo.



MEIOSIS

Generalidades

La meiosis, es la división celular que está destinada a dar origen a los gametos (Darnell *et al.*, 1986). La producción de gametos asegura que cada uno de estos contendrá un representante de cada par de cromosomas homólogos de cada progenitor (Strickberger, 1993).

Es un proceso altamente conservado (Iino *et al.*, 1995), en el cual, los eucariotas generan células haploides que participan en la reproducción sexual (McCarroll y Esposito, 1994).

La replicación del DNA premeiótico es seguida por la meiosis I, primera división que resulta de la segregación de cromosomas homólogos. La segunda división es ecuatorial, meiosis II, en donde las cromátidas hermanas separadas generan cuatro núcleos haploides (Darnell *et al.*, 1986) (figura 2).

Fases de la Meiosis

La meiosis está dominada por la profase en la división meiótica I, puede ocupar hasta un 90% del periodo meiótico total. En este momento, cada cromosoma está formado por dos cromátidas estrechamente unidas. En la fase de leptoteno, se han condensado los cromosomas mostrándose como una larga y fina hebra. Se considera la fase zigoteno, cuando se inicia la sinapsis entre cromosomas homólogos, comienza entonces la formación del complejo sinaptonémico. Durante la etapa del paquiteno, ocurren sucesos de entrecruzamiento cromosómico, en donde cada par de cromosomas homólogos se mantiene unidos por un complejo sinaptonémico, cada suceso de entrecruzamiento está mediado por un gran nódulo de recombinación y da lugar a la formación del quiasma. Finalmente en el diploteno, se disgrega el complejo sinaptonémico, para luego entrar a la etapa de transición entre la profase I y la metafase I (Darnell *et al.*, 1986; Griffiths *et al.*, 1996).



La variación genética conseguida en la profase I es debido al entrecruzamiento o intercambio de material genético entre cromátidas de cromosomas homólogos, por tal motivo, las cromátidas hermanas son diferentes unas de otras (Alberts, 1983).

En la metafase I se alinean los pares sinápticos en el plano ecuatorial de la célula. Para la anafase I las cromátidas hijas permanecen unidas por sus centrómeros y los cromosomas de cada par se desplazan hacia los polos. En la telofase I aparece una membrana alrededor de cada grupo de cromosomas (Darnell *et al.*, 1986; Griffiths *et al.*, 1996) (figura 2).

Una segunda división celular (acontecimientos similares a la mitosis sin replicación del DNA) en donde cada cromátida hermana se segrega hacia una célula haploide distinta (Alberts, 1983) (figura 2).

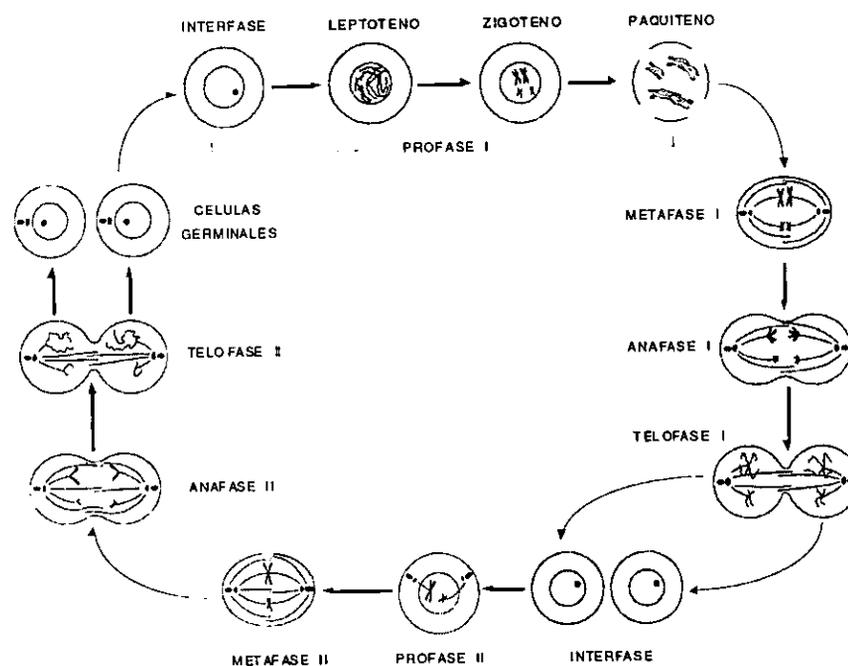


Figura 2. Esquema general de la meiosis.

La recombinación genética entre los cromosomas durante la meiosis proporciona un nuevo surtido de genes, derivado de la recombinación de ambos progenitores. Así, a través de los ciclos de la haploidía, fusión, diploidía y meiosis, desaparecen las antiguas combinaciones de genes y se crean otras nuevas. Entonces,



la participación de la recombinación en la meiosis es importante por la diversidad generada en la información genética (Alberts, 1983).

La reproducción sexual ha sido favorecida por la evolución debido a la recombinación genética al azar, ya que aumenta las probabilidades de producir por lo menos algunos descendientes que sobrevivirán en un ambiente cambiante de forma impredecible. La sexualidad presenta grandes ventajas, dado que ha sido adoptada por la gran mayoría de los organismos (Alberts, 1983).

Sin embargo, la reproducción asexual también tiene sus ventajas como: la fijación del germoplasma, y así reproducir y/o preservar íntegro el genoma de variedades de maíz y otros cultivos, objetivo substancial de la investigación en la apomixis.

Por ende, es importante conocer tanto el funcionamiento de los procesos de reproducción, en este caso la meiosis como los procesos de regulación dados por los genes.

Reproducción de Saccharomyces cerevisiae

La mayoría de las levaduras crecen en la naturaleza como organismos diploides, formando esporas haploides a y α como respuesta a ciertos cambios ambientales. Al germinar las esporas haploides forman células o colonias a y α . Dos células del tipo reproductor opuesto se fusionan regularmente para dar origen a células diploides (Reed y Pepler, 1973; Darnell *et al.*, 1986) (figura 3).

En condiciones de crecimiento favorables, las células diploides se reproducen asexualmente por gemación. La falta de nitrógeno o la ausencia de fuentes de carbono fermentable (glucosa) en células diploides, causa la salida del crecimiento vegetativo para entrar a la meiosis y la formación de esporas (Darnell *et al.*, 1986; Park *et al.*, 1996). Las condiciones de inanición son necesarias para inducir la meiosis (Mitchell y Bowdish, 1992).

La célula diploide forma una pared resistente llamada asca, en cuyo interior se lleva a cabo la meiosis, de modo que los cromosomas se reparten independientemente formando cuatro ascosporas haploides (Klapholz y Esposito, 1980) (figura 3). Si el asca



vuelve a un medio favorable, las parejas de esporas se fusionan entre ellas para formar células diploides (Darnell *et al.*, 1986).

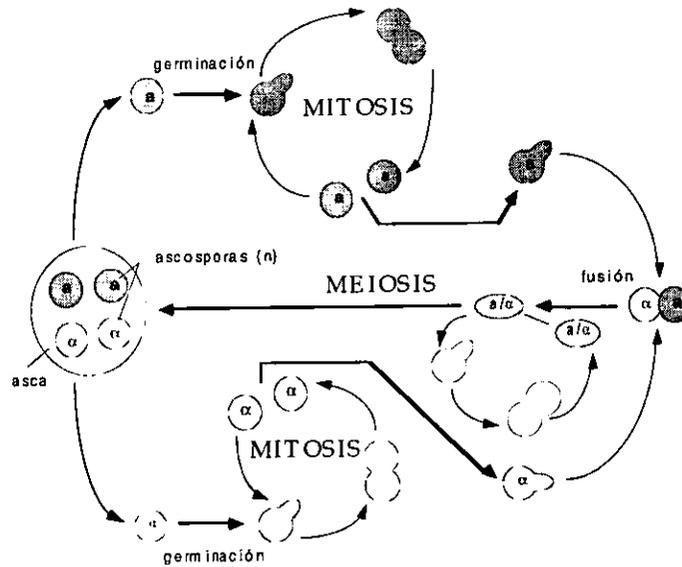


Figura 3. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. Durante su ciclo de vida, la levadura puede reproducirse en forma sexual o asexual de acuerdo a su medio.

La esporulación de las levaduras presenta diversas ventajas para la investigación, ya que pueden obtenerse mutantes que bloqueen etapas específicas de la meiosis; también, puede inducirse la meiosis sincrónica en gran cantidad de levaduras diploides (Darnell *et al.*, 1986).

Para nosotros es importante conocer el proceso meiótico en la levadura, principalmente debido a la posible ortología entre levadura y maíz para el o los genes que controlan la meiosis. Y que conociendo esto se extrapolaría a las plantas, ya que una falla en la meiosis se verá reflejado en su reproducción y dando acceso posiblemente a la apomeiosis.



REGULACIÓN GÉNICA

Expresión de Genes

La expresión de los genes está regulada por numerosas proteínas que presentan dominios tales como: *hélice-giro-hélice*, *homeodominio*, *dedos de zinc*, *cremallera de leucinas*, *hélice-bucle-hélice*, etcétera. La actividad de un gen es el resultado de la acción de muchas proteínas que actúan en sinergia. Estas proteínas son capaces de fijarse al DNA en sitios específicos, y bloquear o favorecer la expresión de estos en función de las necesidades de la célula. Cada una de estas proteínas está codificada en un gen. Si todos los genes de un organismo estuvieran codificando al mismo tiempo, todas las células fabricarían las mismas proteínas, y por lo tanto, serían idénticas, por lo que es necesario un mecanismo de regulación génica (Chouard y Yaniv, 1994).

Las células especializadas se diferencian unas de otras en virtud de las proteínas que producen. Gran parte del control de la expresión génica en que se basan estas diferencias, parecen actuar al nivel transcripcional del DNA (Alberts, 1983).

Las proteínas reguladoras son capaces de fijarse en las proximidades de sus genes blanco, como respuesta a señales procedentes del exterior e interior de la célula. Debido a estas propiedades, la expresión de los diferentes genes puede controlarse en función a la situación fisiológica de las células o del organismo (Chouard y Yaniv, 1994).

El ciclo celular esta regulado por un conjunto de reacciones enzimáticas, en donde las proteínas claves son las cinasas (Murray, 1992). Además, evidencias experimentales proponen que el ciclo celular es regulado por un gen o un conjunto de genes claves, cuyo proceso es denominado *checkpoint* o genes *checkpoint*, estos genes claves cuentan con la información necesaria para el control de su retroalimentación que fue identificado por medio de organismos mutantes (Hartwell y Weinert, 1989; Nurse, 1991; Murray, 1992).

La meiosis en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un proceso que ha demostrado ser inducido por factores del medio ambiente, factores que regulan y/o inducen la expresión de genes tempranos de la meiosis. Estos genes tempranos, son los



responsables de la cascada de expresión para los genes que controlan el proceso meiótico, algunos de estos genes son denominados *checkpoint*, los cuales una vez activados el proceso es irreversible.

Checkpoints de la Meiosis

En 1971, Masui y Smith descubrieron que los ovocitos de rana que llevan a cabo la meiosis, contenían una sustancia capaz de inducir este proceso. Masui denominó a esta sustancia factor promotor de la maduración (*FPM*). Este factor fue aislado en 1988 y fue tomado como el posible regulador de la mitosis y la meiosis (Murray y Kirschner, 1991). El *FPM* es un complejo proteínico que es activado una vez que se ha fosforilado, y se llegó a considerar como un *checkpoint* para el ciclo celular (Murray, 1992).

Otra sustancia que participa en el desarrollo del ciclo celular es la ciclina, sustancia que desaparece al final de la mitosis, debido a su degradación y acumulación durante la interfase. Tal fluctuación sugería la posibilidad de que la ciclina fuera la molécula que regulaba este proceso de división. Estudios de la ciclina con mRNA demostraron su participación en la división meiótica. Existiendo dos clases de ciclinas: la que regula la entrada en mitosis y meiosis, y la que controla la replicación del DNA (Murray y Kirschner, 1991).

Las formas mutantes meióticas se identifican cuando se detienen algunos procesos específicos del ciclo, debido probablemente a la modificación de un gen que regula los diferentes procesos y que son importantes para que continúe la división meiótica. Estos genes cruciales forman el grupo que se conoce como genes del ciclo de división celular (*CDC*); por su actividad química a las proteínas *CDC* se les incluye dentro de las cinasas.

En la actualidad se conocen aproximadamente 300 genes que participan en el ciclo celular y mitosis de *S. cerevisiae*, y 600 en meiosis (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau *et al.*, 1997). De los 600 genes meióticos sólo unos cuantos figuran como genes *checkpoint* (figura 4) (Su y Mitchell, 1993; Steber y Esposito, 1995).

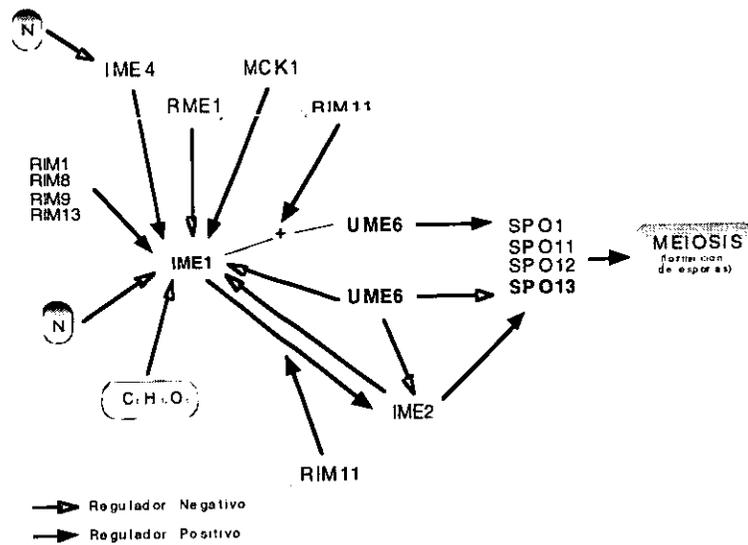


Figura 4. Esquema que muestra un posible mecanismo de acción de los genes responsables en la inducción de la meiosis. En donde *IME1* es prácticamente el gen central del proceso. Los genes *IME1*, *UME6*, *SPO13* y *RIM11* principalmente son considerados como genes *checkpoint*.

En suma, los *checkpoint* son genes importantes para la activación del ciclo celular, aumentado la fidelidad del proceso durante la reproducción (Nurse, 1991). La apomeiosis se puede originar de una alteración en los *checkpoint*, ya que la ausencia o inactividad de los *checkpoint* en la meiosis inhibiría completamente la reproducción sexual.

Genes Involucrados en la Regulación de la Meiosis de *Saccharomyces cerevisiae*

El esquema de la figura 4 muestra a los genes inductores de la meiosis, en donde *IME1* participa como un gen central, controlado tanto por reguladores negativos (*RME1*, *IME2*, glucosa y nitrógeno) como positivos (*IME4*, *RIM1*, *RIM8*, *RIM9*, *RIM11*, *RIM13* y *MCK1*). La asociación entre *IME1-UME6* induce a los genes *SPO1*, *SPO11*, *SPO12* y *SPO13*, que a su vez inducen la formación de esporas (Smith y Mitchell, 1989; Smith *et al.*, 1990; Su y Mitchell, 1993; Mitchell y Bowdish, 1992; Steber y Esposito, 1995).



El gen *IME1* es importante debido a que es un gen *checkpoint* de la meiosis, la inhibición de *IME1* en *S. cerevisiae* bloquea el proceso meiótico. *IME1* es esencial para inducir la meiosis, aún cuando no es requerido para el crecimiento de la levadura (Lee y Honigberg, 1996; Rubin-Bejarano, 1996). Sin embargo, la sobreexpresión de *IME1* no permite una total expresión de otros genes tempranos de la meiosis (Vidan y Mitchell, 1997); pero, cuando existen concentraciones idóneas de mRNA, no se podrá detener el proceso de inducción meiótica, aún cambiando a la levadura de su medio (Lee y Honigberg, 1996). Más aún, en células haploides la expresión de *IME1* puede ser tóxico e incluso letal (Mitchell y Bowdish, 1992).

La fosforilación por medio de la proteína cinasa *RIM11* del gen *IME1*, permitirá la formación del complejo entre *IME1* y *UME6* (Li y Mitchell, 1997; Malathi *et al.*, 1997) el cual iniciará el proceso meiótico.

