



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO  
Ciencias Bioquímicas

Facultad de Química

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CLONACIÓN DE GENES  
INDUCIDOS DURANTE LA  
GERMINACIÓN DEL MAÍZ

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

Q.A. ANA VALERIA MARTÍNEZ SILVA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA O. BERNAL LUGO

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2006





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.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
<b>LAS SEMILLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>GERMINACIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>LA GERMINACIÓN NECESITA DE LA EXPRESIÓN DE NUEVOS GENES</b> .....	<b>14</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>CURVA DE IMBIBICIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>GERMINACIÓN DE SEMILLAS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBTENCIÓN DEL EMBRIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL</b> .....	<b>19</b>
<b>AISLAMIENTO DE mRNA POLYA<sup>+</sup></b> .....	<b>20</b>
<b>SÍNTESIS DE LA PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE cDNA</b> .....	<b>21</b>
<b>cDNA-AFLP</b> .....	<b>22</b>
<b>PURIFICACIÓN DE cDNAs DEL GEL DE POLIACRILAMIDA</b> .....	<b>25</b>
<b>AMPLIFICACIÓN DE cDNAs RECUPERADOS DEL GEL DE POLIACRILAMIDA</b> .....	<b>26</b>
<b>PURIFICACIÓN DE LOS cDNAs AMPLIFICADOS DEL GEL DE AGAROSA</b> .....	<b>27</b>

<b>TRANSFORMACIÓN GENÉTICA .....</b>	<b>27</b>
<b>SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS .....</b>	<b>30</b>
<b>ANÁLISIS DE SECUENCIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>DISEÑO DE OLIGOS .....</b>	<b>31</b>
<b>RNA LIBRE DE DNA .....</b>	<b>32</b>
<b>RT-PCR .....</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>ESTABLECIMIENTO DE LOS TIEMPOS DE GERMINACIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y AISLAMIENTO DE mRNA .....</b>	<b>35</b>
<b>cDNA-AFLP .....</b>	<b>36</b>
<b>CLONACIÓN DE LOS cDNAs EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE .....</b>	<b>41</b>
<b>ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS cDNAs CLONADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>CORROBORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR EFECTO DE LA GERMINACIÓN DE LOS GENES CLONADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>FUNCIÓN DE LOS GENES CUYOS TRANSCRITOS SE ACUMULAN DURANTE LA GERMINACIÓN Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN ESTE PROCESO .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>77</b>

El proceso de germinación comienza con la entrada de agua a la semilla seca y termina con la protrusión de la radícula. Para que se lleve a cabo exitosamente, requiere de la expresión coordinada tanto espacial como temporal de numerosos genes. Con la finalidad de identificar genes cuya expresión se induce durante la germinación, se empleó la técnica de cDNA-AFLP para comparar las poblaciones de mRNA de embriones sin germinar y germinados de maíz. Los fragmentos derivados de ambos lotes fueron comparados y se identificaron 413 fragmentos de cDNA que se expresan diferencialmente, de ellos 73 muestran una expresión inducida por la germinación, 178 aumentan su nivel de expresión y 120 la disminuyen con respecto al nivel observado en embriones de semillas sin germinar; únicamente 42 se expresan en embriones sin germinar. Se clonaron y analizaron las secuencias de 15 cDNAs cuya expresión se induce por efecto de la germinación; 6 de estas secuencias presentan alto porcentaje de identidad con ESTs de maíz cuya función no ha sido reportada, 7 cDNAs tienen homología a proteínas ya reportadas en bases de datos tales como: acetil glucosamina fosfato mutasa (AGM), peptidil-prolil isomerasa (PPI), una proteína que interactúa con el factor de transcripción ABI3 (IP ABI3), un receptor tipo cinasa de serina/treonina (RLK1), la mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS), el factor de splicing alternativo SF2 (ASF/SF2) y la glutatión S-transferasa (In2-1). El patrón de expresión de estos genes se analizó por RT-PCR. de gran interés resultó encontrar que el fragmento homólogo a *AGM* se expresa específicamente en embriones germinados, por lo que sugerimos se trata de un gen germinación-específico. Por otra parte, los fragmentos homólogos a MIPS, IP ABI3, ASF/SF2, e In2-1 aumentaron ligeramente sus niveles de expresión en embriones germinados. Se discute el papel de estos genes en el proceso germinativo de las semillas de maíz.

Las semillas son importantes para la vida humana ya que son la principal forma de propagación de especies cultivables y como fuente de alimentos (Consonni *et al.*, 2005).

El maíz, que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales, es una materia prima básica de la industria de transformación con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. La habilidad de las semillas para germinar es uno de los principales problemas de la calidad de las semillas (Reuzeau y Cavalié, 1997).

Por definición, la germinación es un proceso que comienza con la incorporación de agua a la semilla seca quiescente (imbibición) y termina con la protrusión de la radícula y del eje embrionario (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997; Koornneef *et al.*, 2002). El proceso germinativo puede ser dividido en tres fases: imbibición, incremento de actividad metabólica, e iniciación de crecimiento, las cuales ocurren paralelamente a la toma trifásica de agua de las semillas maduras. Morfológicamente, la iniciación del crecimiento corresponde a la emergencia radicular; el crecimiento y eventos subsecuentes, incluyendo la movilización de compuestos de reserva, estos asociados con el crecimiento de la plántula (Bewley, 1997; Rajjou *et al.*, 2004). Debido a que la germinación de las semillas es un proceso complejo que involucra diferentes tejidos con una gran variedad de funciones y que realizan diversos procesos bioquímicos y moleculares, es de esperarse que este proceso requiera de la expresión de numerosos genes coordinada y regulada tanto espacial como temporal (Potokina *et al.*, 2002).

Con la finalidad de identificar genes que se expresen durante el proceso de germinación se empleó la técnica de cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism), la cual está basada en la detección de fragmentos de restricción de cDNA amplificados selectivamente por PCR (Vos *et al.*, 1995). Esta técnica involucra tres pasos: a) restricción del DNA y ligado de oligonucleótidos adaptadores, b) amplificación selectiva de un grupo de fragmentos de restricción, y c) análisis en gel de acrilamida de los fragmentos amplificados. La amplificación selectiva se logra mediante el uso de cebadores que se extienden en los fragmentos de restricción, amplificando únicamente los fragmentos en los cuales los cebadores se alinean a los nucleótidos que flanquean los sitios de restricción (Vos *et al.*, 1995). Este método representa una de las más poderosas técnicas para el análisis de genes que se expresan diferencialmente,

es una técnica robusta y capaz de visualizar un número extremadamente grande de variaciones de expresión existentes entre una población similar de ácidos nucleicos (Vos *et al.*, 1995).

En este trabajo, varios fragmentos expresados diferencialmente por efecto de la germinación fueron identificados mediante cDNA-AFLPs. Estos fueron clonados y secuenciados para conocer su identidad y poder inferir su papel en la germinación de semillas de maíz.

## **LAS SEMILLAS.**

La semilla se define como un óvulo maduro fertilizado que posee un embrión, reservas almacenadas, y una cubierta protectora (White *et al.*, 2000). Es parte esencial en el ciclo de vida de las plantas y representa el inicio de la nueva generación esporofítica. Una semilla debe ser capaz de desarrollar exitosamente una plántula, e integrarla al medio ambiente (Consonni *et al.*, 2005).

### *Estructura del óvulo y su fertilización*

El óvulo es el progenitor de las semillas. Dentro del primordio del óvulo, el megasporangio produce células meióticas de las cuales se genera el gametofito femenino. Los gametos o células sexuales femeninas y masculinas son haploides ( $1n$ ), los gametos de sexo opuesto se fusionan para formar un cigoto ( $2n$ ). Las esporas femeninas, en vez de ser liberadas del esporangio, quedan retenidas y protegidas en el interior del mismo. En este sitio germina la espora y produce un pequeño gametofito femenino, protegido por el tegumento que lo envuelve completamente, excepto por una pequeña abertura en la parte superior, el micrópilo. Posteriormente, el tegumento se desarrolla para formar la cubierta de las semillas (Consonni *et al.*, 2005). Los granos de polen maduro contienen dos células espermáticas y células vegetativas. El embrión es el resultado de la fusión de una célula espermática y el huevo, y el endospermo forma parte del gametofito femenino.

### *Desarrollo y estructuras de la semilla.*

La semilla se desarrolla de un óvulo fertilizado. Este proceso comprende tres fases, cada una con su propio programa genético. En la primera fase, el desarrollo embrionario se inicia con la división del huevo fertilizado o cigoto. Una de las dos células formadas dará origen a la parte superior del embrión y la otra a la parte inferior. Por medio de una progresión ordenada de divisiones, el embrión se va diferenciando, iniciándose así la formación de los meristemos primarios, que son los precursores de los futuros tejidos de la planta, además de uno (*monocotiledóneas*) o dos cotiledones (*dicotiledóneas*). Así, en la semilla madura, el eje embrionario contiene todos los tejidos que van a dar lugar a la estructura de la plántula. Al mismo tiempo se desarrolla el endospermo formado por la fusión de dos núcleos polares con el segundo núcleo espermático. El producto de esta fusión tiene un complemento cromosómico



triploide. En algunas semillas como en las oleaginosas, este tejido se consume durante el desarrollo de la semilla mientras que en otras como en los cereales, este tejido es la característica principal de la semilla (Consonni *et al.*, 2005). La otra estructura es la cubierta de la semilla formada de los integumentos del ovario y representa el tejido materno en la semilla. En el caso del maíz, la cubierta seminal se denomina pericarpio, debido a que solo uno de los integumentos participa en su formación (Consonni *et al.*, 2005). En la segunda fase, la semilla incrementa su peso seco a medida que se depositan las reservas. La síntesis de estas reservas se realiza como consecuencia de la activación del programa genético responsable de sintetizarlas. Finalmente, durante la fase de maduración, las semillas se desecan y se preparan para sobrevivir en estado seco. Esta última fase requiere de la expresión de un conjunto de genes que permite que la semilla adquiera tolerancia a la desecación (Bewley y Black, 1994; White *et al.*, 2000). En algunas especies, durante la maduración de la semilla se expresan genes que producen latencia, una característica que han perdido la mayoría de las especies cultivadas.

Existen diversas condiciones ambientales que afectan el desarrollo de las semillas como son: deficiencia de agua, temperatura, luz, competencia con otras plantas, y disponibilidad de nutrientes (White *et al.*, 2000).

## **GERMINACIÓN.**

Por definición, germinación *sensu stricto* comprende los eventos fisiológicos (hidratación de la semilla, protrusión radicular y del eje embrionario), bioquímicos (respiración, reactivación del metabolismo, desarrollo mitocondrial y generación de energía) y moleculares (síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, cambio en la expresión de genes específicos), que se establecen entre el inicio de la hidratación de la semilla quiescente y la protrusión de la radícula a través de las estructuras que rodean el embrión (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997; Koornneef *et al.*, 2002, Rajjou *et al.*, 2004). Para que esto ocurra, las semillas necesitan ser hidratadas bajo condiciones de temperatura y oxígeno que permitan la reactivación del metabolismo (Gallardo *et al.*, 2002).

### *Imbibición y reactivación del metabolismo*

La absorción de agua es el paso esencial e inicial de la germinación. La hidratación de la semilla seca y madura presenta un comportamiento trifásico, incluyendo un rápido periodo inicial (fase I), seguido por una fase lag con un cambio mínimo en el contenido de agua (fase II), y un subsecuente incremento en el contenido de agua que coincide con la emergencia de la radícula y la continuación del crecimiento (fase III; Bewley, 1997). Estrictamente, el término germinación se refiere a las fases I y II, durante las cuales las semillas embebidas mantienen la tolerancia a la desecación (Bradford, 1990; Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997; Gallardo *et al.*, 2001).

Durante la fase I de la germinación, la cantidad de agua absorbida se incrementa en función del tiempo de germinación. Las paredes celulares de los embriones de semillas secas maduras se encuentran reducidas, al iniciar la imbibición se expanden y se reorganizan para poder absorber el agua. El efecto del agua dentro de las células de la semilla seca durante la fase I, resulta en perturbaciones estructurales temporales, particularmente en las membranas, donde comienza un inmediato y rápido escape de solutos y metabolitos de bajo peso molecular. Esto es sintomático de la transición de los componentes fosfolipídicos de las membranas de la fase de gel adquirida durante la maduración y desecación, al estado normal hidratado (Bewley, 1997). Este estado hidratado constituye la configuración funcional de las membranas, por lo que la liberación de solutos se reduce. Cómo se reparan las membranas del daño provocado por la desecación y rehidratación, aún se desconoce (Bewley, 1997). También, la reintroducción de agua durante la imbibición es suficiente para reactivar la actividad metabólica (Bewley, 1997). Las estructuras y enzimas necesarias para esta recuperación inicial, están presentes en la semilla seca, habiendo sobrevivido al menos parcialmente intactas a la fase de desecación (Bewley, 1997). En la fase II o lag, el potencial de absorción de agua no juega un papel importante. Durante esta fase la mayoría de los eventos metabólicos preparan a las semillas quiescentes para que se realice la emergencia de la radícula (Bewley, 1997).

Como se mencionó anteriormente, la fase III ocurre posteriormente a la protrusión de la radícula, por lo que se considera como fase post-germinativa. En esta fase se incrementa la absorción de agua y se producen moléculas de bajo peso molecular y sustancias osmóticamente activas, resultado de la hidrólisis de compuestos de reserva. La duración de estas fases depende de las propiedades inherentes de cada especie (Bewley, 1997).

## *Respiración*

Uno de los primeros cambios en la imbibición es la recuperación de la actividad respiratoria, la cual puede ser detectada a los pocos minutos después del primer incremento en el consumo de oxígeno, éste se mantiene hasta que la radícula penetra las estructuras que la rodean (Bewley, 1997).

Al igual que la imbibición, durante la germinación los cambios en la respiración involucran tres fases; En la fase I se observa un incremento inicial en el consumo de oxígeno atribuido a la reactivación de las vías glicolítica y oxidativa de las pentosas fosfato (Botha *et al.*, 1992; Bewley y Black, 1994). También las enzimas del ciclo de Krebs comienzan a activarse en esta fase (Bewley, 1997), lo cual induce la síntesis de *novo* y por tanto un incremento de ATP y de los otros adenin nucleótidos. La fase II es una fase lag, ya que el consumo de oxígeno aumenta muy poco, en este momento, la semilla está completamente hidratada y todas las enzimas existentes están activadas. Durante esta fase los niveles de ATP permanecen constantes. En la fase III el consumo de oxígeno aumenta nuevamente, esto puede deberse al incremento de la actividad de nuevas enzimas mitocondriales y respiratorias, ya que el número de mitocondrias funcionales se incrementa paralelamente con la respiración (Logan *et al.*, 2001).

Es notorio que el consumo de oxígeno durante la germinación presenta un comportamiento similar a la imbibición, esto se debe a que ambos eventos ocurren de manera simultánea.

## *Desarrollo mitocondrial y Generación de energía.*

Los tejidos de las semillas secas y maduras contienen mitocondrias, y aunque estos organelos se encuentran pobremente diferenciados como consecuencia de la maduración y desecación, contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales que aportan la cantidad suficiente de ATP para mantener el metabolismo por varias horas después de la imbibición (Ehrenshaft y Brambl, 1990; Attucci *et al.*, 1991; Bewley, 1997). El ATP en semillas secas es extremadamente escaso en comparación con otros adenin nucleótidos (ADP y AMP) pero con la hidratación aumenta rápidamente su concentración.

La fuente metabólica de ATP en la germinación de embriones se desconoce, pero se ha sugerido que mitocondrias funcionales están presentes en las semillas secas de algunas especies de plantas (Attucci *et al.*, 1991), mientras que en otras, el ATP sintetizado es producto de la actividad de las vías fermentativas durante etapas tempranas de imbibición (Raymond *et*

*al.*, 1985) y que en estos casos la biogénesis mitocondrial ocurre durante la imbibición (Logan *et al.*, 2001).

En cotiledones germinados se han detectado dos distintos patrones de desarrollo mitocondrial dependiendo de la naturaleza de los compuestos de reserva. En semillas en las que el almidón constituye la reserva mayoritaria, la reparación y activación de organelos preexistentes es predominante, mientras que en semillas oleaginosas, se producen nuevas mitocondrias (Morohashi y Bewley, 1980; Morohashi, 1986).

Ehrenshaft y Brambl (1990) estudiaron el ensamblaje mitocondrial en embriones de maíz inmediatamente después de la imbibición y mostraron que las enzimas mitocondriales, citocromo oxidasa y ATP sintasa, están presentes en forma activa en las mitocondrias de embriones secos. Demostraron también, que hay síntesis *de novo* de proteínas mitocondriales después de las 6 h de imbibición y que es dependiente de la transcripción *de novo* y del mRNA pre-existente.

Estas observaciones permiten hipotetizar que las mitocondrias son parcialmente degradadas en el embrión, durante la desecación y que pro-mitocondrias son formadas por rediferenciación y biogénesis durante la imbibición. En esta fase de re-ensamblaje hay síntesis *de novo* de algunas, de las proteínas mitocondriales que son codificadas por los genomas nuclear y mitocondrial (Logan *et al.*, 2001).

#### *Movilización de los compuestos de reserva presentes en el embrión.*

Poco se sabe acerca de cómo los embriones movilizan sus reservas internas de carbohidratos, lípidos y proteínas durante el estado temprano de la germinación (Botha *et al.*, 1992). Durante la imbibición se inicia un metabolismo muy activo (respiración y síntesis de proteínas) que está asociado con la hidratación de las enzimas y durante el cual se utilizan las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas que estaban almacenados. Generalmente el eje embrionario contiene suficientes reservas para satisfacer sus necesidades inmediatas, pero pronto es necesario usar las reservas almacenadas en el endospermo. Todo este proceso comprende cambios químicos muy complejos que son de tres tipos básicamente: (1) el rompimiento o degradación de ciertos compuestos presentes en las semillas, (2) el transporte de materiales de una parte de la semilla a otra, principalmente del endospermo al embrión o de los cotiledones a las partes en crecimiento y, (3) la síntesis de nuevos materiales a partir de los que fueron

degradados.

### *Síntesis de proteínas y de RNA*

La síntesis de proteínas y de RNA son actividades celulares fundamentales que se reactivan durante la germinación y son un pre-requisito para que el crecimiento del eje embrionario y de la radícula se lleve a cabo (Potokina *et al.*, 2002).

Todos los componentes necesarios para el reestablecimiento de la síntesis de proteínas en la imbibición están presentes en las células de embriones maduros secos, esto permite que la síntesis de proteínas se reactive a los pocos minutos de iniciada la hidratación. Experimentalmente, esto se detecta como una disminución en el número de ribosomas libres, ya que son reclutados por el mRNA para formar los polisomas (complejos activos en la síntesis de proteínas) y por tanto se detecta un incremento en estos últimos. La síntesis de proteínas en las primeras horas de la imbibición utiliza los mRNA presentes en la semilla seca. Estos mRNA son de dos categorías: mRNA residuales y mRNA almacenados. Los mensajes residuales provienen de algunos procesos previos del desarrollo de la semilla (Lane, 1991) como en mRNAs que codifican proteínas importantes en la maduración y desecación de las semillas, siendo el caso de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins, proteínas de reserva), mRNAs que transitoriamente pueden ser utilizados para la síntesis de proteínas, hasta que los procesos de degradación se activen (Jiang y Kermode, 1994). Los mensajeros almacenados o conservados son aquellos sintetizados durante el desarrollo de la semilla para que estén disponibles al momento de la hidratación y por tanto sean rápidamente traducidos a proteínas que participan activamente en la germinación. Tal es el caso de enzimas esenciales para el metabolismo intermedio y las proteínas necesarias para que la germinación sea exitosa y culmine con la protrusión de la radícula (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). La forma como los mensajes almacenados mantienen su integridad en la semilla seca no se conoce, aunque en algunos sistemas se ha reportado que están asociadas a complejos proteicos formando ribonucleoproteínas (Bewley, 1997). Una posibilidad alternativa es que los transcritos almacenados permanezcan secuestrados dentro del núcleo (Bewley, 1997). A medida que la germinación procede, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de nuevos transcritos (Bewley, 1982).

Resumiendo, diversos estudios demuestran que durante la primeras horas de germinación se detectan cambios cualitativos en los patrones de proteínas (Aspart *et al.*, 1984; Lin *et al.*, 1984;

Sanchez-Martinez *et al.*, 1986; Reuzeau *et al.*, 1992, Reuzeau y Cavalié, 1997). A pesar del gran numero de enfoques seguidos en los numerosos estudios realizados sobre la síntesis de proteínas en la germinación, no se han encontrado proteínas que sean marcadores específicos de la germinación (Bewley, 1997).

La síntesis de proteínas dependiente de transcripción de *novo* parece ser un fenómeno particular de los cereales, pero no de la germinación en *Arabidopsis*. En esta especie, la síntesis de proteínas que acompaña a la germinación utiliza mensajeros almacenados en la semilla (Gallardo *et al.*, 2002).

Existen estudios que muestran que paralelo a la síntesis de proteínas hay alteraciones en el contenido y calidad del RNA total, rRNA o en mRNAs específicos (Brocklehurst y Fraser, 1980; Thompson *et al.*, 1987; Reuzeau y Cavalié, 1997). Además, la enzima nucleotidil transferasa que repara el tRNA incrementa su actividad. Esta síntesis continua de RNA depende de precursores ribonucleótidos trifosfatados (ATP, CTP, GTP y UTP), que como antes se dijo, están presentes en muy bajas cantidades en el embrión seco, pero se incrementan rápidamente a medida que la hidratación procede (Reuzeau y Cavalié, 1997). Otros estudios han reportado numerosos mRNAs germinación-específicos sintetizados *de novo*, que codifican a enzimas que participan en la movilización y conversión de reservas almacenadas; lo cual es un evento post-germinativo importante durante el establecimiento y crecimiento de las plantas, pero no en la germinación *per se* (Bewley 1997).

A pesar de que los cambios en la población de mRNA en el embrión y la síntesis de proteínas ocurre durante la germinación de muchas especies de monocotiledóneas (e.g, maíz; Sánchez-Martinez *et al.*, 1986), de dicotiledóneas (e.g., chicharos; Lalonde y Bewley, 1986), y coníferas (Mullen *et al.*, 1996), la importancia de estas nuevas proteínas sintetizadas hacia el término de la germinación permanece sin ser dilucidada (Bewley, 1997).

### *Síntesis de DNA*

En etapas tempranas de la germinación se inicia la síntesis de DNA, esta síntesis es principalmente de tipo reparativo, en la cual se sustituye el DNA nuclear y organelar dañado durante la maduración, la deshidratación y el almacenamiento de las semillas (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986). Dado que no hay un cambio significativo en el contenido de DNA total de los

embriones durante la germinación, se sugiere que el número de nuevas células, resultado de división celular, es pequeño comparado con el número total de células dentro del embrión (Logan *et al.*, 2001).

### *Culminación de la germinación*

Con algunas excepciones, la protrusión de la radícula a través de las estructuras circundantes del embrión es el evento que marca el término de la germinación y el inicio del crecimiento de la plántula. Esta protrusión, puede ser o no acompañada por división celular (Zlatnova *et al.*, 1987; Osborne, 1980; Bewley, 1997).

No se sabe cuales son los eventos específicos necesarios para que comience la protrusión, pero se ha sugerido que puede ser uno o la combinación de los siguientes: (1) disminución del potencial osmótico en las células de la radícula como resultado de la acumulación de solutos de forma tal que se incrementa la absorción de agua, presentandose un incremento en la presión de turgencia y esto promueve la elongación celular; (2) otra forma de promover el incremento en la absorción de agua es la relajación de las paredes celulares de la radícula mediante las enzimas que participan en el metabolismo de pared celular, lo cual también resulta en elongación del tejido ó bien (3) las estructuras que rodean a la radícula se debilitan por hidrólisis.

## **LA GERMINACIÓN NECESITA DE LA EXPRESIÓN DE NUEVOS GENES**

A continuación se describen tres tipos de semillas en los que se ha demostrado que la germinación *sensu stricto* requiere de la expresión de genes específicos de la germinación y uno en el que la transcripción solo determina la velocidad de germinación.

En embriones de trigo y en ejes embrionarios de maíz la germinación es fuertemente inhibida en presencia del inhibidor transcripcional  $\alpha$ -amanitina (Jendrisak, 1980). La  $\alpha$ -amanitina inhibe específicamente la síntesis de RNA catalizada por la RNA polimerasa II dependiente de DNA tanto *in vivo* como *in vitro* (Guilfoyle y Jendrisak, 1978; Bushnell *et al.*, 2002). Lo anterior indica que la protrusión radicular en embriones de trigo y la protrusión de ejes embrionarios de maíz requiere de la transcripción *de novo* (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). En este último

estudio también demostraron que la expresión de los genes específicos de la germinación se detecta después de 6 h de imbibición. Lo anterior apoya la hipótesis de que la síntesis de proteínas en las primeras horas de germinación de maíz ocurre a partir de los mRNA sintetizados durante las fases de maduración y desecación de la semilla, pero a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas es dependiente de los transcritos sintetizados *de novo*.

Pocos son los casos en los que se han identificado genes específicos de la germinación. En *Arabidopsis thaliana*, Papi *et al* (2000) identificaron el gen *DAG1* (Dof Affecting Germination), que codifica a un factor de transcripción tipo dedo de zinc Dof, que está involucrado en el control de la latencia. Las semillas con esta mutación son no latentes y capaces de germinar en ausencia de luz. Este fenotipo y su patrón de segregación, coloca a *DAG1* como el gen que juega un nuevo e inesperado papel maternal en el control de la germinación de semillas. Otro caso es el reportado en girasoles (*Helianthus annuus L.*), donde se encontró que la mayoría de los polipéptidos se sintetizan después de las 6 h de imbibición, entre las funciones que se propone que estas proteínas realizan en la germinación se encuentran: mantener la organización celular, reparar el daño de las macromoléculas y de las estructuras, movilizar reservas, chaperonas moleculares o señalar (Reuzeau y Cavalié 1997). Asimismo, las isoformas de actina y la expresión de su mRNA son inducidas durante la germinación de semillas de maíz, sugiriendo que la expresión de estas isoformas está fuertemente regulada en las etapas tempranas de germinación y crecimiento de la planta (Díaz-Camino *et al.*, 2005).