UME6 es un gen importante en el proceso meiótico debido a que es un inductor de los genes tempranos de la meiosis. El complejo entre las proteínas *UME6* e *IME1* se une a la secuencia promotora *URS1* [T(A/G)G(C/G)CG(G/C)C(G/T)A] sitio que flanquea casi todos los genes tempranos meióticos (Steber y Esposito, 1995; Xiao *et al.*, 1996). Lo que convierte a *UME6* en un regulador del proceso (Steber y Esposito, 1995; Xiao *et al.*, 1996).

En la levadura *S. cerevisiae* el producto final de la meiosis son las esporas haploides (esporulación), en la que participan genes específicos de la meiosis denominados *SPO* (Esposito y Esposito, 1974). De los cuales *SPO1*, *SPO11*, *SPO12* y *SPO13* son considerados genes tempranos de la meiosis o genes específicos de la esporulación (figura 4) (Esposito y Esposito, 1974; Klapholz y Esposito, 1980; Klapholz *et al.*, 1985; Malone *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que *SPO13* es un gen requerido para llevar a cabo las dos divisiones sucesivas de la meiosis (McCarroll y Esposito, 1994), y además, presenta la secuencia promotora *URS1* (Buckingham *et al.*, 1990).

Levaduras con *SPO13* mutado produce esporas diploides, es decir, no hay división reduccional, proceso similar a lo que sucede en la apomeiosis (Klapholz y Esposito, 1980; Malone y Esposito, 1981; Wang *et al.*, 1987).

Diversos experimentos han demostrado que la expresión de *SPO13*, ocurre regularmente en condiciones de inanición (Wang *et al.*, 1987); además, la



sobreexpresión de *SPO13* durante la meiosis causa un bloqueo transitorio en la terminación de la división de la meiosis I (McCarroll y Esposito, 1994).

COMPARACIÓN ENTRE GENES INVOLUCRADOS EN LA MEIOSIS EN DIFERENTES ESPECIES

Kimura (1979) y su teoría neutralista de la evolución molecular postula que la mayoría de los genes mutantes no presentan ventajas adaptativas entre los genes a los que sustituyen.

Los estudios de genética molecular han hecho posible comparar individuos genéticamente emparentados, moléculas específicas de RNA y proteínas son utilizados para analizar la forma alélica de los genes y como son sustituidos durante la evolución. Esto permitió el estudio de la variabilidad de los genes dentro de una misma especie y llegar a la conclusión: que la mayoría de las sustituciones de nucleótidos acaecidas en el transcurso de la evolución, deben ser el resultado de la fijación al azar de mutantes neutros o casi neutros (Kimura, 1979).

Para cada proteína, la tasa de evolución en términos de sustituciones de aminoácidos por año es prácticamente constante y muy parecida en las distintas filas filogenéticas. Por ejemplo, en una cadena de aminoácidos de mamífero, la molécula de la hemoglobina en la cadena α , tiene 141 aminoácidos, se da aproximadamente un cambio cada siete millones de años (figura 5). Por lo que la velocidad de evolución de una proteína, depende de que tantos cambios neutrales pueden aceptar en su secuencia de aminoácidos, sin que se altere su función (Kimura, 1979).

El código genético presenta tripletes de nucleótidos que codifican para un mismo aminoácido (Griffiths, 1996), en donde el 70% de las sustituciones de nucleótidos al azar afectan a la tercera posición, son cambios sinónimos que no conducen a ningún cambio de aminoácidos y dan lugar a la misma proteína. Así, la teoría de Kimura postula que los diferentes genes entre especies pueden tener ninguna o casi ninguna diferencia, con respecto a la secuencia de sus aminoácidos (Dickerson, 1972; Kimura, 1979).



Comparación de las frecuencias de cambio de aminoácidos

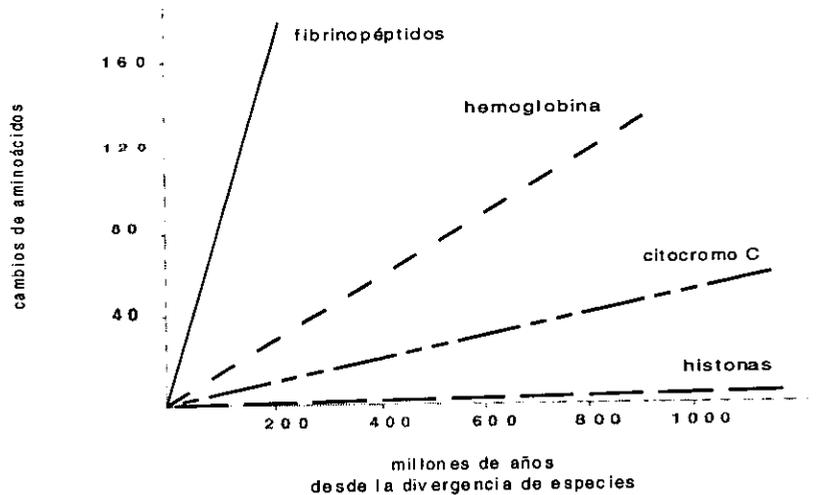


Figura 5. *Reloj molecular*. Mutaciones de nucleótidos a través del tiempo evolutivo en diferentes proteínas.

Dickerson (1972), realizó un estudio al que denominó *reloj molecular*, el cual consiste básicamente en comparar secuencias de aminoácidos de distintos organismos de diferentes filogenias. Con la ayuda de fórmulas matemáticas, el récord paleontológico y el porcentaje de aminoácidos diferentes entre dos organismos, se obtienen resultados tales como el caso de la proteína histona IV, que presenta cambios de sustituciones de aminoácidos casi nulo a través del tiempo evolutivo, mientras que proteínas como los fibrinopéptidos e incluso la hemoglobina presentan tasas de cambios de aminoácidos excesivamente altos en comparación con las histonas (figura 5).

La función de la histona IV involucra a casi todos los aminoácidos de manera específica, por lo que evoluciona muy lentamente, pues casi todas las mutaciones que recibe alterarían su función y el organismo que lo presenta desaparece.

Nugroho y sus colaboradores (comunicación personal), han realizado estudios con arroz y *Saccharomyces cerevisiae* para determinar la similitud del gen *RIM11*. Sus resultados han determinado una homología del 53% de identidad de aminoácidos para *RIM11*, por lo que es posible que se trate de un gen ortólogo.



Otros estudios comparativos entre secuencias para genes involucrados en alguna fase de la meiosis de la levadura *S. cerevisiae* son por ejemplo:

a) *RAD9* (proteína del ciclo celular), es una proteína que tiene un 26% de similitud con la *rhp9* de *Schizosaccharomyces pombe* (Willson *et al.*, 1997).

b) La proteína del gen *CDC2* (proteína cinasa) de maíz, es un gen altamente similar en diferentes especies, por ejemplo, con *Oryza sativa* presenta un 93% de identidad en 294 aminoácidos; en *Chenopodium rubrum* es 86% idéntico en 293 aminoácidos; en *Allium cepa* es 85% idéntico; 88% en *Picea abies*; 86% en *Antirrhinum majus*; 86% para *Petroselinum crispum*.

c) Se han realizado estudios de comparación genómica entre maíz y levadura, por ejemplo, entre el gen *ERG6* de levadura con el de maíz (proteína del endospermo C-24 esterol metiltransferasa) mostrando un 46% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Este mismo gen presenta el 75% y 37% de identidad de aminoácidos, con soya y *Arabidopsis* respectivamente (Grebek, 1997).

Por lo anterior, se considera que hay pruebas que permiten suponer la existencia de homologías de genes entre diferentes especies.

Por lo que en el presente trabajo tratamos de demostrar una posible homología de los genes responsables de la inducción de la meiosis, entre levadura y maíz, y por lo tanto su ortología para la apomeiosis.



*M*aterial y *M*étodo

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado fue el DNA de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* y un híbrido de maíz *Zea mays* H1 del CIMMYT, híbrido entre las líneas CLM135 y CLM139.

S. cerevisiae tiene genes importantes que están involucrados en la regulación de la meiosis, tales como: *IME1*, *UME6*, *SPO13*, *IME2*, *IME4*, *RIM11*, entre otros. La utilización de cualquiera de estos genes resulta sumamente interesante para el presente trabajo. Los genes que se eligieron para clonar fueron aquellos que se encuentran involucrados en la regulación de la meiosis en *S. cerevisiae*: *SPO13* e *IME1*.

El gen *SPO13* es de gran importancia por su participación y relación directa con la esporulación de *S. cerevisiae* (Klapholz y Esposito, 1980; Malone y Esposito, 1981; Klapholz *et al.*, 1985), ya que produce esporas diploides, fenotipo similar al que se da en la apomeiosis.

IME1 es un gen central en la inducción de la meiosis (Mitchell y Bowdish, 1992; Su y Mitchell, 1993). Su producto es un factor transcripcional requerido para la expresión de otros genes como *IME2* (Smith y Mitchell, 1989), se activa cuando disminuyen las concentraciones de nitrógeno y glucosa como respuesta al medio cambiante, iniciando así la meiosis (Foiani *et al.*, 1996).

MÉTODOS

La extracción del DNA genómico de maíz se realizó conforme a los protocolos del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada (AMGLab) del CIMMYT (Hoisington *et al.*, 1994). Para la extracción de DNA genómico de levadura, el protocolo se basó en el propuesto por Ausubel *et al.* (1994), *Protocolo de Biología Molecular* utilizando levaduras liofilizadas (ver apéndice).



La cuantificación del DNA y las técnicas de electroforesis, *PCR*, marcaje de DNA, transferencia (*Southern blotting*) e hibridación, fueron realizadas según los protocolos del *AMGLab* del CIMMYT (Hoisington *et al.*, 1994) (ver apéndice).

Diseño General

El procedimiento de laboratorio se muestra en la figura 6, en donde se observa de manera global el diagrama del proceso de laboratorio.

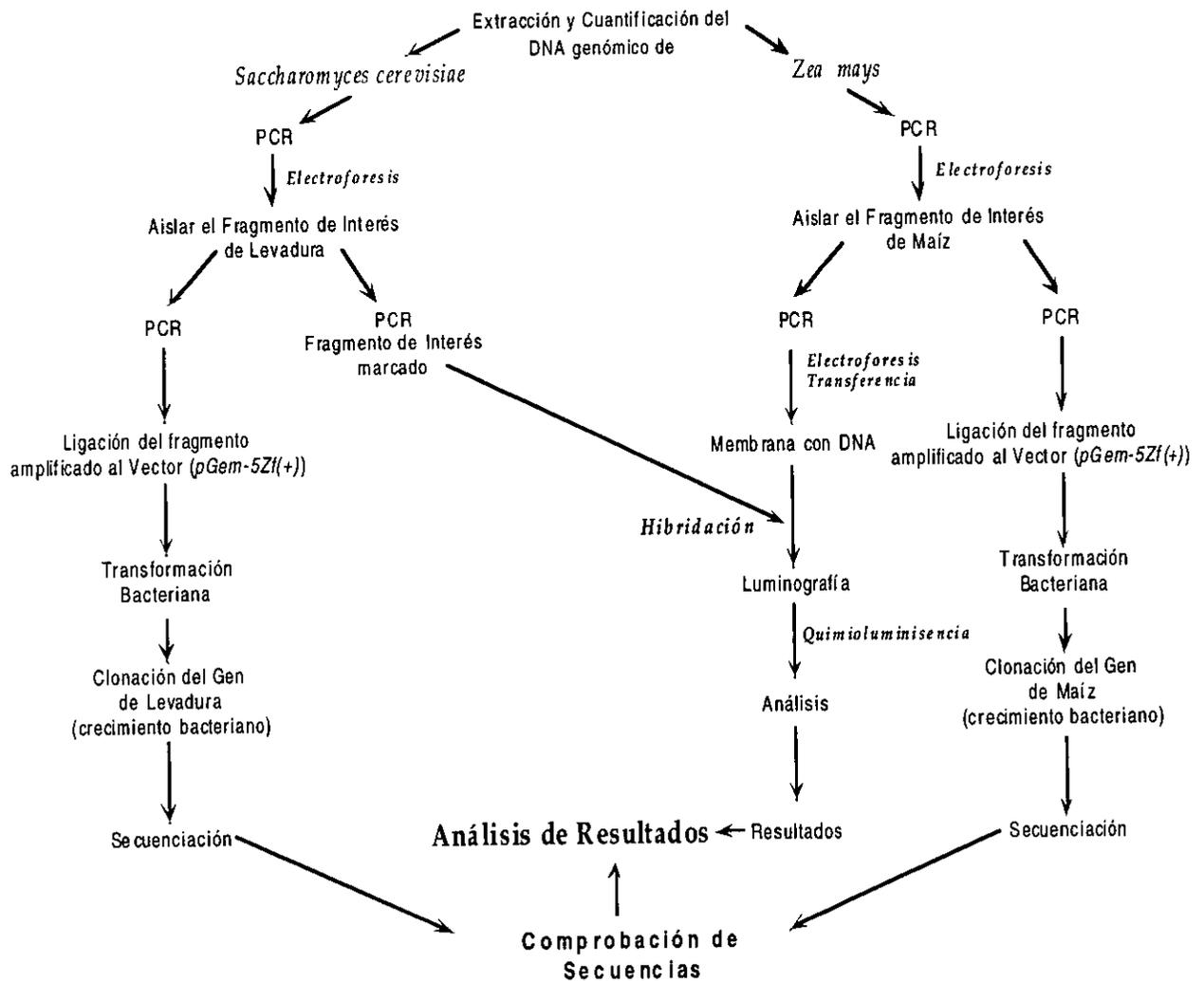


Figura 6. Esquema general del diseño experimental.



Elaboración de Primers

El diseño de los *primers* para los genes *SPO13* e *IME1*, se realizó con el programa OLIGO Ver. 4.0, *Primer Analysis Software for Macintosh*, programa multifuncional que realiza una búsqueda para seleccionar los oligonucleótidos o *primers* de acuerdo con la secuencia de DNA a amplificar para la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Además, de determinar la posición, longitud y condiciones fisicoquímicas ideales para su uso.

La primera condición para el diseño de los *primers* es la secuencia de nucleótidos a amplificar de *SPO13* e *IME1* de *Saccharomyces cerevisiae* (DNA molde). Para lo cual, la pareja de *primers* deben ser complementarios al DNA molde; además, se debe tomar en cuenta que los *primers* no deberán reconocer más de una zona del DNA molde, y de la misma manera no deben reconocerse asimismo o al *primer* complementario.

En base a los planteamientos de Kimura (1979) y Dickerson (1972), los genes *SPO13* e *IME1* de levadura son genes que posiblemente se encuentren en maíz (genes ortólogos). Si así lo fuera, la secuencia de aminoácidos de estos genes en maíz sería posiblemente muy similar con respecto a los de levadura, es por ello que se diseñaron *primers degenerados*.

Se les denomina *primers degenerados* por sus tripletes de nucleótidos que lo conforman; estos tripletes codifican para aminoácidos que contengan la menor cantidad de combinaciones posibles de nucleótidos de acuerdo al código genético [fenilalanina (TTT, TTC); isoleucina (ATT, ATC, ATA); metionina (ATg); tirosina (TAT, TAC); histidina (CAT, CAC); glutamina (CAA, CAg); asparagina (AAT, AAC); lisina (AAA, AAg); ácido aspártico (gAT, gAC); ácido glutámico (gAA, gAg) y cisteína (TgT, TgC)], con la finalidad de producir la menor cantidad de posibles combinaciones de *primers*, y que alguna de dichas combinaciones reconozca la secuencia de nucleótidos en otro organismo (en este caso DNA genómico de maíz).

Los *primers degenerados* son un conjunto de iniciadores que de acuerdo al código genético, son secuencias de nucleótidos que codifican para una misma secuencia de aminoácidos, por ejemplo, dos secuencias del *primer 1 Forward* de *SPO13* (tabla 1) CAA gAA AAA ACA CCA AAT T y CAg gAg AAg ACg CCg AAC T, codifican para la secuencia QEKTPN de aminoácidos. Suponiendo que verdaderamente exista una ortología entre *SPO13* e *IME1* en levadura y maíz, uno de los tantos *primers* reconocerá



a dichos genes en ambos genomas, incluyendo posibles diferencias o cambios entre sus secuencias.

Las secuencias de los *primers* diseñados para cada gen se muestran en la tabla 1. Donde se presenta dos *primers Forward* y dos *Reverse*, con el fin de obtener por medio de combinaciones la mejor pareja de *primers* en función a la temperatura de reconocimiento *primer*-DNA molde, y a su calidad de amplificación por *PCR*.