Por otra parte, en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), el embrión se encuentra dentro de un rígido endospermo y por tanto presentan una resistencia física a la protrusión radicular. Por lo que se requiere la suavización del endospermo para que permita la protrusión de la radícula. Durante la germinación se expresan los genes de las enzimas necesarias para que esta hidrólisis se realice. Así, se ha documentado que durante la germinación de tomate se expresan los genes que disminuyen esta resistencia. Los productos de estos genes están encargados de hidrolizar el manano depositado en las paredes celulares del endospermo. Además, otras enzimas, incluyendo manosidasas, galactosidasas, celulasas, pectin-metilesterasas, poligalacturonasas, arabinosidasas, xiloglucan endotransglicosidasa,  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas, son expresadas durante la germinación de la semillas de tomate (Downie *et al.*, 1998; Sitrit *et al.*, 1999; Bradford *et al.*, 2000). También se ha sugerido que la enzima poligalacturonasa está involucrada en la pérdida de rigidez de la pared celular del



endospermo, evento necesario para la protrusión de radícula de las semillas de tomate y el posterior crecimiento de la plántula (Sitrit *et al.*, 1999). También en tomate, han sido identificados al menos tres genes de expansinas que son expresadas en las semillas durante su germinación (Chen y Bradford, 2000).

De lo anterior se concluye que la germinación es un proceso complejo que requiere de la expresión coordinada de numerosos genes en diferentes tejidos de la semilla. Las proteínas codificadas por estos genes se expresan en diversos tejidos y están involucradas en múltiples procesos celulares como la replicación, la transcripción, la traducción, el metabolismo y los mecanismos de defensa (Bewley y Black, 1994; Gallardo *et al.*, 2002; Rajjou *et al.*, 2004). Debido a esta variedad de funciones se espera que estos genes sean regulados tanto espacial como temporalmente (Potokina *et al.*, 2002). En esta regulación coordinada participan señales internas y externas. Entre las primeras tenemos a los fitorreguladores giberelinas (GA) y ácido abscísico (ABA). El GA induce la germinación, mientras que ABA produce un efecto antagonista al del GA (Karssen *et al.*, 1989; Ritchie and Gilroy, 1998). En cuanto a las señales externas, están la temperatura, la humedad, el oxígeno y otros factores ambientales (Ullah *et al.*, 2002).

## **HIPÓTESIS**

---

Si la germinación requiere de la expresión de genes, entonces, algunos de los genes que se expresen diferencialmente entre semillas germinadas y semillas sin germinar serán germinación-específicos, mientras que el resto serán parte del metabolismo intrínseco celular.

## **OBJETIVOS**

---

### **GENERAL**

- Identificar genes cuya expresión se induzca durante la germinación de semillas de maíz.

### **PARTICULARES**

- Identificar y clonar los fragmentos de cDNA expresados sólo en embriones germinados de maíz.
- Buscar la posible identidad de los genes expresados durante la germinación.
- Corroborar la expresión diferencial de los genes en estudio durante la germinación de semillas de maíz.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron semillas de maíz HS2, proporcionadas por el Dr. Aquiles Carballo C. del Instituto de Recursos Genéticos, Colegio de Post-graduados.

### **CURVA DE IMBIBICIÓN.**

Se pesaron 10 semillas secas de maíz, las cuales se colocaron en una caja petri conteniendo una capa de papel filtro y 10 ml de agua destilada. Cada 2 h y durante 40 h, las semillas se secaron superficialmente con toallas absorbentes y se pesaron para determinar la cantidad de agua absorbida por gramo de semilla seca. Esta determinación se hizo por triplicado. Los datos obtenidos se graficaron y se determinaron los tiempos previos a la protrusión de la radícula.

### **GERMINACIÓN DE SEMILLAS:**

Las semillas de maíz se desinfectaron superficialmente por 2 min con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v). Posteriormente se enjuagaron hasta eliminar completamente el olor a cloro. Enseguida, las semillas desinfectadas se acomodaron en toallas absorbentes húmedas con 25 semillas cada una y se envolvieron en forma de taco; estos se colocaron en charolas que contenían rejillas y un poco de agua en el fondo, de manera que el agua no estuviera en contacto directo con las semillas. Las charolas fueron cerradas herméticamente y puestas en una incubadora a 30 °C por los tiempos establecidos para obtener la curva de imbibición.

### **OBTENCIÓN DEL EMBRIÓN:**

A cada lote de semillas (incluyendo el tiempo cero o no germinadas) se les extrajo el embrión. En el proceso se retiró tanto la testa que rodea a la semilla como el almidón que circunda al embrión.

Las semillas sin germinar (tiempo cero), constituyeron el primer tratamiento, el segundo tratamiento fue formado por el conjunto de lotes de semillas germinadas a diferentes tiempos, 4, 12, 18 y 21 h, el cual se denominó "mezcla de germinación". Considerando que 30 embriones representan 1 gramo en peso seco, se utilizaron 6 gramos de embriones de semillas

germinadas (mezcla de germinación) y 6 gramos de embriones no germinados para hacer las extracciones de RNA.

### **EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL:**

La extracción de RNA total se realizó de semillas sin germinar y de la mezcla de germinación por separado siguiendo la metodología que se muestra a continuación:

Se etiquetaron cinco tubos Corex de 25 ml estériles como I, II, III, IV y V y en cada uno se colocaron las siguientes soluciones:

Tubo I: 10 ml de buffer de extracción (urea 7 M, SDS 1%), 10 ml de PCI (Fenol (pH 7): cloroformo: alcohol isoamílico, 50:49:1, v:v:v), y  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%

Tubo II: 15 ml PCI

Tubo III: 10 ml PCI

Tubo IV: 15 ml de cloroformo

Tubo V: 2 ml de acetato de amonio (10 M)

Los embriones de cada tratamiento fueron pulverizados en un mortero, previamente lavado con ácido sulfúrico, esterilizado y enfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; el tejido se pulverizó adicionando nitrógeno líquido. El polvo de embrión congelado se vertió en el tubo I y se agitó vigorosamente en el vortex durante 2 min hasta dispersarlo. El SDS del buffer de extracción solubiliza las membranas y la urea desnaturaliza las proteínas. Enseguida se centrifugó el tubo durante 15 min a 3000 g a temperatura ambiente para eliminar los restos celulares. La fase acuosa se colectó en el tubo II y se agitó vigorosamente en el vortex por 2 min. Se centrifugó durante 10 min a 3000 g a temperatura ambiente. Esta extracción con PCI eliminó las proteínas de la interfase y los carbohidratos. La fase acuosa se transfirió al tubo III, y se agitó por 2 min en el vortex, las fases se separaron por centrifugación a 3000 g por 10 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se colocó en el tubo IV, el cual se agitó vigorosamente por 2 min. Se centrifugó a 3000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Esta extracción con cloroformo se llevó a cabo para eliminar proteínas. Posteriormente, la fase acuosa se colectó y se puso en el tubo V, en donde se agregó un volumen de isopropanol, se agitó suavemente por inversión y se incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 30 min. a 3000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Con este tratamiento se precipitaron los ácido nucleicos. El sobrenadante se descartó y la

pastilla se escurrió y se resuspendió en 3 ml de agua DEPC (Dietil pirocarbonato), se apartaron 10  $\mu$ L para correr un gel en donde se observó la integridad del RNA. Al resto de la solución se le agregaron 3 ml de cloruro de litio 8 M para solubilizar preferencialmente el DNA y precipitar el RNA, y se mantuvo a -20 °C durante 2 h. Después se centrifugó a 3000 g durante 30 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de agua-DEPC y se adicionó 1/3 de volumen de acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló muy bien y se incubó toda la noche a -20 °C. Transcurrido este periodo de tiempo, se centrifugó por 20 min a 4000 g a 4 °C, la pastilla formada se lavó con 2 ml de etanol al 70%, se transfirió a tubos eppendorf de 1 ml estériles y se centrifugó en la microfuga por 5 min a 17000 g. Se eliminó completamente el etanol y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua-DEPC. Finalmente se hizo un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes con 900  $\bar{l}$  de formaldehído al 37% por cada 30 ml de TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM) teñido con bromuro de etidio, para observar la integridad y purificación del RNA. El RNA se almacenó a -70 °C hasta su uso .

### **AISLAMIENTO DE mRNA POLI A<sup>+</sup>.**

Para el aislamiento del mRNA se siguió el protocolo PolyATtract® mRNA Isolation Systems III and IV (Promega).

En un tubo eppendorf estéril se colocó 1 mg de RNA total y el volumen se ajustó a 500  $\bar{l}$  con agua libre de RNasas. Este tubo se incubó a 65° C durante 10 min para posteriormente adicionar 3  $\bar{l}$  de Oligo(dT) biotinilado y 13  $\bar{l}$  de SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M, pH 7). Se mezcló suavemente y se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se enfrió completamente. Por otra parte, se prepararon los tubos que contenían las partículas paramagnéticas de estreptavidina (SA-PMPs); estas se resuspendieron con golpes suaves en el fondo del tubo hasta que quedaron completamente dispersas. Las SA-PMPs fueron capturadas colocando el tubo en una base magnética. El sobrenadante se removió cuidadosamente y las SA-PMPs se lavaron tres veces con SSC 0.5X (300  $\bar{l}$  por lavado), después de cada lavado, se capturaron las partículas y se retiró el sobrenadante cuidadosamente evitando tocar las SA-PMPs. Al terminar los lavados se añadieron 100  $\bar{l}$  de SSC 0.5X a las SA-PMPs. A estos tubos se les adicionó la reacción de RNA y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, mezclando por inversión cada 2 min. Usando la base magnética, se capturaron las partículas y se removió el sobrenadante (el cual se desecha

porque corresponde al RNA ribosomal). Las partículas fueron lavadas cuatro veces con 300  $\mu$ l de SSC 0.1X cada vez, dando pequeños golpes al tubo para resuspenderlas completamente; al terminar cada lavado se capturaron las partículas y se eliminaron los sobrenadantes. El pellet final de SA-PMPs se resuspendió cuidadosamente en 100  $\mu$ l de agua libre de RNasas para liberar la fracción de mRNA. Este se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se capturaron magnéticamente las partículas, el sobrenadante se colocó en otro tubo estéril. Se realizó una segunda elución con 150  $\mu$ l de agua libre de RNasas. El volumen final de mRNA obtenido fue de 250  $\mu$ l.

El mRNA se precipitó con 3  $\mu$ g de glucógeno, 100  $\mu$ l de acetato de amonio 10 M y 500  $\mu$ l de etanol absoluto y se incubó por un tiempo mínimo de 6 h a -20 °C. Una vez precipitado el mRNA, se centrifugó a 17000 g por 30 min y la pastilla resultante se resuspendió en 15  $\mu$ l de agua libre de RNasas, se tomaron 2  $\mu$ l para cuantificarlo en un espectrofotómetro a 260 nm y 3  $\mu$ l para observar el mRNA en un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes y teñido con bromuro de etidio.

## **SÍNTESIS DE LA PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE CDNA.**

### ***Primera Cadena:***

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se adicionaron 1  $\mu$ g de mRNA (poli A<sup>+</sup>), 1  $\mu$ l de oligo dT (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y agua c.b.p. 12  $\mu$ l. Se calentó a 70 °C por 10 min y se puso en hielo inmediatamente, se colectó el contenido dando un pulso en la microcentrifuga y se agregaron 4  $\mu$ l de buffer 5X de primera cadena (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2  $\mu$ l de DTT 0.1 M y 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, esta reacción se incubó durante 2 min a 42 °C y se le añadieron 200 unidades de Transcriptasa Reversa (GIBCO). Se mezcló perfectamente y se incubó a 42 °C por 2 h. Pasadas las 2 h, se incubó 5 min a 95° C para inactivar a la Transcriptasa Reversa y se centrifugó a máxima velocidad para colectar el condensado.

### ***Segunda Cadena:***

A la mezcla de reacción que contenía la primera cadena de cDNA, se le adicionaron 15  $\mu$ l de buffer de cDNA 10X (Tris-HCl 350 mM, pH 7.4; MgCl<sub>2</sub> 40 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM; DTT 30 mM), 3.5  $\mu$ l de DNA polimerasa I (10 U/ $\mu$ l), 1.5  $\mu$ l de RNasa H (200 U/ $\mu$ l), 1.0  $\mu$ l de dNTPs (25 mM) y 109  $\mu$ l H<sub>2</sub>O estéril. El tubo se incubó a 16 °C durante 2 h. Después, se adicionaron 1  $\mu$ g de glucógeno, 350  $\mu$ l de agua libre de RNasas y 500  $\mu$ l de PCI, se agitó vigorosamente y se

centrifugó a 17000 g durante 10 min, la fase acuosa se colectó en un tubo eppendorf estéril y se le agregaron 1/3 de volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol y se dejó precipitando a -20 °C. Finalmente, se centrifugó 15 min a 17000 g y el botón resultante se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 17000 g y se eliminó completamente el etanol, la pastilla se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua libre de RNasas. Se tomaron 3  $\mu$ l para hacer una electroforesis en gel de agarosa y verificar la síntesis de cDNA.

## **cDNA-AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLIMORPHISM)**

### ***Digestión-Ligación de adaptadores.***

Para la digestión, se tomó 1  $\mu$ g de cDNA correspondiente a las semillas sin germinar y a las semillas germinadas, cada muestra se colocó en un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 8  $\mu$ l de buffer de digestión/ligación (Tris acetato 50 mM, pH 7.5; acetato de magnesio 50 mM; acetato de potasio 250 mM), 5 unidades de *EcoRI*, 5 unidades de *MseI* y agua suficiente para alcanzar un volumen final de 40  $\mu$ l, la mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 3 h para llevar a cabo la digestión. Transcurrido este tiempo, se hizo el ligado de los adaptadores de la siguiente manera: se añadió al tubo con el DNA digerido 1  $\mu$ l del adaptador específico de *EcoRI* (ML35), 1  $\mu$ l del adaptador específico de *MseI* (ML33), 1  $\mu$ l de ATP, 4  $\mu$ l de buffer de digestión/ligación, 1 unidad de T4 DNA ligasa (Invitrogen) y finalmente agua DEPC para llevar a un volumen final de 50  $\mu$ l. Esta reacción se incubó a 37 °C durante toda la noche.

### ***Preamplificación.***

Para la preamplificación por PCR se usó como molde el cDNA con los adaptadores ligados de semillas sin germinar y de la mezcla de germinación. En cada reacción para PCR se adicionó lo siguiente:

- 1  $\mu$ l cDNA+ adaptadores
- 0.5  $\mu$ l cebador *EcoRI* estructural + adaptador (ML37)
- 0.5  $\mu$ l cebador *MseI* estructural + adaptador (ML38)
- 0.8  $\mu$ l dNTPs (25 mM)
- 2  $\mu$ l buffer de reacción 10X (Invitrogen)
- 0.6  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 1  $\mu$ l Taq DNA Polimerasa (5U/ $\mu$ l, Invitrogen)
- 13.6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

El volumen final obtenido en cada tubo fue de 20  $\mu$ l. El programa del termociclador que se siguió fue el siguiente:

Desnaturalización	2 min	94 °C	1 ciclo
Desnaturalización	30 s	94 °C	} 25 ciclos
Unión de cebadores al molde 1 min	56 °C		
Alargamiento	1 min	72 °C	
Alargamiento	2 min	72 °C	1 ciclo

Para verificar la unión de los adaptadores y que las concentraciones de los cDNAs del tiempo cero y de la mezcla de germinación fueran equivalentes, al terminar la reacción de PCR se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se cargaron 10  $\mu$ l de cada una de las reacciones de PCR más 3  $\mu$ l de buffer de carga TAE 3X (glicerol 60%; azul de bromofenol 1 mg/ml; Xylen cyanol 1 mg/ml).

#### **Marcaje de cebadores.**

Para realizar los AFLPs se marcó radiactivamente el oligonucleótido *Eco* (cualquiera de las opciones ML42 al ML61, ver apéndice). El marcaje se realizó agregando a un tubo eppendorf estéril 10  $\mu$ l del cebador *Eco*, 5  $\mu$ l de buffer de reacción Forward 5X (Tris-HCl 350 mM, pH 7.6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; KCl 500 mM; 2-mercaptoetanol 5 mM; Invitrogen), 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -ATP-<sup>33</sup>P (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de T4 Polinucleótido cinasa (10 U/ $\mu$ l, Invitrogen) y 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 1 h, luego a 70 °C durante 10 min para inactivar a la enzima Polinucleótido cinasa y se guardó a -20 °C hasta su uso.

#### **Amplificación AFLP-PCR**

Las muestras obtenidas de la preamplificación se diluyeron 1:10 con H<sub>2</sub>O estéril, y se usaron como templado para la reacción de PCR, que se preparó agregando los siguientes reactivos:



2 $\mu$ l	cDNA preamplificado (diluído 1:10)
0.25 $\mu$ l	Cebador <i>EcoRI</i> - <sup>33</sup> P
0.3 $\mu$ l	Cebador <i>MseI</i> (cualquiera de las 15 opciones ML 62 a ML 76, ver apéndice)
0.4 $\mu$ l	dNTPs (5 mM)
1 $\mu$ l	Buffer de reacción 10X (Invitrogen)
0.3 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0.1 $\mu$ l	Taq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ l)
5.65 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Se obtuvo un volumen final de 10  $\mu$ l en cada reacción. Los componentes se mezclaron perfectamente y se hizo la reacción de PCR bajando gradualmente la temperatura para facilitar la unión de todos los cebadores al cDNA, ya que las temperaturas de desnaturalización y unión son diferentes para cada cebador (Touchdown PCR). Se siguió el siguiente protocolo:

Desnaturalización	2 min 94 °C	}	1 ciclo
Desnaturalización	30 s 94 °C		
Unión de cebadores al molde 30 s	65 °C a 57 °C (bajando 0.7 °C en cada ciclo)	}	12 ciclos
Alargamiento	1 min 72 °C		
Desnaturalización	30 s 94 °C		
Unión de cebadores al molde 30 s	56°C	}	35 ciclos
Alargamiento	1 min 72 °C		
Alargamiento	2 min 72 °C		
			1 ciclo

La finalidad de usar diferentes combinaciones de oligonucleótidos es generar un número mayor de fragmentos de cDNA y poder hacer un estudio más completo.

### **Desnaturalización de los cDNAs**

Una vez terminada la reacción del AFLP-PCR, se agregaron a cada tubo de reacción 10  $\mu$ l de buffer de secuenciación (formamida 98%, xilen-cianol 0.025%, azul de bromofenol 0.025% y

Tris-borato 450 mM) y se incubó a 94 °C durante 10 min, inmediatamente después las muestras se pusieron en hielo para evitar la renaturalización del cDNA.

### ***Electroforesis para los productos del PCR-AFLP***

Los productos desnaturalizados del PCR-AFLP se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El gel se preparó en vidrios de 35 X 45 cm y separadores de 0.3 mm. Los vidrios se limpiaron con etanol al 70% hasta que quedaron perfectamente limpios. Para preparar el gel se mezclaron en un vaso de precipitado, 60 ml de acrilamida al 5% , 150  $\bar{l}$  de persulfato de amonio al 10% preparado al momento de utilizarlo, y 40  $\bar{l}$  de TEMED (BIORAD), la mezcla se agitó magnéticamente durante 1 min. La mezcla del gel se adicionó entre los vidrios poco a poco pero con flujo constante tratando de no formar burbujas. El peine se colocó en la parte superior y se dejó polimerizando horizontalmente durante 1 h a temperatura ambiente para luego guardarlo a 4 °C durante toda la noche para que polimerizara completamente.

Una vez polimerizado, el gel se montó en la cámara para electroforesis modelo S2 de Life Technologies™, y se pre-corrió por 1 h a 3000 Volts, usando TBE 0.5X (Tris-base 44.5 mM; ácido bórico 44.5 mM; EDTA 1 mM) como buffer de corrida. Después, los productos del AFLP-PCR desnaturalizados se cargaron en el gel, alternando una reacción de semillas secas y una reacción de semillas germinadas, tratadas ambas con la misma combinación de oligonucleótidos. Se corrió aproximadamente por 2.5 h a 3000 Volts. Terminada la electroforesis, el gel se colocó en papel filtro Whatman 3MM, se cubrió con plástico adherente y se secó a 80 °C por 2 h en un secador Hoefer, GD2000.

El gel seco fue expuesto a una película Kodak MS de 3 a 7 días a -20 °C. Transcurrido este tiempo, se reveló la película, obteniéndose de esta manera la imagen de los AFLPs.

### **PURIFICACIÓN DE cDNAs DEL GEL DE POLIACRILAMIDA**

Una vez obtenido el AFLP, los patrones de expresión entre el cDNA de semillas secas y semillas germinadas fueron comparados, se tomó registro de las bandas que presentaban cambios y la combinación de cebadores con las que se produjeron.

Se seleccionaron aquellas bandas que se expresaban sólo en el carril de los embriones germinados. Los fragmentos se recuperaron de la siguiente forma: la película revelada se sobrepuso al gel dejándolos exactamente alineados. Con una navaja se cortó la banda seleccionada sobre la película, cortando al mismo tiempo el gel y el papel en el que se encontraba el gel. La banda se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se le agregaron 100  $\mu$ l de agua destilada, se dejó reposar el tubo durante 15 min a temperatura ambiente. El tubo se tapó con parafilm M y se calentó a 95  $^{\circ}$ C por 15 min, luego se centrifugó a 17000 g por 15 min. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 1  $\mu$ l de glucógeno (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1/3 de volumen de acetato de amonio (10 M) y dos volúmenes de etanol, y se dejó precipitando toda la noche a -20  $^{\circ}$ C. Finalmente, se centrifugó 15 min a 17000 g a 4  $^{\circ}$ C y el botón resultante se resuspendió en 10  $\mu$ l de agua destilada estéril.

### **AMPLIFICACIÓN DE cDNAs RECUPERADOS DEL GEL DE POLIACRILAMIDA**

Los fragmentos de cDNA recuperados de los geles de AFLPs fueron amplificados mediante PCR empleando la siguiente mezcla de reacción:

2 $\mu$ l	cDNA preamplificado
0.25 $\mu$ l	Cebador <i>Eco</i> RI (cualquiera de las 15 opciones ML 62 a ML 76, ver apéndice A)
0.3 $\mu$ l	Cebador <i>Mse</i> I (cualquiera de las 14 opciones ML 42 a ML 55, ver apéndice A)
0.4 $\mu$ l	dNTPs (5 mM)
1 $\mu$ l	Buffer de reacción 10X (Invitrogen)
0.3 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0.1 $\mu$ l	Taq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ l)
5.65 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Y las siguientes condiciones de amplificación (las mismas usadas para AFLP-PCR):

Desnaturalización	2 min	94 °C	1 ciclo
Desnaturalización	30 s	94 °C	} 12 ciclos
Unión de cebadores al molde 30 s	65 °C a 57 °C	(bajando 0.7 °C en cada ciclo)	
Alargamiento	1 min	72 °C	
Desnaturalización	30 s	94 °C	} 35 ciclos
Unión de cebadores al molde 30 s	56 °C		
Alargamiento	1 min	72 °C	
Alargamiento	2 min	72 °C	1 ciclo

Al terminar la reacción de PCR se corrieron las reacciones completas en un gel de agarosa al 1.2% para verificar los productos de las amplificaciones; las bandas observadas se cortaron del gel con navaja y se purificaron.

## **PURIFICACIÓN DE LOS cDNAs AMPLIFICADOS DEL GEL DE AGAROSA.**

A un tubo eppendorf de 0.5 ml se le hicieron tres orificios con un alfiler caliente y se le metió un tapón de fibra de vidrio hasta el fondo, el pedazo de gel de agarosa se colocó dentro del tubo que a su vez estaba metido en otro tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Se centrifugó a 10000 g por 7 min y el filtrado se recuperó y se guardó en otro tubo estéril de 1.5 ml, se volvió a centrifugar, los filtrados se juntaron y se les adicionaron 3  $\mu$ l de glucogeno (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1/3 de volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol. Se incubó a -20 °C por un tiempo mínimo de 2 h y se centrifugó durante 15 min a 10000 g. El botón obtenido se resuspendió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O para asegurarnos de que la recuperación se realizó correctamente, se tomaron 3  $\mu$ l del cDNA purificado para correrlo en un gel de agarosa al 1.5% con 3  $\mu$ l de TAE 3X (glicerol 60%, azul de bromofenol 1 mg/ml y Xilen-cinanol 1 mg/ml).