SPO13 1 *Forward* 5' CAR gAR AAR ACN CCN AAY Y 3'
SPO13 2 *Forward* 5' gAR ATH AAR AAY AAR gAR AT 3'
SPO13 3 *Reverse* 5' TAC ATN ggN gWN ggN gCD AT 3'
SPO13 4 *Reverse* 5' NgW YTC RTA RTC NgW RCA RT 3'

IME1 1 *Forward* 5' gAR CAR CAR CAR CAR CC 3'
IME1 2 *Forward* 5' AAY AAY CAY gAY AAY TT 3'
IME1 3 *Reverse* 5' ACY TTR TCR TAR TAR TCY Tg 3'
IME1 4 *Reverse* 5' ART TNg TNC WYT TRT gR 3'

Tabla 1. *Primers* para los genes *SPO13* e *IME1*, (D: T/A/g; H: T/C/A; N: T/C/A/g; R: A/g; W: T/A; Y: T/C).

Las temperaturas de alineamiento *primer*-DNA molde en la *PCR* fueron de 38, 40, 42, 44 y 46°C. Una vez determinadas la temperatura y la combinación de *primers* adecuados, para los genes *SPO13* e *IME1* en *S. cerevisiae*, se desarrolló el mismo procedimiento para el DNA genómico de maíz. Con el objetivo de obtener una amplificación lo más idéntico posible a la levadura.

Amplificación

Todas las amplificaciones por *PCR* fueron realizadas de acuerdo a las siguientes concentraciones:



	[Concentración Final]	
Primer F (2 μ M)	0.5 μ M	5 μ l
Primer R (2 μ M)	0.5 μ M	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 μ M	0.6 μ l
Taq Buffer (10X)	1X	2 μ l
dNTP's (1 mM)	0.2 μ M	4 μ l
TAQ Polimerasa BRL (5U/ μ l)	1U	0.2 μ l
ddH ₂ O		2.2 μ l
DNA genómico (10ng/ μ l)	10 ng	1 μ l
Volumen Total		20 μl

Es importante señalar que cada una de las combinaciones de *primers* amplifica diferentes tamaños de fragmentos, debido a que cada juego reconoce su secuencia homóloga a diferentes distancias a lo largo del gen. El tamaño de los fragmentos amplificados correspondientes a los genes *SPO13* e *IME1* en levadura se observan en la figura 7.

La diferencia de cada fragmento amplificado se basa en su número de pares de bases (pb), lo que se verá reflejado directamente en su peso molecular, esto significa una ventaja para la identificación y selección de cada uno de los fragmentos de DNA amplificados.

Como parte de la comprobación de las amplificaciones por *PCR* se utilizó la técnica de *Nested PCR*, que consiste básicamente en hacer una segunda *PCR* de una *PCR* inicial, es decir, al obtener el fragmento correspondiente a la amplificación 1F/4R de *SPO13*, se realizó una segunda *PCR* con cualesquiera de las restantes combinaciones de *primers*, de acuerdo a la figura 7, esto es posible debido a que la amplificación 1F/4R corresponde al fragmento amplificado más grande, en la que se encuentran incluidas las secuencias de las combinaciones restantes. Las amplificaciones se corrieron en geles de agarosa.

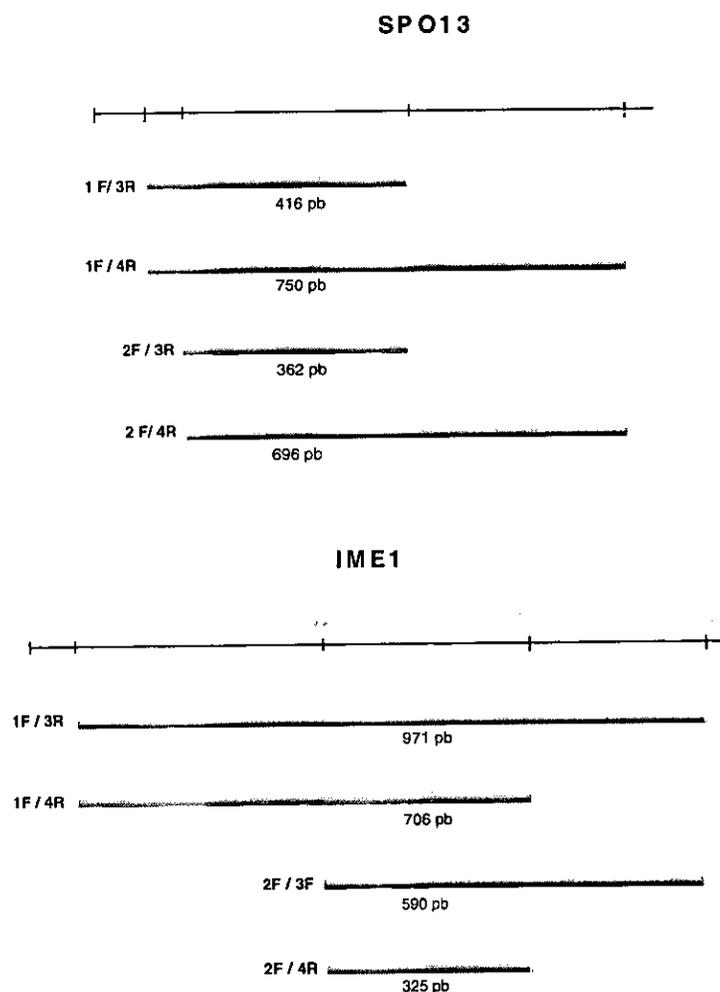


Figura 7. Esquema representativo de los tamaños de las amplificaciones para cada uno de las posibles combinaciones de *primers* en la levadura.

Clonación de SPO13 e IME1

Una vez identificados los fragmentos de DNA amplificados de acuerdo a su peso molecular, son aislados para posteriormente clonarlos según el protocolo del *Technical Bolletin de Promega No. 150 pGem-5Zf(+)* Vector System, utilizando el vector *pGem-5Zf(+)* (Promega Protocols and Applications Guide, 1991) (figura 8), cuyo proceso general es el siguiente:



- ⊙ El DNA vector, debe ser purificado y cortado. El vector *pGem-5Zf(+)* de Promega se adquiere previamente cortado.
- ⊙ El DNA pasajero, debe ser insertado en la molécula vector para crear el recombinante artificial. En consecuencia se deben llevar a cabo reacciones de unión de DNA (ligación).
- ⊙ Las reacciones de corte y ligación, deben ser comprobadas por electroforesis y crecimiento bacteriano, respectivamente.
- ⊙ El recombinante artificial debe ser transformado en células competentes (*Escherichia coli*) (Old y Primrose, 1989).

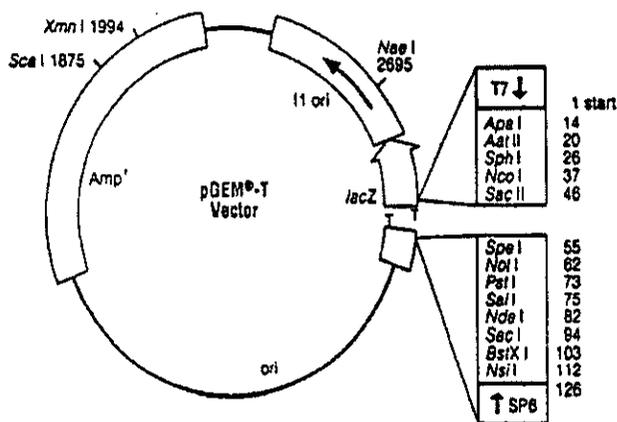


Figura 8. Esquema del vector utilizado para la transformación bacteriana, *pGem-5Zf(+)* (Promega Protocols and Applications Guide, 1991).

La comprobación de la transformación se realizó mediante la PCR utilizando primers específicos del vector *pGem-5Zf(+)*: M13 Reverse y M13 Forward, o por medio de la técnica de Colony Pick, la cual consiste en realizar una PCR con los primers degenerados de cada una de las colonias de bacterias transformadas, con el fin de localizar y aislar aquella que contenga integrado en el vector el inserto adecuado, para finalmente correr las muestras de PCR en electroforesis de agarosa NuSieve al 3%.



Secuenciación y Comparación de Secuencias

Ya obtenidos los clones de los genes *SPO13* e *IME1* tanto de levadura como de maíz, se enviaron a ser secuenciados en *Sequi-Net Division of Macromolecular Resources* de la Universidad Estatal de Colorado, con los *primers* M13 *Forward* y M13 *Reverse*. Para posteriormente realizar la comparación entre secuencias de los aminoácidos de levadura y maíz en los programas MACAW (*Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench*) para *Macintosh* y DNA Strider para *Macintosh*. Finalmente se realizó un *BLAST* (comparación de secuencias contra una base de datos de *GenBank*), comparando las secuencias de los clones obtenidos contra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). NCBI incluye bases de datos tales como: *Yeast Protein Database (Proteome, Inc.)*, *Saccharomyces Genome Database (Stanford Genomic Resources)*, *SwissPROT*, *MIPS (Munich Information Center Protein Sequences)*, *NCBI Entrez nucleotid*, *NCBI Entrez Protein*, entre otras.

Hibridación y Cartografía

La hibridación se divide en dos partes. La primera, consiste en hibridar las amplificaciones de levadura (marcado con digoxigenina-dUTP de *Boehringer Mannheim*, ver apéndice) contra maíz (membrana de nylon *MSI Magnagraph* con poros de 0.45 μm), correspondientes a los fragmentos amplificados con los *primers* de *SPO13* e *IME1*, para verificar si existe un reconocimiento entre las secuencias de ambos fragmentos. Debido a que existen mutantes de maíz con fenotipo similar a la apomeiosis, postulándose que estos pueden ser otólogos a la apomixis.

La segunda consiste en hibridar los fragmentos clonados de maíz (*SPO13* e *IME1*) marcados, contra una población de maíz mutante (retrocruza BC1 de *elongate*). El mutante *elongate* es un gen que han postulado como ortólogo de la apomeiosis en maíz (Grimanelli, 1997; Espinosa, 1998). Espinosa (1998), identificó el locus para este gen en un mapa cartográfico. Al mismo tiempo se analizó la cartografía de los fragmentos aislados (*SPO13* e *IME1*), para verificar si estos genes están lo suficientemente cerca de los marcadores relacionados con el proceso apomítico, elaborando un mapa cartográfico y determinando la posición de cada una de estas amplificaciones de maíz en esta población.



La sonda utilizada para este estudio fue la amplificación marcada de *SPO13* 2F/4R e *IME1* 1F/4R de levadura (Hoisington *et al.*, 1994). El análisis se determinó usando el programa MAPMAKER V.2.0 para *Macintosh*. La membrana se lavó a máxima astringencia para mayor eficiencia en los resultados de hibridación.



Resultados

PARTE I Gen *SPO13*

SPO13 en Levadura

En las amplificaciones de DNA genómico de levadura, utilizando las diferentes combinaciones de *primers* se observó que la amplificación más adecuada fue: 1 *Forward*, 4 *Reverse* (1F/4R) y 2 *Forward*, 4 *Reverse* (2F/4R), con un peso de 750 y 696 pares de bases respectivamente, a una temperatura de alineamiento *primer*-DNA molde de 42°C. A partir de la amplificación 1F/4R se realizó una segunda amplificación con los *primers* 2F/4R (*Nested PCR*), donde se obtuvieron resultados favorables. Cabe mencionar que el gen *SPO13* de levadura no presenta intrones, por lo que, el homólogo en maíz puede ser de igual peso o mayor en caso de presentar intrones.

La clonación del fragmento correspondiente al gen *SPO13* de levadura parte de una primera amplificación a partir de DNA genómico, con los *primers* 2F/4R, en donde son amplificadas un número indefinido de bandas (figura 9A). A partir de entonces comienza la selección de la banda correspondiente a *SPO13*, primero se determina el peso molecular utilizando la escalera del marcador *PhiX174/HaeIII* (Φ). La banda de amplificación que represente el peso molecular aproximado a 696 pb fue elegida y aislada del gel, para una segunda amplificación con los *primers* (2F/4R). La segunda amplificación comprueba la veracidad y la complementariedad entre el DNA y los *primers*; además, descarta aquellas posibles bandas no visibles que pudiesen infiltrarse en el momento del aislamiento de la banda (figura 9B).

Una vez que se aisló la banda o inserto se ligó al plásmido o vector *pGem-5Zf(+)* para su posterior transformación en la bacteria, obteniendo así, una serie de colonias bacterianas con el plásmido y el inserto de interés, multiplicándose el inserto *n* veces. Para verificar que efectivamente el plásmido contiene el inserto adecuado de DNA aislado, se realizó una *PCR* con los *primers* específicos del vector: *M13 Forward* y *Reverse* (figura 9C). Existe la posibilidad de que insertos no relacionados al gen sean ligados al plásmido, por lo que es necesario realizar la técnica del *Colony Pick* con el



fin de elegir la colonia en cuyo plásmido o vector este presente el inserto de nuestro interés.

En la verificación de la transformación bacteriana, se observa que el peso molecular de la banda es ligeramente mayor en comparación con las bandas amplificadas exclusivamente con los *primers* 2F/4R, esto debido a que los *primers* específicos del vector *pGem-5Zf(+)* M13 *Forward* y M13 *Reverse*, exceden la amplificación de nucleótidos en aproximadamente 180 pb correspondientes al vector (figura 9C).

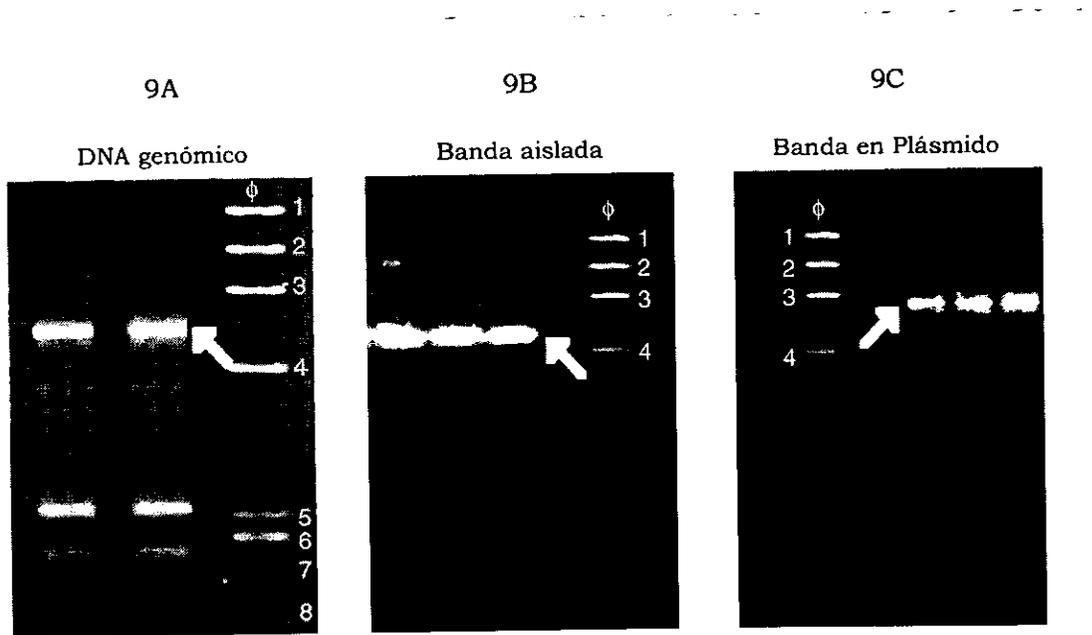


Figura 9. Fotografías de las amplificaciones de levadura en geles de agarosa al 3%: 9A) Amplificaciones de DNA genómica con los *primers* 2F/4R, la flecha indica la banda correspondiente al peso molecular para *SPO13*; 9B) Segunda amplificaciones de la banda aislada del DNA genómico de levadura (2F/4R); 9C) Amplificaciones de las bandas clonadas que denominaremos *Y SPO13* en el plásmido *pGem-5Zf(+)* con los *primers* M13 *Forward* y *Reverse*. (Φ = PhiX174/*Hae*III: 1. 1,353 pb; 2. 1,078 pb; 3. 872 pb; 4. 603 pb; 5. 310 pb; 6. 281 pb; 7. 271 pb; 8. 234 pb).