## **TRANSFORMACIÓN**

### ***Células competentes***

Para preparar las células competentes DH5-<sup>®</sup>, que se utilizaron para la transformación, primero se inoculó una colonia de *Escherichia coli* en un matraz con 50 ml de medio LB, y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación (250 rpm). Al siguiente día, 4 ml de este cultivo se

inocularon en 400 ml de medio LB contenido en un matraz de 2 L y se leyó su absorbancia a 590 nm. Como blanco se usó 1 ml de medio LB estéril. El medio se incubó a 37 °C a 250 rpm para permitir que las células continuaran creciendo hasta obtener una densidad óptica de 0.375 a 590 nm. Una vez que el cultivo alcanzó este valor, se distribuyó en 4 tubos estériles y se incubó en hielo de 5 a 10 min, posteriormente, se centrifugó a 1000 g por 5 min a 4 °C, El botón resultante se resuspendió cuidadosamente en 20 ml de solución fría de CaCl<sub>2</sub> y se volvió a centrifugar durante 5 min a 1000 g a 4 °C. Esta vez la pastilla se resuspendió en 80 ml de solución fría de CaCl<sub>2</sub> y se mantuvo en hielo por 30 min, luego se centrifugó a 1000 g, por 5 min a 4 °C y el botón resultante se resuspendió en 5 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> fría. Finalmente se hicieron alícuotas de 100  $\mu$ l de células y se almacenaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml; se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

### ***Clonación de los cDNAs recuperados***

Los cDNAs recuperados se clonaron en el vector T/A pGEM-T-Easy (Promega; Apéndice C) de la siguiente manera: 3  $\mu$ l del cDNA purificado se colocaron en un tubo de 1.5 ml estéril y se adicionaron 1  $\mu$ l del vector (50 ng), 1  $\mu$ l de ligasa, 5  $\mu$ l de Buffer de rápida ligación 2X (Tris-HCl 60 mM; MgCl<sub>2</sub> 20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM; polietilen glicol 10%), y 1  $\mu$ l de agua para obtener un volumen final de 10  $\mu$ l. La reacción de ligado del cDNA al vector se incubó a temperatura ambiente por 4 h.

El vector pGEM-T-Easy, permite a las bacterias crecer en un medio selectivo con ampicilina, además, el vector tiene la parte del gen que codifica para el extremo amino de la  $\beta$ -galactosidasa (gen *LacZ*) que al insertarse en células que codifican para el extremo carboxilo de la  $\beta$ -galactosidasa, logran que la enzima se complemente y tome su forma activa. Dentro de la secuencia que codifica el extremo amino, se encuentra el sitio múltiple de clonación, en el cual se inserta el DNA de interés, provocando que el gen se interrumpa y la enzima no tenga actividad. Es decir, las células que hayan adquirido el vector con el DNA de interés insertado, que al crecer en un medio que contenga X-Gal (un análogo de la lactosa; 100 mg/ml), no tendrán coloración, mientras que aquellas que hayan adquirido el vector vacío, tendrán la enzima activa y serán capaces de hidrolizar al X-Gal, que al precipitarse da una coloración azul. De este modo se eligen las colonias blancas porque son las que tienen el DNA de interés. Este proceso se lleva a cabo en presencia de IPTG (100  $\mu$ M), que es un inductor de la transcripción del promotor del operón de la lactosa.

### **Transformación**

Un tubo con células competentes DH5-®, se descongeló en hielo por espacio de 30 min, en la campana de flujo laminar. A las células se les agregó la reacción de ligado. Inmediatamente se colocaron en hielo durante 20 min y luego a 42°C por 45 segundos y finalmente en hielo por 2 min más. Posteriormente agregamos 400  $\mu$ l de solución SOC (LB + glucosa 1 M) y se incubó al menos por 1 h a 37 °C con agitación (250 rpm). Terminado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron por 20 segundos, 200  $\mu$ l del sobrenadante se desecharon y con el resto se resuspendió el botón y se plaqueó en una caja petri con medio LB sólido (LB-agar + IPTG (100 mM) + X-gal (100 mg/ml) + ampicilina (100 mg/ml), se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se seleccionaron las bacterias que contenían el plásmido recombinante (colonias blancas), las cuales se picaron con asa bacteriológica y se inocularon en tubos que contenían 6 ml de medio LB líquido y 6  $\mu$ l de ampicilina (100 mg/ml) y se dejaron creciendo toda la noche a 37 °C con agitación.

### **Purificación del DNA plasmídico**

Para hacer la purificación de DNA plasmídico utilizamos el protocolo Genelute Plasmid mini-prep Kit (SIGMA).

Del tubo con células transformadas en medio LB con ampicilina, se tomó 1 ml y se puso en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se centrifugó a 15000 g por 2 min, se desechó el sobrenadante y se agregó otro ml del cultivo de células y se volvió a centrifugar, esto se repitió con el resto del cultivo. El botón obtenido de células se resuspendió por pipeteo en 200  $\mu$ l de *Solución de Resuspensión*, y se añadieron 200  $\mu$ l de *Solución de Lisis*, el tubo se invirtió suavemente 5 veces para mezclar bien y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, después se añadieron 350  $\mu$ l de *Solución de Neutralización* y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Se centrifugó por 10 min a 15000 g. Por otro lado, al mismo tiempo se prepararon las columnas de purificación añadiendo 500  $\mu$ l de solución para preparar columnas a la columna de purificación y se centrifugó durante 1 minuto a 15000 g.

Las células lisadas se transfirieron a la columna y se centrifugaron 1 minuto a 15000 g, el sobrenadante se descartó. Después se adicionaron a la columna 500  $\mu$ l de *Solución de Lavado* y se centrifugó a 15000 g por 2 min. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo colector limpio y se añadieron 50  $\mu$ l de *Solución de Elución* y se centrifugó 1 minuto a 15000 g. El plásmido purificado se almacenó a -20 °C.

### ***Digestión del plásmido con EcoRI***

La digestión del DNA plasmídico con *EcoRI* se realizó para verificar que nuestro inserto estuviera presente dentro del vector. Se usó *EcoRI* debido a que el plásmido contiene un sitio de corte para esta enzima cerca del sitio de clonación múltiple donde se insertaron los fragmentos de cDNA provenientes del cDNA-AFLPs.

En un tubo estéril se colocaron 5  $\mu$ l del DNA plasmídico purificado y se agregaron 0.5  $\mu$ l de *EcoRI*, 1  $\mu$ l de Reactivo 3 10x y 3.5  $\mu$ l de agua estéril. La mezcla se incubó a 37 °C por 2 h. Posteriormente, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en el cual se corrieron las reacciones de digestión.

### **SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS**

Los DNAs plasmídicos purificados se liofilizaron para concentrarlos y se resuspendieron en 20  $\mu$ l de agua estéril para posteriormente cuantificarlos en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm, como blanco se usó agua. La secuenciación se hizo a partir de 300 ng/ $\mu$ l de plásmido utilizando el cebador T7 y se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

### **ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

El análisis de las secuencias se realizó con ayuda del programa Vector NTT 7.0. Las secuencias editadas fueron comparadas con una base de datos por medio del programa BLAST disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; las secuencias obtenidas fueron entonces alineadas utilizando el algoritmo CLUSTAL-W. La traducción a proteína de las secuencias se realizó con el algoritmo SIXFRAME, ambos disponibles en la página web <http://workbench.sdsc.edu>.

Para amplificar cada una de las secuencias identificadas por RT-PCR fue necesario diseñar oligonucleótidos para cada una de dichas secuencias. Para ello se realizó una búsqueda en el banco de genes de secuencias protéicas (GenBank) que tuvieran altos niveles de similitud con nuestra secuencia (E $\alpha$  0.001). De aquellas secuencias altamente similares se obtuvo la

secuencia nucleotídica. Tanto a nivel de residuos de aminoácidos como a nivel de nucleótidos se hicieron alineamientos haciendo uso del algoritmo CLUSTAL-W (<http://workbench.sdsc.edu>).

## DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Debido a que el tamaño de las secuencias encontradas fue pequeño, en los casos en los que nuestros fragmentos de genes se pudieron alinear perfectamente con secuencias ya reportadas de maíz, se decidió añadir de 10 a 20 nucleótidos de la secuencia ya reportada para diseñar los oligonucleótidos. Los nucleótidos elegidos para ser parte de los iniciadores se analizaron en programa Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com>).

En la tabla A se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los fragmentos de cDNA-AFLP que mostraron un alto porcentaje de identidad con proteínas ya reportadas en las bases de datos.

**Tabla A.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar por RT-PCR los fragmentos de cDNA-AFLP. Tm: temperatura de alineamiento.

	Secuencia	Tm (°C)
<b>cDNA 12</b>		
Oligonucleótido Sentido	5' GTG TGA GGA ATT CGG GCA AGG AAG GAG 3'	62.8
Oligonucleótido Antisentido	5' CCA ACA TCT TCA GGG TTA AAT CCA TGT GGA G 3'	60.6
<b>cDNA 17</b>		
Oligonucleótido Sentido	5' GCT ATA AAA AAC AAC TGG TGA TAG GAG GCG ACG AC 3'	62.6
Oligonucleótido Antisentido	5' CGA TTG AGG TGG GCT TTA TCC CAG CGC CGA C 3'	68.1
<b>cDNA 26</b>		
Oligonucleótido Sentido	5' TTA CAA GGA ACA GTC CGT CGC TTG AG 3'	60.5
Oligonucleótido Antisentido	5' GCG ACG AGG TGC TCC GTG CCA TCC 3'	68.0
<b>cDNA 30</b>		
Oligonucleótido Sentido	5' GCT CAA ACA CAT AAG CCA AAT TAA TTG CAT CAA TAG GTC 3'	61.0
Oligonucleótido Antisentido	5' GGT ATT TCT GCT GAA TTC AAT GAA GAT GAC TTG TGC 3'	60.8
<b>cDNA 48</b>		
Oligonucleótido Sentido	5' GGC AAG ATC TCA AGG ATC ATA TGC GGA AGG CTG G 3'	65.5
Oligonucleótido Antisentido	5'CGG AAC TCA GTA TCA TCC AGC TTC TTT AT 3'	59.9
<b>cDNA 52</b>		
Oligonucleótido Sentido	5' GGC CCA ACC TCC AGG AAT TCA TCG ACG AGA 3'	66.0
Oligonucleótido Antisentido	5' TCA GGC AAT CTT AAG ATG GTT CTT GGC AAG 3'	60.5



## RNA LIBRE DE DNA

El RNA total fue cuantificado y observado en un gel de agarosa al 2%. Para eliminar el DNA contaminante del RNA total, las muestras fueron tratadas con DNasa I. Para lo cual a 200  $\mu$ l de RNA total se le adicionaron los reactivos que se enlistan en la tabla B.

Tabla B. Reactivos utilizados para eliminar el DNA de las muestras de RNA total.

	Concentración Final
PCR Buffer 10x (Invitrogen)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 mM
DNasa I	500 U
Inhibidor de RNasa (RNAsin, Promega)	40 U
H <sub>2</sub> O DEPC	cbp 250 $\mu$ l

Se incubó una h a 37 °C y se extrajo con PCI (v/v), centrifugandose durante 15 min a 17000 g y se precipitó con 1/3 de volumen de acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol durante 1 h, después, se centrifugó a 17000 g por 15 min, la pastilla formada se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó 5 min a 17000 g. Los lavados se repitieron 3 veces. La pastilla final se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC. Se corrió un gel de agarosa al 2% para verificar la integridad del RNA.

## RT-PCR

Este método se realiza en dos pasos: (A) a partir del RNA total, sintetizar la primera cadena de cDNA usando la Transcriptasa Reversa (RT) y (B) hacer una PCR usando este cDNA como molde y los oligonucleótidos específicos de cada secuencia.

### **A. Síntesis de cDNA primera cadena por la Transcriptasa Reversa.**

En un tubo eppendorf estéril de 0.6 ml se adicionaron 5  $\mu$ g de RNA, 1  $\mu$ l de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu$ g/ml, Invitrogen), 1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM cada uno, Invitrogen) y agua destilada para alcanzar un volumen de 12  $\mu$ l. La reacción se calentó durante 5 min a 65 °C, se colocó rápidamente en hielo y se centrifugó para coleccionar el condensado, enseguida se agregaron 4  $\mu$ l de First-Strand Buffer 5x (Invitrogen), 2  $\mu$ l de DTT (0.1 M, Invitrogen) y 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Se mezcló bien y se incubó 2 min a 42 °C y se agregó 1  $\mu$ l (200 unidades) de la enzima Transcriptasa Reversa (SuperScript™II RT, Invitrogen), se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó a 42 °C durante 50 min.

Transcurrido este tiempo, se inactivó a la enzima a 70 °C por 15 min. Como paso adicional para proteger el cDNA sintetizado, se adicionó 1  $\bar{1}$  (2 unidades) de RNasa H (Invitrogen) y se incubó 20 min a 37 °C.

### **B. PCR**

Las amplificaciones de los fragmentos se hizo mediante PCR. Las condiciones de estas reacciones variaron dependiendo del fragmento a amplificar (Tabla C), ya que la saturación del sistema se alcanzaba bajo diferentes condiciones dependiendo de la secuencia a amplificar:

0,25 – 2 $\bar{1}$	cDNA preamplificado
0.25 – 0.5 $\bar{1}$	Oligonucleótido Antisentido (5 $\bar{M}$ )
0.25 – 0.5 $\bar{1}$	Oligonucleótido Sentido (5 $\bar{M}$ )
0.8 $\bar{1}$	dNTPs (5 mM)
2 $\bar{1}$	Buffer de reacción 10X (Invitrogen)
0.6 $\bar{1}$	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0.1 $\bar{1}$	Taq DNA Polimerasa (5 U/ $\bar{1}$ )
	H <sub>2</sub> O para alcanzar un volumen final de 20 $\bar{1}$

Para amplificar se usaron las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min 94 °C	}	1 ciclo	
Desnaturalización	30 s 94 °C		}	25 – 30 ciclos
Unión de cebadores al molde 1 min	56 °C - 60 °C			
Alargamiento	1 min 72 °C			
Alargamiento	2 min 72 °C		1 ciclo	

Tabla C. Condiciones para las PCRs de cada fragmento derivado de los cDNA-AFLPs.

Fragmento	Temperatura de union de los cebadores al molde (°C)	Número de ciclos de PCR
cDNA-AFLP 12	56	30
cDNA-AFLP 17	58	30
cDNA-AFLP 26	62	35
cDNA-AFLP 30	58	25
cDNA-AFLP 48	62	35
cDNA-AFLP 52	58	30
Ubiquitina	56	30

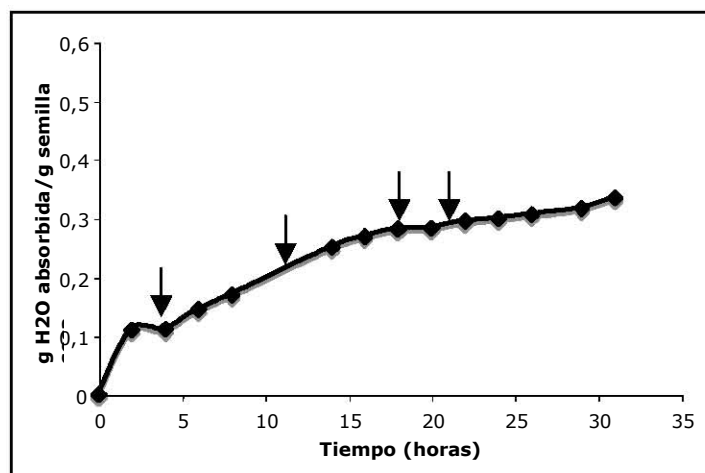
Al terminar la reacción de PCR se hizo una separación electroforética con 8 T de las reacciones en un gel de agarosa al 2% para verificar los productos de las amplificaciones y se realizó un análisis densitométrico usando el programa Quantity One® 4.2.1. (BioRad) Con los datos arrojados se construyeron gráficos para conocer de modo cuantitativo las diferencias de expresión ocasionadas por la germinación de los embriones de maíz. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados es el que se muestra en la tabla C.

**Tabla C.** Tamaño esperado en pares de bases de los fragmentos a amplificar por RT-PCR.

Fragmento	# pares de bases
cDNA-AFLP 12	112 pb
cDNA-AFLP 17	95 pb
cDNA-AFLP 26	329 pb
cDNA-AFLP 30	184 pb
cDNA-AFLP 48	152 pb
cDNA-AFLP 52	116 pb

### ESTABLECIMIENTO DE LOS TIEMPOS DE GERMINACIÓN:

El interés de este trabajo se centró en la identificación de genes expresados durante la fase I y II de la germinación. Ya que el periodo de imbibición requerido por las semillas para alcanzar estas fases varía con la especie, lote y condiciones de germinación (Bewley, 1997). Para definir estas fases en la semilla de maíz HS2 se realizó una cinética de imbibición de las semillas (Figura 1). La fase de rápido incremento en el contenido de humedad de la semilla, fase I de la germinación, comprendió de las 4 a las 15 h; mientras que la fase II caracterizada por un contenido constante de humedad de la semilla estuvo comprendida entre 15 y 24 h de imbibición. Transcurridas 28 h de imbibición, se observó la protrusión de la radícula en el 50% de las semillas, es decir, a partir de este período las semillas entran a la fase post-germinativa, la cual no fue objeto de este estudio.



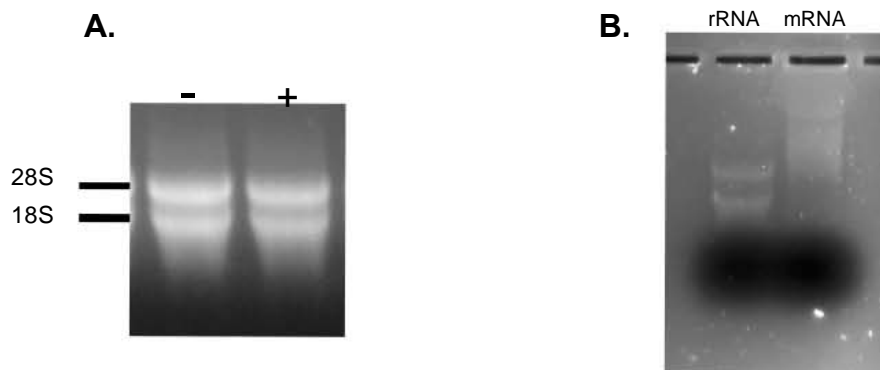
**Figura 1.** Curva de imbibición de semillas de maíz. Las flechas indican los tiempos seleccionados para germinar el lote de semillas correspondiente a la mezcla de germinación.

### OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y AISLAMIENTO DE mRNA

Una fracción de las proteínas que se sintetizan durante la germinación “*senso stricto*” de semillas de trigo y maíz requiere de la síntesis continua de mRNA específicos (Sánchez-Martínez et al., 1986), por lo que para tener representados en una sola muestra los transcritos de los genes expresados durante el período de la germinación se integró una muestra de igual

número de embriones germinados por 4, 12, 18 y 21 h, siendo estos tiempos representativos de las dos fases de la germinación previas a la protrusión de la radícula. De este conjunto se aisló el RNA y se designó como RNA mezcla de germinación. Como control se utilizó el RNA extraído de embriones aislados de semillas secas. En la Figura 2A se presenta un gel de RNA total de estos dos tratamientos. Dado que las bandas de rRNA son nítidas y no presentaron contaminación con DNA genómico, se concluyó que el método de extracción era adecuado.

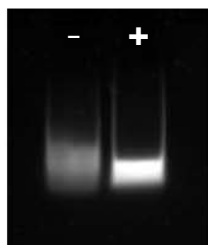
Este RNA total se utilizó para aislar mRNA (Figura. 2B). De manera consistente se aisló una mayor cantidad de mRNA a partir del RNA total de semillas germinadas que el obtenido de semillas sin germinar. E ninguno de los casos el rendimiento de mRNA fue suficiente para cuantificarlo por espectroscopía.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes para observar la integridad de los RNAs extraídos. **A.** RNA total extraído. (-) semillas sin germinar; (+) semillas germinadas. **B.** Aislamiento de mRNA (Poli A<sup>+</sup>). Primer carril; RNA ribosomal (rRNA), segundo carril; mRNA (RNA mensajero), ambos obtenidos a partir de semillas germinadas.

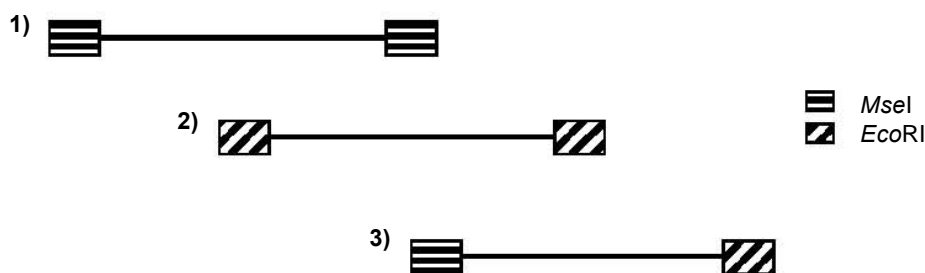
## cDNA-AFLP

Para que la detección de diferencias cualitativas y cuantitativas de cDNA-AFLPs entre tratamientos sea confiable, es necesario iniciar el procedimiento con cantidades equivalentes de mRNA de cada uno de los tratamientos a comparar. Sin embargo, como antes se estableció, la cuantificación espectrofotométrica del mRNA no fue posible. Por lo anterior, la reacción de síntesis del cDNA se realizó con el mRNA restante ( $10^{-1}$ ) para cada uno de los tratamientos (Figura 3).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa en donde se muestra el cDNA sintetizado a partir de mRNA. (-) Semillas sin germinar; (+) semillas germinadas

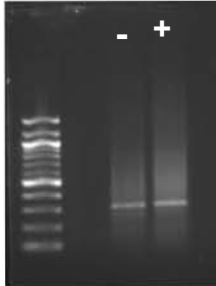
A su vez, todo el cDNA ( $15 \mu\text{l}$ ) producto de la reacción anterior fue digerido con las enzimas de restricción *MseI* (sitios de corte frecuente) y *EcoRI* (sitios de corte escasos o raros). Enseguida se ligaron los adaptadores específicos para cada una de estas enzimas (ML33 y ML35, ver apéndice 1) a los extremos de cDNA. Al ligar los adaptadores al cDNA digerido se generan tres diferentes tipos de fragmentos: 1) los que se encuentran flanqueados en ambos extremos por adaptadores *MseI* (abundantes), 2) los que están flanqueados por adaptadores *EcoRI* (escasos) en sus extremos y 3) los que tienen el adaptador *EcoRI* en uno de su extremos y *MseI* en el otro (Figura 4). Estos últimos constituyen la población de fragmentos que en una fase subsecuente se desea enriquecer.



**Figura 4.** Esquema de los diferentes fragmentos de cDNA generados al realizar la reacción de digestión con *EcoRI* *MseI* y la reacción de ligado de los adaptadores específicos para cada enzima.

Esta fase de amplificación se realizó por PCR, utilizando cantidades similares (equilibradas por prueba y error) del producto de cada una de las reacciones anteriores, y los oligonucleótidos *MseI* core + adapt (ML37) y *EcoRI* core + adapt (ML38). Para verificar que la reacción de amplificación fue adecuada, se corrió un gel de agarosa al 2%, cargando  $10 \mu\text{l}$  de cada reacción de PCR (Figura 5). Lo que se observó en este gel fue un barrido por debajo de las 600 pb, el cual corresponde a la población de fragmentos de cDNA enriquecida. Es importante notar que la concentración de fragmentos en el cDNA de semillas sin germinar fue igual a la de semillas

germinadas, esto nos asegura que las diferencias observadas sean debidas a la abundancia de cada transcrito en la mezcla de germinación de mRNA original.

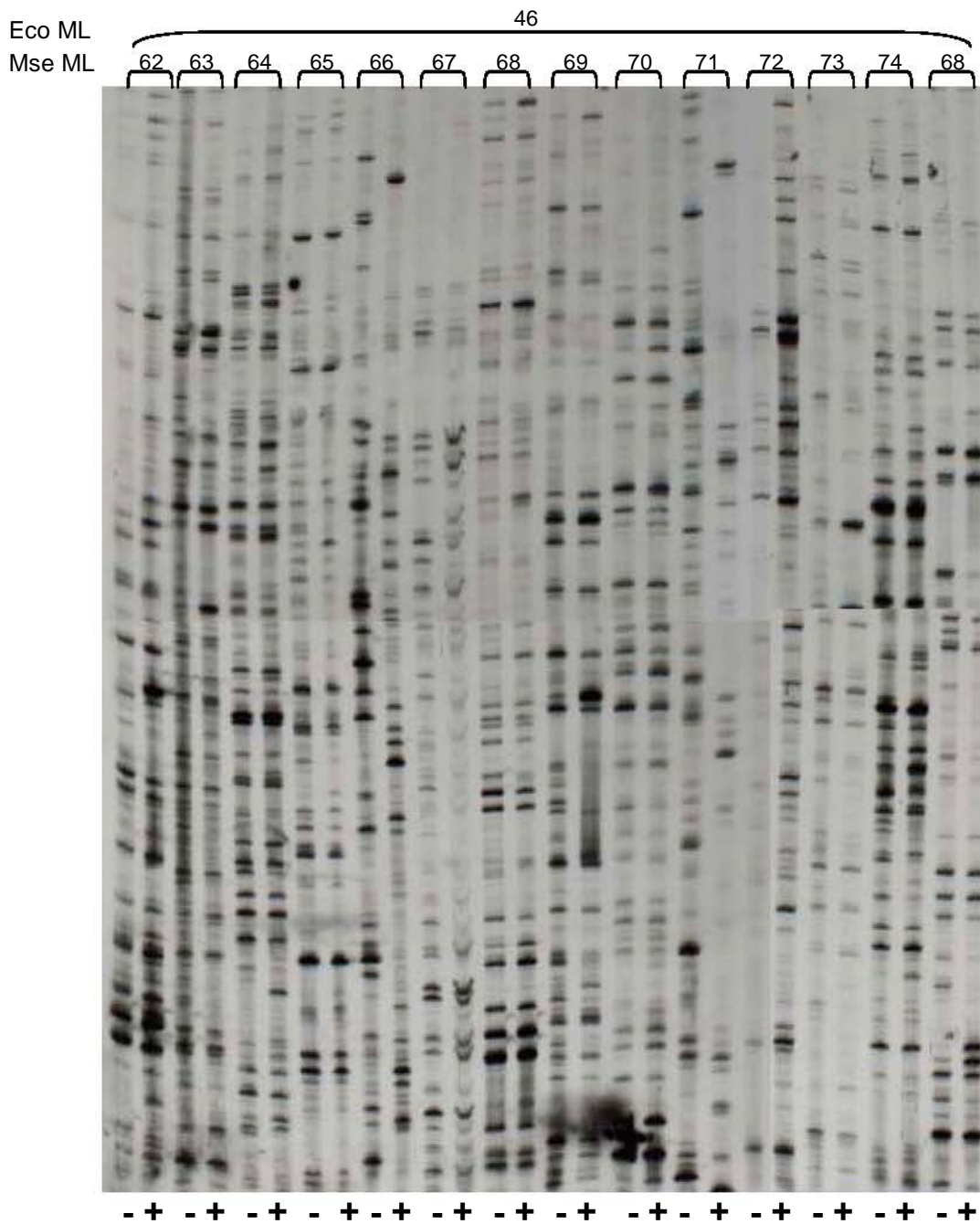


**Figura 5.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR de los fragmentos de cDNA flanqueados por los adaptadores *EcoRI* y *MseI*. (-) Semillas sin germinar; (+) semillas germinadas.