En la comparación entre las secuencias de nucleótidos de la levadura *Y SPO13* vs el gen *SPO13* de *Saccharomyces cerevisiae* (991 pb, 330 aminoácidos), mediante el programa MACAW, resultó que el clon *Y SPO13* es un 97.1% homólogo en 517 pb comparadas con el gen *SPO13* de *GenBank* (figura 10).



```

CCTTGAAAAACGAAAGACAAACAATAAGCGCCCTCATTGATAATTCTTAAGCTTCGAGGACATTGA
CTTTGAAAAAGGAAAGACAAACCATTTGAGCGCCCTCATTTCATANTCENNTAAGNTTNGAGGACATTGA
GCAGCCTCCAAAATCTACTTCAACGGCGCTCTTTCTCAATCTTCTCAAAATAATCTTCAAAAAGGCG
GCAGCCTCCAAAATCTACTTCAACGGCGCTCTTTCTCAATCTTCTCAAAATAATCTTCAAAAAGGCG
CCCATGTTTCCAGTTCCTTACTATATTGCTCCTTCTCCTATGTATAATTTAGCCCGTATCAAAATTTCC
CCCATGTTTCCAGTTCCTTACTATATTGCTCCTTCTCCTATGTATAATTTAGCCCGTATCAAAATTTCC
TTGGAACCCAAACGTTCTGTACGCCAAGTCATAACCCAAAACCTAAACTATGCCATTCCATCCAAAGGCC
TTGGAACCCAAACGTTCTGTACGCCAAGTCATAACCCAAAACCTAAACTATGCCATTCCATCCAAAGGCC
GGAGTTGCTTTATCCGAATGTTAACGTATACGATTGCCATTGTTTAAAGAAAACAAGACTGCCCCATCAG
GGAGTTGCTTTATCCGAATGTTAACGTATACGATTGCCATTGTTTAAAGAAAACAAGACTGCCCCATCAG
ACCAAAAGTCTAGATAAAGAAACAAAATTACCAATATCTTCCAATATATCCGGTCTCGATTTCTAATAACG
ACCAAAAGTCTAGATAAAGAAACAAAATTACCAATATCTTCCAATATATCCGGTCTCGATTTCTAATAACG
GAGATTTTGTGGCCAAGAGACACCAAGGGCAGCACCABAGTTAAGTAAAAAGAGACTTTCAATACATT
GAGATTTTGTGGCCAAGAGACACCAAGGGCAGCACCABAGTTAAGTAAAAAGAGACTTTCAATACATT
GCATGTTAATTGTTCCGATTATGAGTC
GCATGTTAATTGCACCGACTATGACAC
    
```

Figura 10. Comparación de secuencias entre el gen *SPO13* de *S. cerevisiae* (secuencia superior) y el clon de levadura *Y SPO13 2F/4R* (secuencia inferior). La comparación incluye 517 pares de bases, de las cuales el 97.1% son idénticas.

Por otro lado, el *BLAST* realizado en *GenBank* de NCBI correspondiente a la secuencia del clon *Y SPO13*, demostró que en 153 aminoácidos comparados existe una similitud de 96% con la proteína específica de la meiosis en la levadura *S. cerevisiae*, proteína codificada por el gen *SPO13*.

Todo lo anterior confirmó que la banda aislada de *Y SPO13* amplificada con los *primers* 2F/4R, se trata de una amplificación del gen *SPO13* de *S. cerevisiae*. Y que el manejo y las técnicas utilizadas durante el proceso experimental fueron adecuadas, por lo que se descartan errores de tipo técnico en el laboratorio durante el proceso de clonación.

Hibridación

La hibridación de los amplificadores genómicos de DNA de maíz con los *primers*: 1F/3R, 1F/4R, 2F/3R y 2F/4R y levadura *primers*: 2F/4R, con la sonda marcada de levadura *Y SPO13*, amplificada con los *primers* 2F/4R y marcada con la molécula de



digoxigenina d-UTP por *PCR* se muestra en la figura 11. Se observó que en cada uno de los carriles de hibridación existen diferentes zonas de reconocimiento. Sin embargo, para aquellos DNA amplificados de maíz con los *primers* 2F/4R, se observa una zona bien definida de hibridación, de igual manera sucede con el último carril que corresponde al DNA de levadura amplificado con los *primers* 2F/4R. Lo que quiere decir que la sonda reconoce a las amplificaciones genómicas de maíz, específicamente con los *primers* 2F/4R, tanto en maíz como levadura, lo que nos indica la existencia de una cierta homología entre ambos genomas, o por lo menos, que la mínima homología entre ambos genomas es suficiente para permitir la hibridación. Posiblemente nos encontremos en el umbral del posible gen homólogo *SPO13* en maíz, es por ello que decidimos clonar el amplificado de maíz con los *primers* 2F/4R.

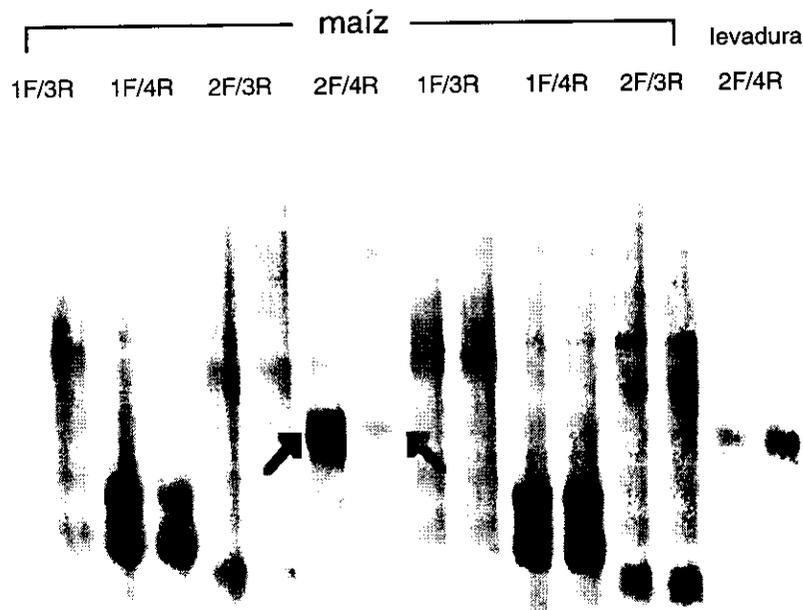


Figura 11. Luminograma de hibridación entre los amplificados de DNA genómico de maíz con diferentes juegos de *primers*, y el clon de levadura con los *primers* 2F/4R, también usado como sonda. La flecha indica la banda de hibridación. Existen otras bandas de hibridación para los diferentes amplificados, pero no son tan claras como en el caso de 2F/4R.



Para los amplificadores con los *primers* diferentes a 2F/4R, se observaron largas zonas de hibridación a lo largo del carril (figura 11), debido muy probablemente a que las diferentes combinaciones de *primers degenerados* que amplifican fragmentos de DNA con diversos pesos moleculares (figura 7), razón por la cual, se observa tal zonas de reconocimiento entre ambas amplificaciones.

SPO13 en Maíz

Una vez que determinamos que el amplificado de maíz con los *primers* 2F/4R, es la banda que reconoce plenamente la sonda marcada, se procedió a clonar y secuenciar dicho amplificado. Los análisis para dicho clon de maíz (*18 SPO13*) no se presentaron de manera tan eficaz y con tanta claridad como sucede con la levadura.

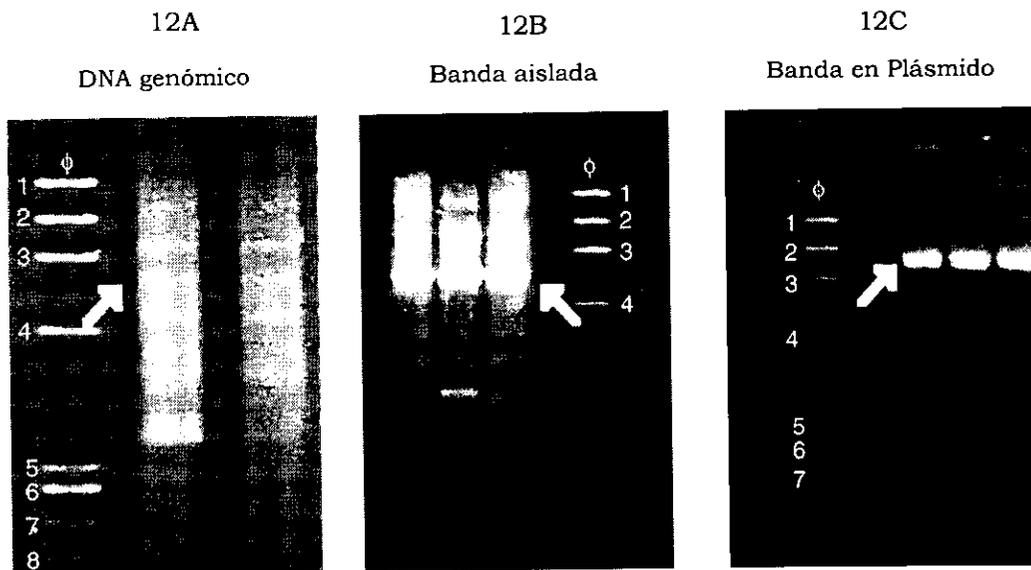


Figura 12. Fotografías de amplificaciones en geles de agarosa al 3%. 12A) Amplificaciones con DNA genómico de maíz con los *primers* 2F/4R; 12B) Segunda amplificación de la banda aislada con los mismos *primers*; 12C) Verificación de ligación de la banda *18 SPO13* (Φ = PhiX174/*Hae*III: 1. 1,353 pb; 2. 1,078 pb; 3. 872 pb; 4. 603 pb; 5. 310 pb; 6. 281 pb; 7. 271 pb; 8. 234 pb).



El DNA genómico de maíz amplificado con los *primers* 2F/4R se muestra en la figura 12A, en la cual se observa un barrido de bandas, en donde resulta difícil determinar la posición de una banda equivalente al tamaño a la de *Y SPO13*. De todas las bandas amplificadas, se aisló aquella con el peso similar al tamaño de las amplificaciones en levadura (figura 9A), suponiendo que el posible gen homólogo *SPO13* en maíz no tiene la presencia de intrones como sucede en levadura. La flecha de la figura 12A indica la posible posición de dicha banda, por lo que el índice de error en el momento de aislar la banda aumenta, e incluso, no solamente podríamos aislar una banda sino varias bandas simultáneamente.

Una vez aislada la posible banda se realizó una segunda amplificación con los *primers* 2F/4R, con el objetivo de amplificar con más especificidad dicho inserto. En la figura 12B se observa claramente la diferencia entre las amplificaciones con respecto a la figura 12A, la flecha indica la banda amplificada que corresponde posiblemente al fragmento homólogo de *SPO13* en maíz. Esta banda se ligó al plásmido *pGem-5Zf(+)*, que consecuentemente con la reproducción de la bacteria se obtuvo la multiplicación del plásmido y a su vez del inserto. Es posible que existiera contaminación con otras amplificaciones de DNA al momento de aislar la banda del gel de electroforesis, para realizar la ligación, transformación y reproducción, *Colony Pick* es la técnica ideal para comprobar el tamaño del inserto adecuado (figura 12C), al cual denominamos *18 SPO13*.

La comparación de secuencias nucleotídicas entre el clon de maíz *18 SPO13* y el gen *SPO13* de *S. cerevisiae* mediante en el programa MACAW, demostró un porcentaje de 31.4% de similitud con 560 pb involucradas (figura 13). Esto indicó que no estamos ante una homología del gen *SPO13* entre ambas especies, por lo tanto, la banda amplificada de maíz *18 SPO13* es muy probable que no se trate del gen *SPO13* en maíz.

La comparación del clon de maíz *18 SPO13* realizada en *BLAST* de NCBI a nivel de nucleótidos y aminoácidos, en donde no se observó homologías con secuencias del *GenBank* de NCBI, existen algunas similitudes pero, son comparaciones en las se incluyen pocas decenas de pares de bases ya sea correspondientes a fragmentos de secuencias de organismos completamente diferentes a maíz o levadura, o a secuencias que codifican para proteínas no relacionadas con la meiosis. El *BLAST* correspondiente a la comparación de aminoácidos demostró que no existen homologías entre el clon y la base de datos de NCBI.



```

CCAGTTTCTCCACTTCCTTTTAAATTGCTAAAGAAATCAAGAAATAAGGAATCAGAAAAACAAAAA
TGCTCTGTTCAACATGTGAGGCATGAACATGAGTTTCCBTTTTTTTTCCATTTCGTGAAATTTGTAT
CAGAAATCAGAAATATATTCAATTCGAACATGTCGATTTTGGACTAGBAACCCCECATCCGGATTAAA
CATTGTTTAAAGAAATTCATGTGCATCNTATTTTTTTTACAAATTAGAGTGTGAAATCTTTTTNTTT
TTTTGTAAGTATGCTCAACCGTACTCBAAGGCTGGAGTGTTCGATATTTAAAAATTAATCAGCAAT
TTTTANNGGTGECGACAAANAAATGACTCAGGGTACTCCEGANAAC TAGTAGTTTCLACCAANAAATTAGCC
TCCTTGAAAAACEAAAGACAAACAATAGACCGCCCTCATTGATATTCCTTAAGGTTCGAGCATTG
AGCTAATAGTTAGCTGCTCTTTCCAGTGGATAACAATTTATTAECTCTCAACTAACAATTAGTCAACT
AGCAGCCTGCABAATCTACTTCAACCGCGTTCTTTCTCAATCTCTCABAATAATGTAGAAACGAGAGC
TGACGTTTCATATTAECTCNCAACTAANACTAGACAGCTAAETAANTAGCTAGCTATTCCATTGGANAAC
ACCCATGTTTCCAGTTCCCTTACTATATTGCTTCCTTCCCTGTGTAAATTTTGGCCGTTATCAAATTTT
BATONATTAACCGATTAAATTAGTAAGTTCTAAAGGTTTAAACGGCTCTAACAGATATTTTCTATAC
GTTGGAAACCCAACTTCCTGACGCCBAGTCTTACCCAAACCTAACTATCCCTTCCCATCCAACGGC
CANGTAAANNTGAGTLAGCANGCANANGGAENETGTTCCGTTATAAGGTCATATNNGTTANGTAAA
CGGAGTGTCTTTATCCGAATGTTTACGTATACGTTTCGCCATTGTTTAAAGAAACBAGACTGCCCTCA
TTTTAATCCCTGAAATCNTATCAGATTAGATAGATGCCCTTGTCTNCCCGNTGANAACCTAANAATC
    
```

Figura 13. Comparación de secuencias entre el gen *SPO13* de *GenBank* de *S. cerevisiae* (secuencia superior) y el clon de maíz 18 *SPO13* 2F/4R (secuencia inferior). De 560 pares de bases involucradas, sólo el 31.4% son homólogas.

Evidentemente la secuencia del clon 18 *SPO13* no coincide con la secuencia del gen *SPO13* del *GenBank*, pero la hibridación entre los amplificadores de maíz y la sonda *Y SPO13* en condiciones de máxima astringencia (figura 11), nos demuestra que existe un pleno reconocimiento entre alguna de las secuencias amplificadas y la sonda de levadura, esto indica que posiblemente estemos cerca de obtener la secuencia del gen homólogo de *SPO13* en maíz, ya que la elección de la banda a clonar en maíz fue errónea, y así lo demuestra la hibridación, existe algún amplificado que reconoce plenamente a la sonda de levadura marcada.

Cartografía

La cartografía del clon de maíz 18 *SPO13* se observa en la figura 14. Se encontró que dicho clon de maíz se ubica en el mismo grupo de ligamiento que *elongate (el1)*; gen probablemente ortólogo al gen que controla la apomeiosis en el proceso apomítico según Grimanelli, 1997 y Espinosa, 1998. Esto demostró que el clon 18 *SPO13* se encuentra en el cromosoma 8 de maíz.

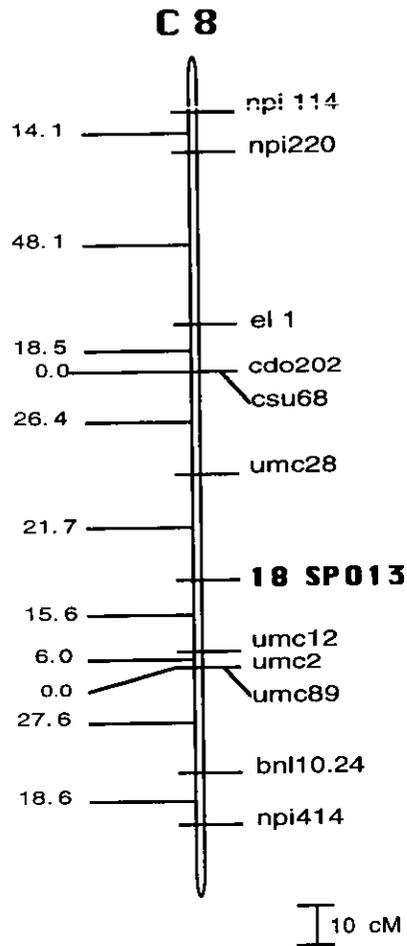


Figura 14. Cartografía del inserto 18 *SPO13* 2F/4R en el cromosoma 8 de maíz.