El cDNA amplificado se diluyó 1:10 y de esta dilución se usaron 2  $\mu$ l como molde para el PCR-AFLP. En esta reacción de amplificación y marcaje se utilizan dos oligonucleótidos iniciadores, uno correspondiente a *EcoRI* y otro a *MseI*. El oligonucleótido *EcoRI* se marcó radiactivamente con [ $^{33}$ P]dATP usando la enzima T4 cinasa. El producto de amplificación se desnaturalizó y se hizo una electroforesis en gel de acrilamida al 6%. De cada uno de los geles generados se realizó una autorradiografía para poder analizar el patrón de expresión en embriones de semillas germinadas y compararlo con la expresión en embriones de semillas sin germinar. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de las autorradiografías obtenidas. En este gel se observan bandas bien definidas y distribuidas a lo largo de todo el gel.

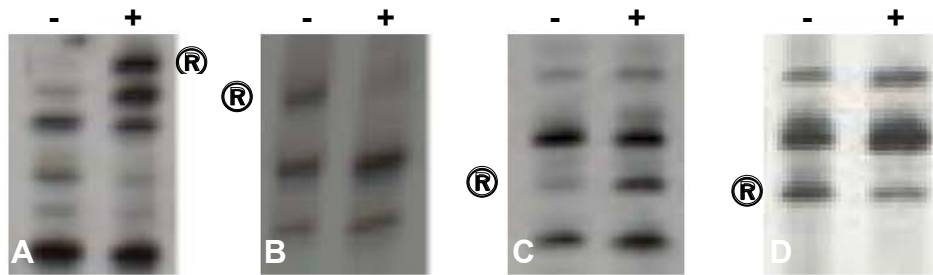
Se usaron en total 204 combinaciones de oligonucleótidos *EcoRI* y *MseI*, las cuales se muestran en la Anexo B. No todas las combinaciones realizadas arrojaron buenos resultados, ya que en algunos casos solo se observaron barridos en las autorradiografías. En otros casos, aunque el patrón de bandas era claro, no se encontraban diferencias de expresión entre los dos lotes analizados.

En total se encontraron 413 bandas cuya expresión se modificó durante la germinación de las semillas de maíz; de las cuales, 73 fragmentos (17 %) inducen su expresión por efecto de la germinación, 42 bandas (10 %) se expresan solo en embriones no germinados, 178 (43 %) disminuyen su nivel de expresión durante la germinación y 120 (29 %) lo aumentan (Figura 7).



**Figura 6.** Autorradiografía del cDNA-AFLP. Realizado con 14 combinaciones de oligonucleótidos: ML46 de *EcoRI* marcado con  $^{33}\text{P}$  combinado con ML62 al ML 75 de *MseI* (Ver anexo A). (-) Embriones de semillas sin germinar. (+) Embriones de semillas germinadas.



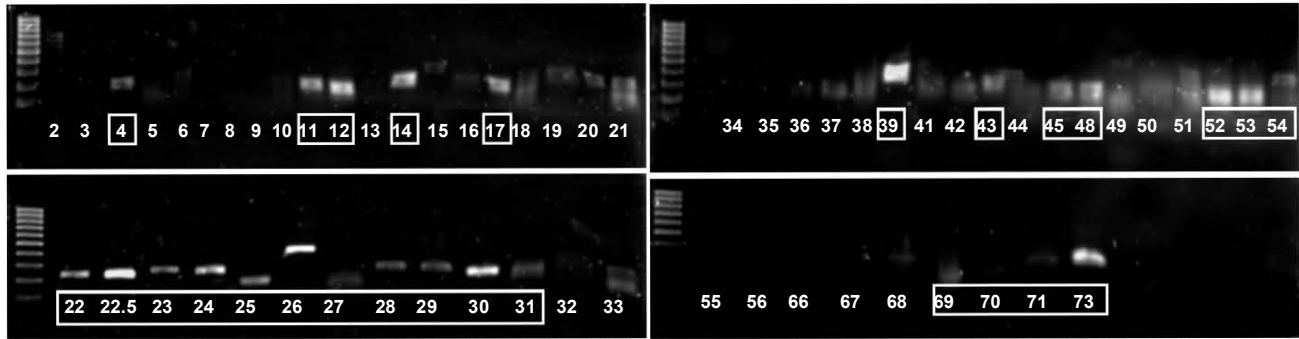


**Figura 7.** Expresión diferencial por efecto de la germinación en embriones de semillas de maíz. Ejemplo de: A) un fragmento de cDNA cuya expresión se indujo por efecto de la germinación, B) fragmento de cDNA cuya expresión se observó únicamente en semillas sin germinar. C) fragmento de cDNA que aumentó su nivel de expresión y D) fragmento que disminuyó este nivel. (-) semillas sin germinar, (+) semillas germinadas.

Dado que este proyecto se centra en el estudio de genes que se expresan durante la germinación, se decidió trabajar únicamente con los 73 fragmentos cuya actividad se inducía durante la germinación; esto no quiere decir que el resto de las bandas que presentan diferencias de expresión no sean importantes. Estos 73 fragmentos fueron cortados y recuperados del gel de acrilamida.

Con la finalidad de aumentar la concentración de estos fragmentos de genes, el DNA aislado de los geles se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos universales para *EcoRI* y *MseI*, conservando las mismas condiciones de amplificación que se usaron en la primera PCR. Debido a la baja concentración de algunas bandas de cDNA fue imposible amplificar los 73 fragmentos iniciales, pero se logró la purificación y amplificación exitosa de 59 fragmentos (Figura 8).

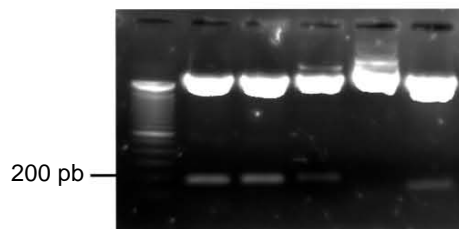
Una vez amplificados los fragmentos de cDNA provenientes de los AFLPs, se seleccionaron 27 bandas para ser clonadas. Esta selección se hizo con base en la intensidad y definición de las bandas; los fragmentos que se observaron en el gel de agarosa como barridos o dobletes, fueron descartados (Figura 8).



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra la amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA recuperados de los geles de acrilamida de AFLPs. Los fragmentos seleccionados para ser clonados están enmarcadas.

## CLONACIÓN DE LOS cDNAs EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE

Los 27 fragmentos de cDNA amplificados seleccionados se purificaron del gel de agarosa y se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega; Anéxo C). La reacción de ligado se hizo para transformar células competentes de *E.coli* DH5-® que fueron crecidas en medio LB con IPTG (100 mM), X-Gal (100 mg/ml) y ampicilina (100 mg/ml). La colonias que contenían el plásmido recombinante (colonias blancas) se seleccionaron y se crecieron en medio LB líquido con ampicilina (100 mg/ml) para aumentar su concentración y purificar los plásmidos. El DNA plasmídico se purificó y se cortó con la enzima *EcoRI* para determinar que colonias contenían los insertos de interés. Las reacciones de digestión se corrieron en gel de agarosa (Figura 9). En todos los casos el peso molecular de los insertos fue similar al esperado (Tabla 2).



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra la liberación del Inserto. El DNA plasmídico fue digerido con *EcoRI* para seleccionar a las colonias que contenían el inserto.

Se lograron clonar 18 fragmentos de cDNA de los 27 seleccionados. En la Tabla 2, se muestra la combinación de oligonucleótidos *EcoRI* y *MseI* que generaron los fragmentos de cDNA en los AFLPs y los tamaños aproximados de cada uno.

**Tabla 2.** Combinación de oligonucleótidos de *EcoRI* y *MseI* (ver secuencias en apéndice A) que generaron mediante la técnica de cDNA-AFLP los fragmentos de cDNA que se expresan durante la germinación.

Fragmento de cDNA	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	@Pb
cDNA-AFLP 11	ML44	ML67	200
cDNA-AFLP 12	ML44	ML67	200
cDNA-AFLP 17	ML44	ML73	>200
cDNA-AFLP 22	ML45	ML70	>200
cDNA-AFLP 22.5	ML46	ML62	>200
cDNA-AFLP 23	ML46	ML63	300
cDNA-AFLP 24	ML46	ML63	300
cDNA-AFLP 25	ML46	ML64	200
cDNA-AFLP 26	ML46	ML66	>300
cDNA-AFLP 28	ML46	ML66	>300
cDNA-AFLP 29	ML46	ML66	>300
cDNA-AFLP 30	ML46	ML66	300
cDNA-AFLP 31	ML46	ML66	300
cDNA-AFLP 39	ML46	ML72	300
cDNA-AFLP 45	ML47	ML62	200
cDNA-AFLP 48	ML47	ML63	200
cDNA-AFLP 52	ML47	ML74	200
cDNA-AFLP 53	ML47	ML75	200

## ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS CDNAS CLONADOS.

Los insertos clonados en el plásmido se mandaron secuenciar. De estos sólo tres, por causas desconocidas, no se pudieron secuenciar. La identidad de las secuencias clonadas se buscó tanto a nivel de ácidos nucleicos como de aminoácidos. En este último caso se eligieron únicamente los marcos de lectura que no contenían codones de término. Las comparaciones se realizaron con los programas incluidos en la dirección de web workbench utilizando el genbank y maizegdb.org.

Cuando la comparación se realizó a nivel de nucleótidos, se encontró que dos secuencias, cDNA-AFLP 12 y cDNA-AFLP 17, presentaron 100% de identidad con las proteínas reportadas N-acetil glucosamina fosfato mutasa (AGM) en maíz (*Zea mays*; Figura 10) y mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS) en arroz (*Oriza sativa*) respectivamente (Figura 11).

```

cDNA-AFLP 12      --TCGGGCAAGGAAGGAGAAGGGATACTAAATCACATGTGTGGCGCAGA
AGM Zma           ATTCGGGCAAGGAAGGAGAAGGGATACTAAATCACATGTGTGGCGCAGA
AGM Osa           ATTCAGG---GAAGGGAGAAGGGATACTTAATGAGAGTTGTGGTGCAGA
AGM Ath           ACACAGG---GAGAGATGGTGGTGTGCTTAATGAAGGTGTAGGTGCTGA

cDNA-AFLP 12      CTTTGTTCAAAAGGAGCGAGTTACTCCACATGGAT--
AGM Zma           CTTTGTTCAAAAGGAGCGAGTTACTCCACATGGATTT
AGM Osa           CTTTGTTCAGAAAGGAGAAAGTTGTTCCCTCTTGGCTTT
AGM Ath           TTTTGTGCAGAAAGAAAAGGTTTTCCTGTAGGATTT