PARTE II Gen *IME1*

IME1 en Levadura

Para el caso del gen *IME1* en la levadura, los *primers* que mostraron una amplificación eficiente fueron: 1 *Forward* (1F) y 3 *Reverse* (3R), a una temperatura de alineamiento *primer*-DNA molde de 42°C. De igual manera como sucedió con las amplificaciones de *SPO13*, los amplificados genómicos de *IME1* se obtuvieron fácilmente con DNA genómico de levadura (figura 15A). En la figura 15A se observa la



banda con uno de los pesos moleculares similar al que debería de presentar el gen *IME1* (figura 7), específicamente con los *primers* 1F/3R (971 pb). Una vez que se ha localizado la banda con el peso molecular adecuado, se aisló y se amplificó nuevamente con los *primers* previamente usados en la primera amplificación (figura 15B).

Sin embargo, después de la segunda amplificación aún se observa un barrido o conjunto de bandas, lo cual significa la existencia de contaminación de amplificandos de DNA cercanos, y que al momento de realizar la ligación en el vector estas también podrían estar presentes, por lo que, con la técnica de *Colony Pick* se eligieron las colonias que contengan una sola banda con el peso molecular adecuado al momento de la amplificación (figura 15C), y esto se verificó por medio de la *PCR* y *primers* específicos del vector.

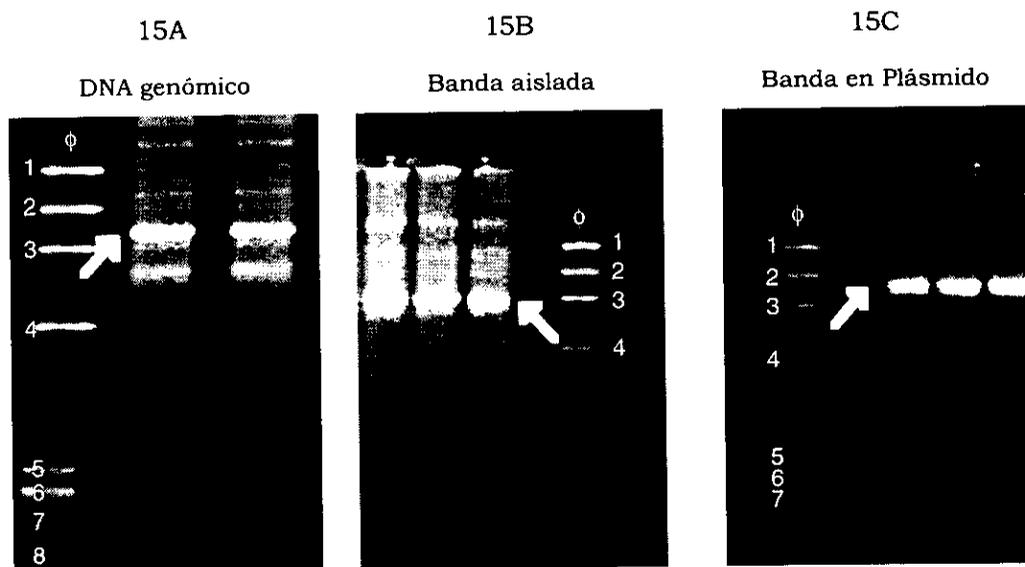


Figura 15. Fotografías de amplificaciones de *PCR* en geles de agarosa al 3%. 15A) Amplificaciones correspondientes al DNA genómico de levadura con los *primers* 1F/3R; 15B) Segunda amplificación de la banda *IME1*; 15C) Amplificados de los plásmidos con el inserto ligado, clon *Y IME1* (Φ = PhiX174/*Hae*III: 1. 1,353 pb; 2. 1,078 pb; 3. 872 pb; 4. 603 pb; 5. 310 pb; 6. 281 pb; 7. 271 pb; 8. 234 pb).



La verificación de la transformación bacteriana se observa en la figura 15C, en donde la flecha indica la banda que confirmó la ligación del inserto al plásmido *pGem-5Zf(+)*.

La comparación entre las secuencias de nucleótidos del clon *Y IME1* vs gen *IME1* de *S. cerevisiae* de *GenBank* (1080 pb, 360 aminoácidos) de acuerdo al programa MACAW, demostró que el clon es 98.5% homólogo en 686 pb comparadas (figura 16), por lo que la banda seleccionada se consideró como una amplificación del gen *IME1* de *S. cerevisiae*.

```

TCC TTTT GAA CAG CAACA CAACCTAACATTTATTATGACACAAC CACCGATCAAGAAGACCGTCCCTTGT
TCCGATTGAC CAGCAACAG CAACCTAACATTTATTATGACACAAC TCCGATCAAGAAGACCGTCCCTTGT

TTTTCTTTTGGATCTACAATTTCCCTAGAACTTGGCATTTTGAAAAGTCTGACAAAATTGCCTCATCTC
TTTTCTTTTGGATCTACAATTTCCCTAGAACTTGGCATTTTGAAAAGTCTGACAAAATTGCCTCATCTC

AGCTGCAGAACTTGGTTCATACACAAACCAATTCATTTAATTAATCCTCAAATATTGTTCAATGAAGAGTT
AGCTGCAGAACTTGGTTCATACACAAACCAATTCATTTAATTAATCCTCAAATATTGTTCAATGAAGAGTT

TCTGAATTTGGAAAATATTGATTCTCAGCCTATTTCCAAGGAAACGAAAAC TACGAAGGACTGCACAATG
TCTGAATTTGGAAAATATTGATTCTCAGCCTATTTCCAAGGAAACGAAAAC TACGAAGGACTGCACAATG

GCAACTGGTCTGAAAGAGGAAAAAGAGCTCTGAAAGTACCAGATCCTCTTCATTATCATCTCTTTTTTT
GCAACTGGTCTGAAAGAGGAAAAAGAGCTCTGAAAGTACCAGATCCTCTTCATTATCATCTCTTTTTTT

CTAATGATGAATCCGCATCTACGTTCCACTCATCATTCATAAACCATGATAACTTTCAAAGAGCAACAG
CTAATGATGAATCCGCATCTACGTTCCACTCATCATTCATAAACCATGATAACTTTCAAAGAGCAACAA

AAATGGAGATGATATCGATATTAGTGACACAATAAAATATCAAACCTAATACAAATGCACAAAAAGATATC
AAATGGAGATGATATCGATATTAGTGACACAATAAAATATCAAACCTAATACAAATGCACAAAAAGATATC

AAAAATATCCAAAGAAAATTTTGAATTC AATGAATTTCCATACACACAAGACTTCTACCCATATACCACTA
AAAAATATCCAAAGAAAATTTTGAATTT AATGAATTTCCATACACACAAGACTTCTACCCATATACCACTA

ATTATACCTATTCAAACCCACAAATATTCATGATCAATAAATTCAAAAACACCGATTTCATCTCCCA
ATTATACCTATTCAAACCCACAAATATTCATGATCAATAAATTCAAAAACACCGATTTCATCTCCCA

ATATCAAGATCAGTTTCCACCACATACTGATAACATACATTCCCTTTAATAATCGTC
ATATCAAGATCAGTTTCCACCACATACTGATAACATACATTCCCTTTAATAATCGTC
    
```

Figura 16. Comparación de secuencias entre el gen *IME1* de *GenBank* de *S. cerevisiae* (secuencia superior) y el clon aislado de levadura *Y IME1* 1F/3R (secuencia inferior). La comparación incluye 686 pares de bases, de las cuales, el 98.5% son idénticas.

El *BLAST* correspondiente a la comparación de aminoácidos de *Y IME1* demostró que en 207 aminoácidos, tiene una homología del 99% con la proteína inductora de la meiosis en *S. cerevisiae*. Esto vino a confirmar totalmente la clonación del gen *IME1* de *S. cerevisiae*, tal como sucedió con el gen *SPO13*.



Hibridación

Ya obtenido el clon de levadura del gen *IME1*, se marcó con digoxigenina d-UTP por *PCR* para utilizarla como sonda.

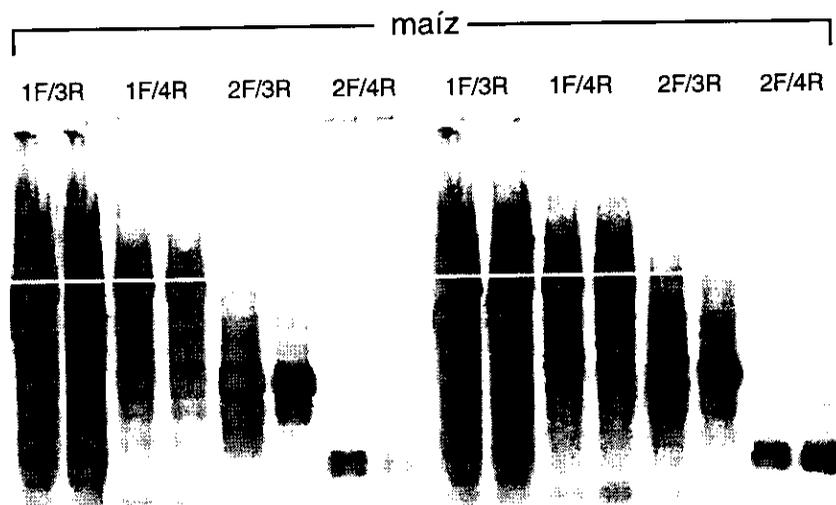


Figura 17. Luminograma de hibridación. La línea horizontal representa la zona de hibridación para la sonda *Y IME1* 1F/3R.

La prueba de hibridación de los amplificadores genómicos de maíz obtenida con los *primers*: 1F/3R, 1F/4R, 2F/3R y 2F/4R, contra la sonda marcada de levadura *Y IME1* *primers* 1F/3R presentó los resultados de la figura 17. En tal figura se puede identificar varias zonas de hibridación a lo largo de 16 carriles de amplificadores de maíz; los correspondientes a los *primers* 1F/3R y 1F/4R se observa un barrido el cual no define una zona de hibridación, específicamente en los amplificadores de maíz 1F/3R esperábamos encontrar una banda de hibridación, localizada aproximadamente en la línea punteada de la figura 17. Sin embargo, las amplificaciones con los *primers*: 2F/3R y 2F/4R si muestran una zona de hibridación definida, especialmente para



2F/4R, lo que nos indica evidentemente que existe una amplificación de maíz con los *primers* 2F/4R que reconoce la sonda, lo cual define una banda de hibridación y que posiblemente se trate de la secuencia homóloga del gen *IME1* en maíz.

En los carriles correspondientes a *H1 IME1* 1F/3R, la hibridación indica que existe un reconocimiento de la sonda con varios fragmentos de la amplificación, y no a una banda definida de hibridación, a pesar de los lavados de máxima astringencia (figura 17). Por tal motivo decidimos clonar la banda de maíz amplificada con los *primers* 1F/3R que tuviese el peso aproximado al encontrado en levadura, con el objetivo de continuar el patrón utilizado para el gen *SPO13*.

IME1 en Maíz

Para el caso del maíz, una vez más las amplificaciones no se presentaron de forma tan clara como en la levadura. En la figura 18A, se observa un barrido de bandas correspondientes a las amplificaciones del DNA genómico de maíz con los *primers* 1F/3R, la flecha indica la posible posición de la banda dentro del barrido. El buscarla en esta posición se basó en su peso molecular en relación con la banda obtenida en levadura con *primers* 1F/3R (figura 7).

Una vez aislada la banda se amplificó por segunda vez, la amplificación se muestra en la figura 18B, en donde se observa con un poco de más claridad la banda de interés, y sin embargo, se siguió observando un barrido de bandas amplificadas. Esto mismo sucedió en el caso de *SPO13* al amplificar con DNA de maíz genómico.

Todo parece indicar que las amplificaciones con maíz utilizando *primers* basados en secuencias de genes de levadura, reconocen varias zonas del genoma de la gramínea. Esto está de acuerdo a lo esperado, ya que son *primers degenerados* que pueden reconocer alguna zona del genoma de maíz no necesariamente al gen homólogo *IME1*.

La verificación de la ligación del fragmento al vector se observa en la figura 18C, en donde la flecha indica la banda que confirma dicha ligación al vector *pGem-5Zf(+)*.

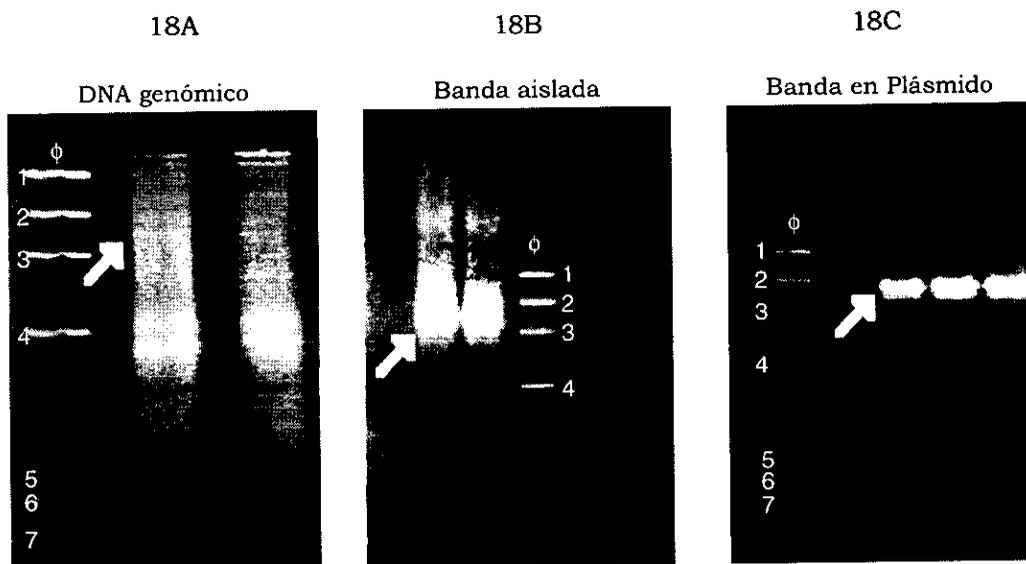


Figura 18. Fotografías de amplificaciones en geles de agarosa al 3%. 18A) Amplificaciones con DNA genómico de maíz con los *primers* 1F/3R; 18B) Segunda amplificación de la banda aislada con los mismos *primers*; 18C) Verificación de ligación de la banda *HI IME1* (Φ = PhiX174/*Hae*III: 1. 1,353 pb; 2. 1,078 pb; 3. 872 pb; 4. 603 pb; 5. 310 pb; 6. 281 pb; 7. 271 pb; 8. 234 pb).

Al hacer la comparación de la secuencia del clon aislado de maíz *HI IME1*, se observó que únicamente existe el 31.9% de homología con 700 pb involucradas (figura 19), en relación al gen *IME1* de *S. cerevisiae* de acuerdo al programa MACAW.

El *BLAST* de nucleótidos confirmó también que el clon *HI IME1* no presentó homologías significativas, ya que no existen secuencias similares que codifique para proteínas relacionadas con la meiosis, con el maíz u organismos afines.



```

AGCTCCAGTACTTCGTTTCATACACAACCAATTCAATTEATTAAATCCTCBAATATTGTTCCATGAAGAGTT
TGGAGCCCGCGCGTGGCGGGCGCTCTAGCCCCATTGCTCTCGAAACCAATTAATTTGAGAAATCCTCTCGTG
TCTGAATTTCCGAAATATTTGATTTCTCAGCCTAATTTCCAAAGAAACGAAACTCCGALGGCTCCACAAATG
AGAAACTCAGGATTAATATTTTGTCTTTCTTCCAACTCTCTCTTTTGCCTGATTAATTAACCACTTTT.
GCAACTGGTCTCGAAAGAGGAAABAAAGACTCTGAAAGTCCAGATCCTCTTCATTATCTCTCTTTTTT
AGCTGTCCCTCGTCTCCAACAACCAATGCTCTGCTCTCCAGTTTCAATTAGAGTCCTAAAGTCAGCAGTT
CTEATGATGAATCCGATCTACGTTCCACTCATCATTCOAATAACCAATGATTAATTTTAAAGGCAACAG
TCAATGAAAGCATTACTCAACATCTTTTTATCATTTTCTGCTGTCTGATCCCAAAAGGTTTACACTTTG
AAATGGAGATGATATCCATATTAGTGACACAATAAATATCAAACTEATACAAATGCACAAAGATATC
AAGTAATATTCBAATTCATATTCAACCTTTTGTGTTGTTGCTTTCTTTATTTCTTTATTTCTCTGCTGA
AAATATTTCCAAGAAAATTTTGAATTCBAATGATTTCCCATACACACAAGACTTCTCCCATATACCACTE
ACGAGCAATATTCATTCGTTTTTGTATATGTGAGGCACTTACCCTGTTGCCACATATTTAATACTGCG
ATTATACCTATTCAAAACCCACAAATATTCATGATCAATAAATTCAAAAACACGGAATTCATACCTCCA
TCTCTATCTATTTTCTTTTTTCTCCAAAACAACTCCTTTTGCCATTGCCCTTTGCCGACTTCATTTGG
ATATCAAGTCCGTTTCACCACATACTGATAACATACATTCTTTTAAATTCGTCACCTEATAGCAACCAT
TACGCTCTAGTATTTCTCTGTCGTTCTGCCTGGGCACTGCAGATAGAAATAGTGACAAACATTTTACCCAT
AAAAGCACTAATTTGTAATTAATATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
CTCCCCATCGCTACTGATTCGCTCTCAATAAACCGAATGGGTACACCTTGGGCGTCAAACTCTTTTAT
CGATCCATTTATAGATGACCTCAGCTGCCTCTTACTTTTACCATTAGAATTCCTTCGACGTTGA
TAACTGGATCATGTCCAGCTATCGCCCAANGCGGTCAAGTTTCTCCCAANANGTCACTTCTCT

```

Figura 19. Comparación de secuencias entre el gen *IME1* de *GenBank* de *S. cerevisiae* (secuencia superior) y el clon de maíz *H1 IME1 1F/3R* (secuencia inferior). De 700 pares de bases involucradas, sólo el 31.9% son homólogas.

Cartografía

El análisis cartográfico realizado sobre la población BCI del mutante de maíz *elongate* para el clon *H1 IME1*, muestra que el fragmento clonado no presenta ningún tipo de polimorfismo, por lo tanto, el análisis de segregación no se pudo llevar a cabo y por ende tampoco su cartografía.



*D*iscusión

PARTE I Gen *SPO13*

Los resultados confirman que el fragmento de DNA amplificado que suponíamos se trataba de *SPO13*, en maíz no se trata de tal, sino más bien, de una de las tantas bandas amplificadas a partir del DNA genómico de maíz. Caso contrario sucede con la levadura.

De acuerdo a la teoría neutralista de Kimura, si ambos clones fueran amplificaciones de genes ortólogos, entonces los cambios en la secuencias de nucleótidos serían neutras, por lo que no se verían afectadas la secuencia de aminoácidos; pero, si hubiese alguna sustitución de algún aminoácido, tendría que ser en el sitio de la secuencia que no tuviese una participación directa e importante en el dominio de la proteína, por lo tanto, su tasa de evolución sería mínima, así como su diferencia entre secuencias. Para Dickerson (1972), las secuencias de algunas proteínas en los organismos se verán menos afectadas en cambios o sustituciones de aminoácidos, debido esencialmente a la función que desempeña.

En ambos casos se plantea que la homología entre genes es importante para determinar su ortología, lo que no coincide con nuestro caso en la comparación de los clones *Y SPO13* y *18 SPO13*, en donde ambas secuencias son muy diferentes una con respecto a la otra (figuras 10 y 13), lo que quiere decir, que probablemente no se trate del gen *SPO13*.

En el caso de la levadura, el clon *Y SPO13* es la amplificación de un fragmento del gen *SPO13* de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a la gran homología que presentan tanto por su secuencia de nucleótidos (figura 10) como de aminoácidos, lo que demuestra que las técnicas empleadas fueron realizadas de manera adecuada. Sin embargo, el clon de maíz *18 SPO13* no muestra ninguna homología con respecto al gen *SPO13*, ya sea a nivel de nucleótidos y/o aminoácidos. Pero debemos probar otros clones porque la hibridación demostró un reconocimiento entre secuencias amplificadas de levadura y algunas bandas de maíz.

Por otro lado, la prueba de hibridación (figura 11) demuestra que existe un cierto reconocimiento entre ambas cadenas nucleotídicas, de tal manera que son



capaces de reconocerse e hibridarse. De la misma manera, las amplificaciones con los *primers* 2F/4R (figuras 9 y 12) muestran que ambos amplificadores presentan aproximadamente el mismo peso molecular, sin embargo, esto no nos indica nada, ya que no estamos seguros de haber aislado y clonado la banda adecuada, es decir, pudimos haber clonado una o más bandas de peso molecular similar al deseado, por lo que pudimos haber tenido un error de elección de la secuencia adecuada. Sin embargo, a pesar de que los resultados para el presente estudio no resultaron lo que se esperaba, se observa que existen zonas en las amplificaciones de maíz, de las cuales, hibridan con el clon de levadura. Esto nos puede indicar la existencia de posibles genes ortólogos entre ambas especies.

El reconocimiento por parte de los *primers* 2F/4R en ambos genomas y las secuencias de nucleótidos no homóloga, da pauta para aislar, clonar y secuenciar cada una de las bandas que amplifican con dichos *primers*, con diferentes pesos moleculares al esperado, ya que no sabemos si existe el gen *SPO13* en el genoma de maíz, si ese fuese el caso, no sabemos si está excluido de intrones como en el caso de la levadura, por lo que su peso molecular tendría variaciones, con esto podríamos encontrar aquella secuencia de nucleótidos con mayor homología al gen *SPO13*, y así determinar su existencia y homología en maíz.

Posiblemente en *Zea mays* si existe el gen *SPO13*, y fue amplificado bajo nuestras condiciones, pero elegimos de manera equivocada la colonia que contenía en su plásmido el inserto de nuestro interés. En la figura 12A no se observa una banda bien definida, y es posible que la banda que deseamos encontrar se localice muy cerca de esta, de tal manera que podrían confundirse, indicando que probablemente clonamos secuencias con pesos moleculares similares. El luminograma de hibridación apoya tal suposición. No debemos olvidar que las amplificaciones de maíz para la hibridación son de DNA genómico, como se observa en la figura 12A, en donde la sonda de levadura puede reconocer cualquier otra amplificación de maíz, no necesariamente la que clonamos nosotros.

No podemos afirmar que hemos encontrado el gen homólogo de *SPO13* en maíz, puesto que los resultados son contradictorios: por la secuencia de nucleótidos que no muestra homología con el gen *SPO13*, porque las hibridaciones y el peso molecular de los amplificadores son similares, es posible que hayamos clonado alguna otra secuencia que reconoce igualmente a la sonda.



Es necesario continuar con los experimentos para determinar de manera más eficaz, si estamos hablando de genes ortólogos entre maíz y levadura, y por ende su relación con la apomeiosis.

En primera instancia debemos clonar las bandas cercanas a la banda que elegimos porque puede tratarse de *SPO13*; por lo que tendríamos que aislar, clonar y secuenciar cada una de estas, con la finalidad de determinar si existe alguna amplificación de DNA genómico de maíz homóloga al gen *SPO13* de levadura.

Los resultados del presente trabajo permiten demostrar la existencia de cierta homología u ortología de estos genes entre dos organismos distantes, por lo que es probable que podamos demostrar que los genomas presentan secuencias en común. Por lo que se necesita más trabajo de investigación en laboratorio, como realizar más pruebas que confirmen que verdaderamente estamos hablando o no del gen *SPO13* en maíz. *Reverse Genetics*, nos indicaría de manera más cercana, si estamos hablando de un gen que esta involucrado en la inducción a la meiosis, y por lo tanto, inducir la apomeiosis en el maíz, ya que a partir del genoma modificado obtendríamos un fenotipo que contribuiría con el trabajo de investigación.

Sin embargo, la cartografía nos indica que nuestra secuencia del clon *18 SPO13*, se localiza en el cromosoma 8 de *Zea mays* cerca de *elongate*, que se piensa que participa en la apomeiosis de maíz, esto refuerza lo mencionado anteriormente, el hecho que el clon *18 SPO13* se localice dentro de un grupo de ligamiento (cromosoma 8), y cercano relativamente al gen del mutante *elongate*, no indica que necesariamente tenga alguna función como gen ortólogo de la apomeiosis.

PARTE II Gen *IME1*

Los resultados con el gen *IME1* fueron semejantes a los obtenidos en *SPO13*. La amplificación con los *primers* permitieron obtener amplificados con el peso molecular aproximado al esperado, suponiendo que el gen *IME1* existiera en maíz y no presentara intrones como en la levadura. Pero en este caso existen tres condiciones que no permiten afirmar de la clonación del gen *IME1* en maíz:

Primera, la secuenciación de nucleótidos (figura 16) demostró que el clon de levadura se obtuvo de manera eficiente, sin embargo, la secuencia de maíz no resultó significativamente similar (figura 19). Esto indicaría que no estamos ante la



amplificación del gen homólogo de *IME1* en maíz, sino que estamos frente a una secuencia no determinada del genoma de maíz. Es importante tomar en cuenta que es muy diferente el genoma de levadura al genoma de maíz, esto implica que muy cerca de la banda que aislamos, puede existir la banda correcta y esto debido a que son productos de PCR por *primers degenerados*.

Segunda, al hibridar el clon *Y IME1* marcado con varios amplificadores de *H1 IME1* se observa que no existe una zona de hibridación adecuada, es decir, prácticamente reconoce varias zonas del genoma de maíz, formando un barrido (figura 19). Esto indica que no existe un reconocimiento específico entre ambos DNA, por lo que, la amplificación de maíz con los *primers* de *IME1* no es específica, ya que estos reconocen una inmensa variedad de zonas del DNA genómico de maíz por encima de lo esperado.

Y la tercera condición se refiere a la cartografía, en donde no se encontró un adecuado polimorfismo, y por ende, no es posible cartografiar el fragmento amplificado para *IME1* en maíz.

Consideramos que no hemos obtenido un clon del gen *IME1* en maíz. Los resultados de este trabajo no significan que no exista un gen ortólogo a *IME1*, simplemente pudimos haber elegido una banda de similares pesos moleculares, pero con diferencia en su secuencia nucleotídica, la hibridación demuestra que tenemos afinidad entre bandas, por lo que, posiblemente alguna de estas bandas sea verdaderamente el gen homólogo *IME1* en maíz, específicamente los amplificadores de maíz con los *primers* 2F/4R, que hibridan con la sonda de levadura formando una banda bien definida de hibridación.

En levadura clonamos un fragmento del gen *SPO13* y del gen *IME1*, caso contrario para el maíz, en donde la banda que aislamos, amplificamos y clonamos debe corresponder a una secuencia cualquiera del extenso genoma de maíz.

En términos generales, la amplificación de genes en maíz en base a genes de levadura es posible, Nugroho y colaboradores han obtenido resultados de manera fehaciente con arroz. En nuestro caso, posiblemente tuvimos éxito el amplificar dichos "genes" en maíz, pero necesitaríamos clonar y secuenciar cada una de las bandas obtenidas en la amplificación genómica de ambos genes, para determinar si alguna de estas bandas se correlaciona con los genes ya conocidos en levadura. Por otra parte, los genes *IME1* y *SPO13* de *Saccharomyces cerevisiae* no presenta intrones,



únicamente exones, pero no sabemos si en maíz se presente de la misma manera, por lo que aumentaría el número de nucleótidos y su peso molecular, y el trabajo aquí realizado sería sólo el comienzo de una extensa investigación sobre genes controladores de la meiosis en *Zea mays*.

Para ambos casos, no hemos determinado que algunos de estos genes tempranos de la meiosis en levadura, tengan homólogos que participen en la apomeiosis de maíz. Más aún, tal vez estos genes de levadura fueron sustituidos a través del tiempo evolutivo en las gramíneas por la función de algún otro gen. Pero, las hibridaciones para ambos genes demuestran que existe una clara afinidad entre secuencias de ambos organismos, y que tal vez la banda que define esta hibridación sean los genes que tratamos de localizar en el presente trabajo.



Conclusiones

Obtuvimos la clonación de un fragmento del gen *SPO13* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con los *primers degenerados* 2F/4R, mientras que para la amplificación con los mismos *primers* para el maíz se obtuvo el clon 18 *SPO13*, el cual no presenta ninguna homología a nivel de nucleótidos y aminoácidos con la secuencia del gen *SPO13* de *S. cerevisiae*.

En el caso del gen *IME1*, el clon de levadura *Y IME1* obtenido con los *primers degenerados* 1F/3R, resultó ser una amplificación correcta de dicho gen. Sin embargo, la clonación del fragmento *H1 IME1* correspondiente a maíz, demostró que no presenta ninguna homología con respecto al gen *IME1* de *S. cerevisiae*.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de levadura comparadas contra la base de datos de *GenBank* de NCBI, demostró que los clones obtenidos de ambos genes, presentan altos porcentajes de homología con respecto a las secuencias de los genes correspondientes. Caso contrario sucede para los clones obtenidos en maíz.

La cartografía del clon 18 *SPO13*, demostró que se ubica en el cromosoma número 8 del maíz, cromosoma en el cual se localiza el gen *elongate*, gen que se piensa es ortólogo del gen que controla la apomeiosis, pero esto no es significativo para nosotros, la distancia entre ambos genes no determina alguna relación en la ortología, ya que se encuentran muy distantes. Mientras que el clon *H1 IME1* no presentó ningún tipo de polimorfismos, por lo que no se encontró grupo de ligamiento y, por lo tanto, no se puede cartografiar el clon.

Los clones de maíz obtenidos en el presente estudio, no presentan una homología adecuada para ser considerados como genes homólogos a los genes *checkpoint*, involucrados en la regulación de la meiosis de *S. cerevisiae*. La secuencia de dichos clones corresponden ciertamente al extenso genoma del maíz, son secuencias que aparentemente no están relacionadas como genes involucrados en la regulación de la meiosis, o al menos, no coinciden con secuencias de genes que se encuentre involucrados en tal proceso biológico en otras especies. Sin embargo, tampoco descarta dicha hipótesis. Existen zonas en el genoma de maíz que hibridan con los clones de levadura. Esto nos indica la existencia de posibles genes ortólogos



entre ambas especies. Por lo que es necesario realizar la clonación de los diferentes clones de hibridación específica.

No podemos determinar aún que exista ortología de los clones *18 SPO13* y *H1 IME1*, con los genes que posiblemente controlen la apomixis en maíz, en específico la apomeiosis, debido a su posición cartográfica y la nula homología de secuencias entre *S. cerevisiae* y *Zea mays*.

Existe definitivamente la posibilidad que las bandas de hibridación tanto para *SPO13* como *IME1*, sean probablemente aquellas secuencias que tratamos de identificar y clonar en maíz, pero, por las limitantes del trabajo no se pudieron determinar tales secuencias, siendo indudablemente temas de trabajo para darle la respectiva continuidad a la presente investigación.



Literatura Consultada

- Ahn, S. N., and S. D. Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **90**: 7980-7984
- Alberts, B. *et al.* 1983. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, U.S.A.
- Asker, S., and Jerling, L. 1992. *Apomixis in plants*. CRC Press, U.S.A.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1994. *Saccharomyces cerevisiae*. In: Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- Buckingham, L.E., Wang, H.T., Elder, R.T., McCarroll, R.M., Slater, M.R., and Esposito, R.E. 1990. Nucleotide sequence and promoter analysis of *SPO13*, a meiosis-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **87**:9406-9410.
- Capy, P., Bazin, C., Higuete, D., and Langin, T. 1998. De donde vienen los genes vagabundos. *Mundo Científico* **190**:48-51.
- Chouard, T., and Yaniv, M. 1994. El Control de la expresión de los genes. *Mundo Científico* **14**:708-717.
- Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D. 1986. *Molecular cell biology*. Scientific American Books, U.S.A.
- Dickerson, R.E. 1972. The structure and history of an ancient protein. *Scientific American* **226**:58-70.
- Do Valle, C.B., and Savidan, Y. 1996. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Bracchiaria*. In: *Bracchiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT-EMBRAPA, Colombia.
- Espinosa, H.E. 1998. *Cartografía de la apomixis en el género Tripsacum (GRAMINEAE)*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México.
- Esposito, M.S., and Esposito, R.E. 1974. Genes controlling meiosis and spore formation in yeast. *Genetics* **78**:215-225.
- Foiani, M., Nadjarboger, E., Capone, R., Sagee, S., Hashimshoni, T., and Kassir, T. 1996. A meiosis-specific protein kinase, *IME2*, is required for the correct timing of DNA replication and for spore formation in yeast meiosis. *Molecular and General Genetics* **253**:278-288.
- Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., *et al.* 1996. Life with 6,000 genes. *Science* **274**:546-567.



- Goffeau, A., et al. 1997. The yeast genome directory. *Nature* **387** (suppl 1):1-105.
- Grebenok, R.J., D.W., and Dellapenna, D. 1997. Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase one of two types of sterol methyltransferase in higher plants. *Plant Molecular Biology* **34**:891-896.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, M.W. 1996. *Genetic analysis*. W.H. Freeman and Company, U.S.A.
- Grimanelli, D. 1997. *L'apomixie dans le genre Tripsacum: contrôle génétique et contraintes biologiques associées à son transfert chez les plantae cultivées*. Thèse de doctorat. INAPG. France.
- Gustafsson, A. 1946. Apomixis in higher plants. *Lunds Univ. Arsskr. N. F. II* **42**:1-67
- Hanna, W.W. 1995. Use of apomixis in cultivar development. *Advances in Agronomy* **54**:333-350.
- Hanna, W.W., and Bashaw, E.C. 1987. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science* **27**:1136-1139.
- Harlan, J. R., Brooks, M.H., Borgaonkar, D.S., and De Wet, J.M.J. 1964. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Bot. Gaz.* **125**:41-46.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. 1989. *Checkpoints*: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**:629-634.
- Hoisington, D., Khairallah, M., and González-de-León, D. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Second edition. México, D.F.: CIMMYT.
- Iino, Y., Hiramane, Y., and Yamamoto, M. 1995. The role of *CDC2* and other genes in meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **140**:1235-1245.
- Kimura, M. 1979. The neutral theory of molecular evolution. *Scientific American* **241**:94-104.
- Klapholz, S., and Esposito, R.E. 1980. Isolation of *SPO12-1* and *SPO13-1* from a natural variant of yeast that undergoes a single meiotic division. *Genetics* **96**:567-588.
- Klapholz, S., Waddell, C.S., and Esposito, R.E. 1985. The role of the *SPO11* gene in meiotic recombination in yeast. *Genetics* **110**:187-216.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* **5**:1425-1437.
- Leblanc, O., Grimanelli, D., González-de-Leon, D., and Savidan, Y. 1995. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:1198-1203.
- Lee, R.H., and Honigberg, S.M. 1996. Nutritional regulation of late meiotic events in *Saccharomyces cerevisiae* through a pathway distinct from initiation. *Molecular and Cellular Biology* **16**:3222-3232.



- Li, W., and Mitchell, A.P. 1997. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**:63-73.
- Malathi, K., Xiao, Y., and Mitchell, A.P. 1997. Interaction of yeast repressor-activator protein UME6 with glycogen synthase kinase 3 homolog RIM1p. *Molecular and Cellular Biology* **17**:7230-7236.
- Malone, R.E., and Esposito, R.E. 1981. Recombination less meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **1**:891-901.
- Malone, R.E., Bullard, S., Hermiston, M., Rieger, R., Cool, M., and Galbraith, A. 1991. Isolation of mutants defective in early step of meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **128**:79-88.
- McCarroll, R.M., and Esposito, R.E. 1994. SPO13 negatively regulates the progression of meiotic and meiotic nuclear division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**:47-60.
- Mitchell, A.P., and Bowdish, K.S. 1992. Selection for early meiotic mutants in yeast. *Genetics* **131**:65-72.
- Mogie, M. 1988. A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biological Journal of the Linnean Society* **35**:127-153.
- Mogie, M. 1992. *The evolution of Asexual Reproduction in Plants*. Chapman & Hall, London.
- Murray, A.W. 1992. Creative Blocks: cell-cycle *checkpoint* and feedback controls. *Nature* **359**:599-604.
- Murray, A.W., and Kirschner, M.W. 1991. What controls the cell cycle. *Scientific American* **264**:56-63.
- Nogler, G. A. 1984b. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* V. conclusion. *Botanica Helvetica* **94**:411-422.
- Nogler, G.A. 1984a. Gametophytic apomixis. In: Embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- Nugroho, S., Keese, P., Desamero, N.V., Kilian, A., and Jefferson, R.A. 1997. Molecular strategies for apomictic rice: Isolation and analysis of genes controlling the meiotic process. (Personal Communication).
- Nurse, P. 1991. *Checkpoint* and spindles. *Nature* **354**:356-359.
- Old, R.W., and Primrose, S.B. 1989. *Principles of gene manipulation*. Blackwell Scientific Publications, England.
- Park, H.D., Beeser, A.E., Clancy, M.J., and Cooper, T.G. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen starvation-induced Yvh1p and Ptp2p phosphatases play a role in control of sporulation. *Yeast* **12**:1135-1151.
- Promega Protocols and Applications Guide, 1981. Promega, Madison, U.S.A.



- Reed, G., and Pepler, H.J. 1973. *Yeast technology*. The Avi Publishing Company, Inc., U.S.A.
- Richards, A.J. 1986. *Plant breeding systems*. George Allen and Unwin, London.
- Rieger, R., Michaelis, A., and Green, M.M. 1976. *Glossary of genetics and cytogenetics*. Classical and Molecular. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Rubin-Bejarano, I., Mandel, S., Robzyk, K., and Kassir, Y. 1996. Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the conversion of the transcriptional repressor *UME6* to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator *IME1*. *Molecular and Cellular Biology* **16**:2518-2526.
- Savidan, Y. 1982. *Nature et hérédité de l'apomixie chez Panicum maximum Jacq.* PhD. Université de Paris XI.
- Savidan, Y., and Berthaud, J. 1994. Maize x *Tripsacum* hybridization and the potential for apomixis transfer for maize improvement. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Maize*. Berlin
- Savidan, Y., and Dujardin, M. 1992. Apomixie: La prochaine révolution verte?. *La Recherche* **241**:326-334.
- Sherwood, R.T., Berg, C.C., and Young, B.A. 1994. Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Science* **34**:1490-1494.
- Smith, H.E., and Mitchell, A.P. 1989. A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular biology* **9**:2142-2152.
- Smith, H.E., Su, S.S., Neugeborn, L., Driscoll, S.E., and Mitchell, A.P. 1990. Role of *IME1* expression in regulation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular biology* **10**:6103-6113.
- Stebbins, G.L. 1950. *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, U.S.A.
- Steber, C.M., and Esposito, R.E. 1995. *UME6* is a central component of a developmental regulatory switch controlling meiosis-specific gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **92**:12490-12494.
- Strickberger, M.W. 1993. *Evolución*. Omega, España.
- Su, S.S.Y., and Mitchell, A.P. 1993. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**:67-77.
- Vidan, S., and Mitchell, A.P. 1997. Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rimp15p. *Molecular and Cellular Biology* **17**:2688-2697.
- Walbot, V. 1996. Sources and consequences of phenotypic and genotypic plasticity in flowering plants. *Plant science* **1**:27-32.
- Wang, H.T., Frackman, S., Kowalisyn, J., Esposito, R.E., and Elder, R. 1987. Developmental regulation of *SPO13*, a gene required for separation of homologous chromosomes at meiosis I. *Molecular and Cellular Biology* **7**:1425-1435.



- Watson, J.D., Tooze, J., and Kurtz, D.T. 1983. *Recombinant DNA*. Scientific American Books, U.S.A.
- Willson, J., Wilson, S., Warr, N., and Watts, F.Z. 1997. Isolation and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* rhp9 gene: a gen required for the DNA damage *checkpoint* but not the replication *checkpoint*. *Nucleic Acids Research* **25**:2138-2145.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M-H., and Lockhart, D.J. 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* **15**:1359-1367.
- Xiao, Y., Krishnamurthy, M., and Mitchell, A. 1996. Pairwise interactions among yeast meiotic regulators. *Yeast Genetics and Molecular Biology*.



Apéndice

Aislamiento de DNA genómico de Maíz

1. Ponga 300-400 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de polipropileno de 15 ml para centrifugación. Se obtienen de 50 a más de 100 μ g de DNA/100 mg de tejido seco. Si se requieren cantidades mayores, comience con 1 g de tejido liofilizado en un tubo de polipropileno de 50 ml para centrifugación y triplique todas las cantidades dadas anteriormente.
2. Agregue 9.0 ml de solución amortiguadora CTAB para extracción, calentada (65°C), a los 300-400 mg de tejido liofilizado molido. Es mejor distribuir el tejido sobre las paredes laterales del tubo antes de agregar la solución amortiguadora, con el fin de evitar que se apelmace el tejido seco en el fondo. Mezcle invirtiendo el tubo varias veces con suavidad.
3. Incube durante 60-90 minutos en un horno a 65°C, agitando los tubos continuamente con suavidad.
4. Retire los tubos del horno, espere 4-5 minutos para que se enfríen los tubos y agregue 4.5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Agite suavemente los tubos durante 5-10 minutos para mezclar.
5. Centrifugue en una centrifugadora de mesa durante 10 minutos a 1300-1500 a temperatura ambiente (TA).
6. Vierta la capa acuosa superior en otros tubos de 15 ml. Agregue 4.5 ml de cloroformo/octanol y agite suavemente durante 5-10 minutos.
7. Centrifugue en una centrifugadora de mesa durante 10 minutos a 1300-1500 a TA.
8. Con una pipeta, traslade la capa acuosa superior a otros tubos de 15 ml que contengan 25-50 μ l de 10 mg/ml de RNAasa A (hervida previamente). Mezcle invirtiendo con suavidad los tubos e incube durante 30 minutos a TA.
9. Agregue 6.0 ml de isopropanol (2-propanol). Mezcle invirtiendo con suavidad los tubos.
10. Retire el DNA precipitado con un gancho de vidrio. Continúe con las OPCIONES A, B o C.

OPCION A: Extracción con fenol para obtener DNA de mayor pureza

10. Coloque el gancho con DNA en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 1 ml de TE pH8; haga girar con suavidad el gancho hasta que el DNA se deslice de él. Tape los tubos y agítelos suavemente a la temperatura ambiente hasta el día siguiente, para disolver el DNA.
11. Extraiga cada muestra con 1 ml (1 x el volumen original de TE pH8) de fenol equilibrado. Centrifugue la muestra durante 10 minutos a 1300 x g^2 en un rotor de cubeta oscilatoria.
12. Transfiera la capa (acuosa) superior a otro tubo. Extraiga el DNA con 1 ml (1 x el volumen original de TE pH8) de cloroformo/octanol. Centrifugue la muestra 10 minutos a 1300 x g^2 en un rotor con cubeta oscilante. Transfiera la capa (acuosa) superior a un nuevo tubo. Continúe con el paso 14 de la OPCION B.

OPCION B: precipitación con etanol

13. Coloque el gancho con DNA en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 1 ml de TE pH8; rote con suavidad el gancho hasta que el DNA se deslice del gancho. Tape los tubos y agite suavemente durante toda la noche a temperatura ambiente para disolver el DNA.
14. Precipite el DNA agregando 50 μ l de 5 M NaCl y luego 2.5 ml de EtOH absoluto (2.5 el volumen original de TE pH8); mezcle invirtiendo con suavidad el tubo.
15. Retire el DNA precipitado con el gancho de vidrio. Continúe con el paso 16 de la Opción C.

OPCION C: lavados del DNA



16. Coloque el gancho con DNA en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 3-4 ml de LAVADO 1. Deje el DNA en el gancho dentro del tubo durante unos 20 minutos.
17. Enjuague brevemente el DNA del gancho en 1-2 ml del LAVADO 2 y transfíralo a un tubo de plástico de 5 ml que contenga 0.5-1.0 ml de TE pH8; haga girar con suavidad el gancho hasta que el DNA se deslice del gancho. Tape el tubo y agítelo con suavidad a la temperatura ambiente hasta el día siguiente, para disolver el DNA. Almacene las muestras a 4°C.

Solución amortiguadora con CTAB para extracción		1 RXN	5 RXN	10 RXN	20 RXN	50 RXN	56 RXN
SOL. CONC.	[FINAL]	10 ml	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml	600 ml
dH ₂ O		6.5 ml	32.5 ml	65.0 ml	130.0 ml	325.0 ml	390.0 ml
1 M Tris-7.5	100 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
5 M NaCl	700 mM	1.4 ml	7.0 ml	14.0 ml	28.0 ml	70.0 ml	84.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
CTAB ²	1 %	0.1 g	0.5 g	1.0 g	2.0 g	4.5 g	6.0 g
14 M BME ³	140 mM	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml	4.5 ml	6.0 ml

¹ Use la solución recién preparada; caliéntela a 60-65°C antes de agregar el CTAB y el BME.

² CTAB = bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio (Sigma M-7635)

³ Agregue BME (β-mercaptoetanol) justo antes del empleo, bajo una campana para emanaciones.

LAVADO 1: 76% de EtOH, 0.2 M NaOAc		100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
SOL. CONC.						
EtOH absoluto		76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
2.5 M NaOAc		8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml
dH ₂ O		16 ml	32 ml	48 ml	64 ml	80 ml
LAVADO 2: 76% de EtOH, 10 mM NH ₄ OAc		100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
SOL. CONC.						
EtOH absoluto		76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
1 M NH ₄ OAc		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
dH ₂ O		23 ml	46 ml	69 ml	92 ml	115 ml
TE-pH8: 10 mM Tris - 8.0, 1 mM EDTA - pH 8.0		50 ml	100 ml	500 ml	1000 ml	
SOL. CONC.						
1 M Tris - 8.0		0.5 ml	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	
0.5 M EDTA - 8.0		0.1	0.2	1.0	2.0	
ddH ₂ O		afore al vol.	afore al vol.	afore al vol.	afore al vol.	

Aislamiento de DNA genómico de Levadura

1. Pesar 20 mg de levaduras comerciales liofilizadas.
2. Resuspender en 200 µl de *Breaking Buffer*.
3. Agregar 200 µl de fenol/cloroformo y mezclar a máxima velocidad por 3 minutos.
4. Agregar 200 µl de TE pH8.
5. Centrifugar 5 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Agregar 1 ml de Etanol y mezclar suavemente.
7. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad a TA y remover el sobrenadante.
8. Resuspender el botón en 400 µl de TE pH8.



9. Agregar 30 ml de 1mg/ml de RNAasa A mezclar e incubar 5 minutos a 37°C.
10. Agregar 10 μ l de 4 M de Acetato de amonio y 1 ml de etanol 100%. Mezclar por inversión.
11. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad TA.
12. Descartar el sobrenadante y lavar el botón con 500 μ l de etanol 80% y centrifugar 3 minutos.
13. Secar y resuspender el DNA en 100 μ l de TE pH8.

Breaking Buffer

2% (V/V) Triton X-100

1% SDS

100 mM NaCl

10 mM TRis-Cl pH8

1 mM EDTA pH 8

Cuantificación de DNA

1. Agregue 15 μ l de cada muestra a 735 μ l de TE pH8, mezcle bien y lea la DO260 y la DO280 para determinar la pureza. Consulte en los Apéndices las instrucciones sobre cómo usar el espectrofotómetro DU-65 de Beckman y el listado del programa para la lectura automática de muestras.
2. Diluya la muestra a 0.2 o 0.3 μ g/ μ l con TE pH8 y almacene a 4°C. La muestra se mantendrá utilizable por hasta seis meses.
3. Es preciso determinar la relación DO260/DO280 con el fin de evaluar la pureza de la muestra. Si esa relación es de 1.8-2.0, es probable que la absorción sea causada por los ácidos nucleicos. Una relación inferior a 1.8 indica que pueden existir proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra; en este caso, es conveniente volver a precipitar el DNA. Una relación superior a 2.0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol y se debe volver a efectuar la precipitación con etanol.

Electroforesis en gel de Agarosa

1. Agregue agarosa a la cantidad apropiada de solución amortiguadora para gel TAE IX.
2. Derrita la agarosa en horno de microondas, mezclando varias veces durante el calentamiento. Enfríela a 55°C (si lo desea, puede colocar el recipiente en agua fría para acelerar el enfriamiento) manteniéndola cubierta para evitar la evaporación.
3. Envuelva con cinta adhesiva los extremos de la charola para gel, vierta la agarosa en una probeta precalentada para medir su volumen y luego viértala en la charola e inserte los peines. Deje solidificar (20-30 minutos).
4. Retire la cinta y coloque la charola en un tanque de electroforesis que contiene amortiguador TAE IX para gel. Vierta solución amortiguadora en el dispositivo en cantidad suficiente para cubrir el gel con al menos 0.5 cm. Retire los peines sólo cuando esté listo para cargar las muestras.
5. Corra las muestras en el gel a 100 mA durante 5-10 minutos, luego córralas a 15-20 mA, corriente constante, hasta que el colorante azul de bromofenol haya emigrado hasta justo antes del siguiente conjunto de pozos. En general, esto tomará 14-16 horas para un gel grande con cuatro peines y una migración del colorante de unos 6 cm. Puede correr el gel con un amperaje mayor, pero puede resultar afectada la resolución de las muestras. Se puede mejorar la resolución recirculando la solución amortiguadora.



6. Retire la charola del dispositivo y tiña en 1 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio (100 μl de 10 mg/ml de bromuro de etidio en 1000 ml de dH_2O) durante 20 minutos agitando con suavidad.
ADVERTENCIA: El bromuro de etidio es en extremo mutagénico; use guantes al manipularlo y tome las máximas precauciones.
7. Enjuague el gel en dH_2O durante 20 minutos, deslice el gel en un transiluminador UV y fotografíe.
Para una cámara Fotodyne PCM-10 con visera de 20 x 26 cm y película Polaroid Tipo 667, use una exposición f8 de 1 segundo.

Amortiguador para gel TAE 10X: Reactivos	400 mM Tris, 1 litro	50 mM NaOAc, 2 litros	7.7 mM EDTA 3 litros	4 litros	5 litros
Base Tris (PM=121.10)	48.40 g	96.80 g	145.20 g	193.60 g	242.0 g
NaOAc (PM=82.03)	4.10 g	8.20 g	12.30 g	16.40 g	20.5 g
Na ₄ EDTA (PM=380.20)	2.92 g	5.84 g	8.76 g	11.68 g	14.6 g

Ajuste el pH a 8.0 con ácido acético glacial.

Transferencia a membrana de Nylon

1. La mejor superficie de un gel para que haya un contacto parejo con un filtro de membrana es la que se forma en el fondo del molde del gel. Por consiguiente, es conveniente dar vuelta el gel antes de construir un sistema de papel secante y, preferiblemente antes de la desnaturalización. Preense el gel entre dos placas delgadas de acrílico, sujete con firmeza las esquinas y déle vuelta con un solo movimiento rápido. Deje una de las placas bajo el gel para facilitar la manipulación de éste en las operaciones posteriores.
2. Desnaturalice el gel durante 30 minutos en NaOH al 0.4 N, 0.6 M NaCl; trate cada gel en aproximadamente tres veces su volumen de solución.
3. Neutralice el gel durante 30 minutos en 0.5 M Tris-7.5, 1.5 M NaCl; trate cada gel en aproximadamente tres veces su volumen de solución.

Construcción del Sistema de Transferencia con Secante Húmedo

4. Corte la membrana de nylon para que tenga las mismas dimensiones del gel. Rotule o haga una muesca en la esquina superior izquierda de la membrana para la identificación posterior. Coloque en el amortiguador para transferencia.
5. Ponga una rejilla de plástico en una charola poco profunda para permitir el acceso de la solución amortiguadora para transferencia (25 mM NaPO₄, pH de 6.5) al centro de la esponja.
6. Coloque una esponja limpia con un grosor de 6-8 cm en el centro de la rejilla de plástico; la superficie de la esponja debe ser igual a la del gel que se va a secar o más grande. Embeba bien la esponja en la solución amortiguadora para transferencia.
7. Sumerja brevemente una hoja de papel secante (extra grueso) en la solución para transferencia y colóquela arriba de la esponja.
8. Coloque el gel sobre papel secante arriba de la esponja, con el lado abierto de los pozos hacia abajo.
9. Ponga la pieza cortada de matriz sobre el gel, con el lado rotulado hacia abajo para identificar el lado de transferencia de la matriz. Use una varilla de vidrio para alisar la matriz sobre la superficie del gel.
10. Coloque una hoja de papel secante humedecido sobre la matriz.
11. Con cuidado, ponga una pila de 10 cm de alto de toallas de papel arriba del papel secante. Si se emplea una superficie plana, se puede colocar arriba de la pila un peso liviano adicional para obtener una presión pareja en la superficie de secado.
12. Agregue solución amortiguadora de transferencia a la charola para que el nivel de la solución permanezca alto durante el proceso de transferencia.



Clonación de Genes Involucrados en la Regulación de la Meiosis

13. Deje que se efectúe la transferencia hasta el día siguiente (16-18 horas). Es muy conveniente retirar con cuidado la capa húmeda inferior de toallas de papel una vez que la pila ha absorbido 5-8 cm de solución amortiguadora para transferencia.
14. Retire la matriz y colóquela inmediatamente en 2X SSC. Usando guantes, puede frotar con suavidad para retirar cualquier partícula de agar. Lave la membrana durante 15 minutos, agitándola, en 2X SSC.
15. Deje secar al aire o escurrir hasta que esté húmeda pero no mojada (por lo general 2 a 5 minutos); no permita que se seque.
16. Coloque la membrana sobre un papel de filtro húmedo y exponga al UV en un "UV CrossLinker" de Stratagene usando la calibración automática (120,000 μ joules/cm²).
17. Caliente en el horno a 95°C sobre o entre papel de filtro limpio durante 1.5-2 horas.
18. Verifique brevemente la transferencia bajo luz UV. Si no marcó previamente la membrana, márquela con una pluma marcadora permanente o un lápiz en el lado unido al DNA.
19. Si la membrana no va a ser usada durante una semana o más, consérvela entre hojas de papel de filtro limpio en una bolsa de plástico cerrada herméticamente, en un lugar fresco y seco (se le puede almacenar a 4°C).

Solución para desnaturalización - 0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl (1 litro/gel)					
Reactivos	1 litro	5 litros	10 litros	20 litros	40 litros
NaOH (PM=40.00)	16.0 g	80.0 g	160.0 g	320.0 g	640.0 g
NaCl (PM=58.44)	35.0 g	175.3 g	350.6 g	701.3 g	1402.6 g

Solución para neutralización - 0.5 M Tris-7.5, 1.5 M NaCl (1 litro/gel)					
Reactivos	1 litro	5 litros	10 litros	20 litros	40 litros
Tris-HCl (PM=156.60)	63.5 g	317.5 g	630.5 g	1270.0 g	2540.0 g
Tris-base (PM=121.10)	11.8 g	59.0 g	118.0 g	236.0 g	472.0 g
NaCl (PM=58.44)	87.6 g	438.0 g	876.0 g	1752.0 g	3504.0 g

-O -

Tris-base (PM=121.10)	60.6 g	302.8 g	605.5 g	1211.0 g	2422.0 g
NaCl (PM=58.44)	87.7 g	438.3 g	876.6 g	1753.2 g	3506.4 g
HCl Conc.	25.0 ml	125.0 ml	250.0 ml	500.0 ml	1000.0 ml

Amortiguador para transferencia: 25 mM NaPO ₄ , pH 6.5 (5 litros/gel)					
SOL. CONC.	1 litro	5 litros	10 litros	20 litros	40 litros
1 M NaPO ₄ -6.5	25 ml	125 ml	250 ml	500 ml	1000 ml
SSC al 2X					
SOL. CONC.	250 ml	500 ml	750 ml	1000 ml	2000 ml
25X SSC	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	160 ml

Marcaje de sonda

1. Prepare una mezcla de reacción que contenga todos los componentes enumerados a continuación excepto el plásmido.

SOL. CONC.	[FINAL]	RXN de 100 μ l	RXN de 100 μ l
	o cantidad	2.5% Dig	5.0% Dig
ddH ₂ O	—	38.5 μ l	38.4 μ l
Taq Buffer (10X)	1X	10.0 μ l	10.0 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM	4.0 μ l	4.0 μ l
Glicerol	15 %	15.0 μ l	15.0 μ l
Mezcl. dNTP -dTTP(10 mM c/u)	50 μ M de c/u	1.5 (0.5 μ l de c/u)	1.5 (0.5 μ l de c/u)
dTTP (10 mM)	48.75 o 47.5 μ M	0.4875 μ l	0.475 μ l



Dig-dUTP (1 mM)	1.25 o 2.5 μM	0.125 μl	0.250 μl
Taq polimerasa (5U/μl)	2.0 U	0.4 μl	0.4 μl
Primer 1 (2 μM)	0.2 μM	10.0 μl	10.0 μl
Primer 2 (2 μM)	0.2 μM	10.0 μl	10.0 μl
Plásmido (1 ng/μl)	10 ng	10.0 μl	10.0 μl

2. Ponga 90 μl de mezcla de reacción en cada tubo.
3. Agregue 10 μl de plásmido a cada tubo. Mezcle brevemente y centrifugue.
4. Cubra cada muestra con 50 μl de aceite mineral ultra puro.
5. Coloque en la máquina para PCR y asegúrese de que haya suficiente aceite en cada celda para que exista un contacto apropiado con el tubo.
6. Amplifique usando el programa siguiente :

1 ciclo de:	25 ciclos de	1 ciclo de
94°C por 1 minutos	94°C por 1 minutos 42°C por 2 minutos	72°C por 4 minutos

Hibridación y detección de sondas marcadas con digoxigenina

1. Prehibride las membranas durante 1-3 horas (por lo menos 2 horas la primera vez) en un horno a 65°C, en una charola con suficiente solución HYB para cubrir bien todas las membranas. La solución HYB usada para prehibridación se puede conservar congelada o a 4°C y ser usada nuevamente tres o cuatro veces o hasta que el material precipitado no se incorpore a la solución al calentarla.
2. Enrolle las membranas húmedas sobre una pipeta gruesa de vidrio sobre una superficie plana y limpia, humedecida con un poco de la solución HYB de la charola, e insértelas en botellas limpias de hibridación. Asegúrese de que no se enrosquen al rotar en el horno (síndrome del "taco", verifique la dirección de rotación del mecanismo giratorio) y evite la formación de burbujas o cualquier secado de las membranas. Puede colocar hasta cinco membranas de 500 cm² en una sola botella. Las membranas más pequeñas se pueden poner en tubos Corning de polipropileno de 15 o 50 ml, que se puedan colocar en secciones de conductos de PVC comunes, que tengan el diámetro correcto y sean suficientemente largas para poner dos tubos en cada una.
3. Agregue 2-3 ml/100 cm² de solución HYB para la primera membrana y 1 ml más por cada membrana de 500 cm² adicional; en el caso de las membranas pequeñas colocadas en tubos, ajuste el volumen como corresponda. La solución HYB debe contener 50-100 ng/ml de 2.5 - 5% de sonda marcada con digoxigenina [desnaturalice la sonda calentándola a 95°C durante 10 minutos y enfríela sobre hielo]. Si la solución HYB que contiene sonda ha sido usada previamente y conservada congelada, descongélela y desnaturalícela durante 20 minutos a 95°C.
4. Hibride durante 15-18 horas (hasta el día siguiente) a 65°C en botellas en el horno para hibridación.
5. Retire las membranas de la botella (o botellas) y lávelas juntas agitándolas en charolas de tamaño adecuado, de la siguiente manera:

2 x 5 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	TA	0.5 ml/cm ²
3 x 15 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	65°C	0.5 ml/cm ²
o, para un lavado menos severo			
3 x 15 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	TA	0.5 ml/cm ²
1 x 15 min	0.15X SSC, 0.1% SDS	50°C	0.5 ml/cm ²

Es esencial vigilar las temperaturas de lavado para asegurarse de que se respetan sistemáticamente los tratamientos anteriores; la reducción indebida de la temperatura o un menor tiempo de tratamiento pueden provocar un mayor ruido de fondo y resultados menos predecibles.

6. Enjuague las mebranas en Amortiguador 1 a TA.



7. Incube las membranas en Amortiguador 2 durante 30 minutos a TA, agitándolas (5 ml/100 cm²).
8. Incube las membranas en solución antidig fresca (5 ml/100 cm²) durante 30 minutos a TA agitándolas; se puede volver a usar esta solución en el mismo día de la primera utilización. [Centrifugue el antidig inmediatamente antes de usarlo y pipetee con cuidado la cantidad descada.]
9. Lave las membranas agitándolas, de la siguiente manera:

3 x 10 min	Amortiguador 2	TA	0.5 ml/cm ²
3 x 10 min	Amortiguador 1	TA	0.5 ml/cm ²
1 x 5 min	Amortiguador 3	TA	0.5 ml/cm ²
10. Incube las membranas en solución CSPD (5 ml/100 cm²) durante 20 minutos a TA agitándolas, preferiblemente en la oscuridad.
[Después de cada utilización, guarde la solución CSPD en el refrigerador, en una botella envuelta en papel de aluminio]
11. Retire con lentitud cada membrana de la charola con CSPD, dejando que la solución se escurra de la membrana; luego colóquela, con el lado del DNA hacia abajo, arriba de GladWrap (o una película similar de material plástico para envoltura). Puede poner varias membranas en fila sobre una tira larga de película asegurada a la mesa con cinta adhesiva. Coloque otra hoja de GladWrap arriba (el lado de atrás de las membranas), corte el GladWrap entre las membranas y cierre los bordes sobre el lado de atrás de cada membrana.
12. Coloque las membranas en carpetas de exposición y expóngalos a películas radiográficas XAR-5 hasta el día siguiente (15-18 horas).
Observe que en este protocolo se ha buscado esta exposición larga para facilitar el manejo simultáneo de varias docenas de membranas grandes; además, se dispone de un intervalo natural de descanso para la persona a cargo.
13. Revele la película radiográfica durante 6 minutos en revelador GBX (Kodak), enjuague en agua durante 30 segundos, fije en fijador GBX durante 3 minutos y enjuague durante 3 minutos en agua que corre.
14. Para asegurar una duración más prolongada de las membranas y la remoción adecuada de la sonda, proceda de inmediato a retirarlas de su envoltura de material plástico y sumérgalas en 0.1X SSC, 0.1% SDS ("lavado de máxima astringencia") o en 2X SSC en una charola a TA. No deje que se sequen las membranas. Puede mantenerlas por unos días en esta solución a 4°C o, mejor, removerlas de inmediato (véase el protocolo siguiente, p. 32).

Solución HYB

SOL. CONC.	[FINAL]	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml	150 ml
25X SSC	5X SSC	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	30 ml
10% Laurilsarcosina	0.01%	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
20% SDS (bueno)	0.02%	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
Reactivo bloqueador ¹ (Boehringer Mannheim)	0.2%	50 mg	100 mg	150 mg	200 mg	300 mg

¹ Agréguelo después de calentar la solución a 65°C y verifique que el pH es de 7.4. En ciertos casos pueden ser necesarias concentraciones más altas (de hasta 0.3%).

0.10X SSC, 0.1% SDS: Lavado de máxima severidad		1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
SOL. CONC.							
25X SSC		4.0 ml	8.0 ml	12.0 ml	16.0 ml	20.0 ml	24.0 ml
20% SDS		5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml
0.15X SSC, 0.1% SDS: Lavado más severo		1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
SOL. CONC.							
25X SSC		6.0 ml	12.0 ml	18.0 ml	24.0 ml	30.0 ml	36.0 ml
20% SDS		5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml
0.20X SSC, 0.1% SDS: Lavado severo		1000 ml	2000 ml	3000 ml	4000 ml	5000 ml	6000 ml
SOL. CONC.							
25X SSC		8.0 ml	16.0 ml	24.0 ml	32.0 ml	40.0 ml	48.0 ml
20% SDS		5.0 ml	10.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	30.0 ml



Amortiguador 1							
SOL. CONC.		[FINAL]	500 ml	1000 ml	2000 ml	4000 ml	
1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.01 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml		
5 M NaCl		0.15 M	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	120.0 ml	

Amortiguador 2							
SOL. CONC.		[FINAL]	500 ml	1000 ml	2000 ml	4000 ml	
1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.01 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	40.0 ml		
5 M NaCl		0.15 M	15.0 ml	30.0 ml	60.0 ml	120.0 ml	
Reactivo bloqueador (Boehringer Mannheim)	0.1%	500.0 mg	1000.0 mg	2000.0 mg	4000.0 mg		

Para disolver el bloqueador, caliente primero la solución a 65°C antes de agregarlo (Advertencia: nunca caliente una solución que ya contenga el reactivo bloqueador en el horno de microondas). Puede preparar esta solución hasta un día antes del empleo, pero asegúrese de usarla a la temperatura ambiente.

Amortiguador 3							
SOL. CONC.		[FINAL]	100 ml	200 ml	400 ml	500 ml	
1 M Tris-HCl, pH 9.5	0.01 M	1.0 ml	2.0 ml	4.0 ml	5.0 ml		
5 M NaCl		0.10 M	2.0 ml	4.0 ml	8.0 ml	10.0 ml	
1 M MgCl ₂		0.05 M	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	25.0 ml	

Somete la solución al autoclave antes de usarla o utilice soluciones ya pasadas por el autoclave y ddH₂O.

Anti-Dig (1:15000)

Amortiguador 2 + 1 µl/15 ml anti-Dig (Anti-digoxigenina-AP, *Boehringer Mannheim*, Cat. # 1093274, 150 Unidades/200 µl)