```

**Figura 10.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia número 12 con las secuencias reportadas de Acetilglucosamina fosfato mutasa de maíz (AGPM *Zma*, 100% identidad), arroz (AGPM *Osa*, 78% de identidad) y *A. thaliana* (AGPM *Ath*, 48% de identidad). Los nucleótidos sombreados con negro son idénticos en todas las secuencias.

```

cDNA-AFLP 17      -GGTGATAGGAGGCGACGACTTCAAGAGTGGGCAGACCAAGATGAAGTCT
MIPS Nta          CACTGATTGGTGGTGAAGACTTTAAGAGTGGTCAAACCAAATGAAGTCA
MIPS Les          CTTTAATTGGTGGTGAAGACTTTAAGAGTGGTCAAACCAAATGAAGTCC
MIPS Gma          CTTTGTATTGGTGGAGATGATTTCAAGAGTGGTCAAACCAAATGAAATCT
MIPS Pvu          GTTTGTATTGGAGGAGATGACTTCAAGAGTGGTCAAACCAAATGAAATCC
MIPS Sin          GTTTGTATTGGTGGAGATGATTTCAAGAGCGGTCAAACCAAATGAAATCA
MIPS Ath          GTTTGTATTGGTGGGATGATTTCAAGAGTGGTCAAACCAAATGAAATCC
MIPS avena       GCTTGTATTGGTGGCGATGACTTCAAGAGTGGGCAGACTAAGATGAAGTCT
MIPS Zma          GCTTGTATTGGTGGTGAAGACTTCAAGAGTGGACAGACCAAATGAAATCT
MIPS Osa          GGGTGATAGGAGGCGACGACTTCAAGAGTGGGCAGACCAAGATGAAGTCT

cDNA-AFLP 17      GTGTTGGTTCGATTTCCCTCGTCGGCGCTGGGA----
MIPS Nta          GTGCTGGTTGATTTCCCTTGTGGAGCTGGTATTAA
MIPS Les          GTGTTGGTTGATTTCCCTTGTGGAGCCGGTATTAA
MIPS Gma          GTGTTGGTTGATTTCCCTTGTGGGGCTGGTATCAA
MIPS Pvu          GTGCTGGTAGATTTCCCTTGTGGGGCTGGTATCAA
MIPS Sin          GTGCTAGTTGATTTCCCTTGTGGAGCTGGTATCAA
MIPS Ath          GTTTTGGTTGATTTCCCTTGTGGAGCTGGCATTAA
MIPS avena       GTCTTGGTTCGACTTCCCTCGTTGGTGGTGGAAATCAA
MIPS Zma          GTCTTGGTTCGATTTCCCTTGTGGTGGTGGAAATAA
MIPS Osa          GTGTTGGTTCGATTTCCCTCGTCGGCGCTGGGATCAA

```

**Figura 11.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencias reportadas de Mio-Inositol 1-fosfato sintasa para avena (MIPS *avena*, 86% de identidad), maíz (MIPS *Zma*, 85% de identidad), arroz (MIPS *Osa*, 100% de identidad), *N. tabacum* (MIPS *Nta*, 79% de identidad), ajonjolí (MIPS *Sin*, 76% de identidad), *A. thaliana* (MIPS *Ath*, 79% de identidad), tomate (MIPS *Les*, 79% de identidad), soya (MIPS *Gma*, 82% de identidad) y frijol (MIPS *Pvu*, 81% de identidad) y la clona derivada de los cDNA-AFLP 17. Las bases sombreadas con negro son idénticas en todas las secuencias.

Por otra parte, el fragmento cDNA-AFLP 52 presentó una identidad a nivel de nucleótidos del 97% con la proteína IN2-1 que pertenece a la familia de las Glutation S Transferasas reportada en maíz, y con menor porcentaje a las reportadas en arroz y trigo (*Triticum aestivum*; Figura 12).

```

cDNA-AFLP 52  --ATCGACGAGATGAACAAGATCGAAGCGTATGCGCAGACCAAGAACGATCCTC
GST Osa         TCATCGAGGAAATCAACAGAATCGAAGCATATACACAAACAAAAAATGACCCGC
In2-1 Tae      ACACCGAGGAGATGAACAAGATCGAAGCGTATAAGCAAACAAAAATGTCCCGC
IN2-1 Zma      TCATCGACGAGATGAACAAGATCGAAGCGTATGCGCAGACCAAGAACGATCCTC

cDNA-AFLP 52  TGTTCCTTGCTTGATCTTGCCAAGAACCATC--
GST Osa         TTTACTTGCTCGATCTTGCGAAGACGCATCTT
In2-1 Tae      TGGCCTTGCTTGATGCTGCCAAGAGGCATCTC
IN2-1 Zma      TGTTCCTTGCTTGACCTTGCCAAGAGGCATCTT

```

**Figura 12.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la clona 52 con las secuencias reportadas para maíz (IN2-1 *Zma*, 97% de identidad), arroz (GST *Osa*, 73% de identidad) y trigo (IN2-1 *Tae*, 82% de identidad) de Glutation S Transferasas. Los nucleótidos idénticos en todas las secuencias se sombreen en color negro.

Además, la secuencia del fragmento cDNA-AFLP 48 mostró identidad con la secuencia del factor de splicing alternativo SF2 (ASF/SF2, Figura 13) de maíz (74%), *Arabidopsis thaliana* (76%) y arroz (81%). Algo similar se encontró para el fragmento cDNA-AFLP 24 el cual presentó 98% de identidad con la cistatina II de maíz y 95% de identidad con la de sorgo (*Sorghum bicolor*; Figura 14).

```

cDNA-AFLP 48  ----AGGATCATATGCGGAAAGCTGGTGATGTTTGTTCCTCTAAAGTGT
ASF/SF2 Osa    CTAAAGGACCATATGCGAAATGCTGGTGATGTTTGTACTCTGAAGTGT
ASF/SF2 Zma    CTCAAGGACCATATGCGGCGAGCTGGTGATGTTTGTTCCTCACTGATGTGT
ASF/SF2 Ath    TTGAAGGATCATATGCGGAAAGCTGGTGATGTTGCTTTTGCTGAGGTGA

cDNA-AFLP 48  ATCGCGAAGGCGGTGGCACCCTAGGAATTGTGGACTACACAAATATATGA
ASF/SF2 Osa    ACCGTGAGGGTGGTGGTACTATAGGAATTGTAGACTACACAAACTATGA
ASF/SF2 Zma    ATCGTGAGGCTGGAGCAACTATGGAATAGCTGATTATACTAACTATGA
ASF/SF2 Ath    CTCGAGACAGTGATGGAACCTTATGGTGTGTCGACTACACCAATTATGA

cDNA-AFLP 48  TGATATGAAATATGCTATAAAGAAGCTGGATGATACT-----
ASF/SF2 Osa    TGACATGAAGTATGCTATCAGGAAACTTGATGATTCTGAATTT
ASF/SF2 Zma    AGATATGAAACACCGGATAAGGAAGCTAGATGATTCTGAGTTC
ASF/SF2 Ath    TGACATGAAGTATGCAATAAGGAAACTTGATGACACAGAGTTC

```

**Figura 13.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia número 48 con las secuencias reportadas del factor de splicing alternativo ASF/SF2 de maíz (ASF/SF2 *Zma*, 74% de identidad), arroz (ASF/SF2 *Osa* 81% de identidad) y *A. thaliana* (ASF/SF2 *Ath* 76% de identidad). Los nucleótidos sombreados con negro son idénticos en todas las secuencias.

```

cDNA-AFLP 24      ----TCACCTTCATTCCCTTCGATACAGACA--CAACCAAACAA--GCCCTAA
Cistatin II Sbi    GAGCTCGCCCGCTTCGCCGTCGACGAGCACAACAAGAAGGCCAATGCTCTTC
Cistatin II Zma    GAGCTCGCCCGCTTCGCCGTCGATGAGCACAACAAGAAGGCCAATGCTCTTC

cDNA-AFLP 24      TAGGGTTGTAGT--CTTATGAAATT--ACACAAGGGAGCATGGCTCCTTATT
Cistatin II Sbi    TGGGGTACGAGAAGCTTGTGAAGGCCAAGACACAAGTGGTTGCTGGCACGAT
Cistatin II Zma    TGGGGTTCGAGAAGCTTGTGAAGGCCAAGACACAAGTGGTTGCTGGCACGAT

cDNA-AFLP 24      CTGCAACTTTGCT--TTGAGCTTCAGGCTCGC--ACATGGAGAAGGAG--ACATC
Cistatin II Sbi    GTACTATCTCACTGTTGAGGTGAAGGATGGCGAAGTCAAGAAGCTCTACGAA
Cistatin II Zma    GTACTATCTCACTATTGAAGTGAAGGATGGCGAAGTCAAGAAGCTCTACGAA

cDNA-AFLP 24      CTTAGGCGCTAGCACCCCTCTTCAACAGGCTT-----
Cistatin II Sbi    GCTAAGGTCTGGGAGAAGCCATGGGAGAAGTTCAAGGAGCTGCAGGAATTC
Cistatin II Zma    GCTAAGGTCTGGGAGAAGCCATGGGAGAAGTTCAAGGAGCTGCAGGAATTC

```

**Figura 14.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia cDNA-AFLP 24 con la cistatina de maíz (Cistatin II *Zma* 98% de identidad) y la de sorgo (Cistatin II *Sbi*, 95% de identidad). Los nucleótidos sombreados con negro son idénticos en ambas secuencias. La función de este gen no ha sido reportada

El fragmento de cDNA-AFLP 22.5 presentó, a nivel de nucleótidos, un alto porcentaje de identidad con las secuencias reportadas de la enzima peptidilprolil isomerasa (PPI-L) de arroz (93% de identidad) y *Arabidopsis thaliana* (74% de identidad; Figura 15).

```

cDNA-AFLP 22.5    --ACCACCAGATAAATGTCTTATTTGTTTGTAAGCTCAACCCAGT
PPI-1 Osa          AACACCAGACAACGTTTATTTGTTTGTAAGCTCAACCCAGT
PPI-L Ath          AAACCTCCTGACAATGTGCTGTTCTGCAAACTGAATCCAGT

cDNA-AFLP 22.5    AACACAGGATGAAGATTTATACACAATCTTTTCTCGTTTTGGAA
PPI-1 Osa          AACACAAGATGAAGATTTATATACAATTTTTTCTCGTTTTGGAA
PPI-L Ath          GACTGAGGATGAAGACCTCCATACCATTTTTTCAAGCTTTGGAA

cDNA-AFLP 22.5    CTGTGACATCAGCTGAAATAATCCGTGACTACAAGACTGGAGAT
PPI-1 Osa          CTGTGACATCAGCTGAAATAATCCGTGATTACAAGACTGGTGAT
PPI-L Ath          CCGTTGTATCGGCTGATGTAATCCGGGATTTCAAGACAGGTGAC

cDNA-AFLP 22.5    AGTTTATGCTATGCTTTTATT-----
PPI-1 Osa          AGCTTATGCTATGCTTTTATTGAAATTTGAGACAAAGGAGGCTTG
PPI-L Ath          AGTTTGTGCTATGCTTTTATTAGAGTTTGAGACAAGGAGTCATG

```

**Figura 15.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la clona 22.5 con las secuencias reportadas para arroz (PPI-L *Osa*, 93% de identidad) y *A. thaliana* (PPI-L *Ath*, 74% de identidad) de Peptidilprolil isomerasa (PPI-L). Los nucleótidos idénticos en todas las secuencias se sombreadan en color negro.

Los fragmentos cDNA-AFLP 26 y cDNA-AFLP 30, presentaron una identidad del 43% y de 33% con las secuencias de nucleótidos del receptor tipo cinasa de serina/treonina (RFK1, Figura 16) y con una proteína que interactúa con ABI3 (IP-ABI3, Figura 17), de arroz, respectivamente.

**cDNA-AFLP 26** ---TTACAAGGAACAGTCCGTCGCTTGAGAAAACCTTGCTTCATCATC---ACCGG  
 RFK1 *Osa* AGTATGCAATGAGAGGCCATCTGACTGAAAAGGCCGACGTTTTTGCATTTGGGGTAG

**cDNA-AFLP 26** CCTTCTTCGA-----TGACAGAGCCACGAACTGCGACGAGGCGTGCGAGGCCGACC  
 RFK1 *Osa* TCGCCTTGAGACTGTTGCTGGTCGACCAAACACCGACAACTCTCGTGAAGAATA

**cDNA-AFLP 26** TCGGCGCCACGCCCGACTGCCCACTGACGTTGC--TGCTCATG---AAGCTGCTGGTG  
 RFK1 *Osa* AGATCTATCTCTTTGAATGGCCCTGGACACTATAAGAGAGCCGGCAAGCACTCGGGA

**cDNA-AFLP 26** TTGCCGCCCTTGATCT---GCCACTCGGTGATGTAGCTGGGTTTGTTCGCCACCTGG  
 RFK1 *Osa* TCGTAGACCCAAACTCAAGGAATCAATGA-GAAGGAAGCCTTGAGAGTCATCTGT

**cDNA-AFLP 26** CCCACCTCCACGTCTCCCGCCAGAATCGACACGGCCCGTGACATGGACGGGCGCTGG  
 RFK1 *Osa* GCCGCACCTC-CTTTGCACTCAAGGGTCACCAACCAGCGCCATCAATGTCCAGAGT

**cDNA-AFLP 26** TGGCGCGAGCCCTGGGTGCAGAGG--AGGGCCACGTGGATGGC-ACGGAGC---ACC  
 RFK1 *Osa* CATGGCTA-TCCTAGCCGGAGATATTGAGGTGACTGAGGTGGTGACGAAGCCGAGCT

**cDNA-AFLP 26** TCGTCTGCTGTT-----  
 RFK1 *Osa* ACATCACTGAATGGCAGCTCAGAGGAGGAGGTGACACTAGCTAT

**Figura 16.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencias de receptores tipo cinasa de serina/treonina reportada en bancos de datos para arroz (RFK1 *Osa*, 43% de identidad) y la clona derivada de los cDNA-AFLP 26. Las bases sombreadas con negro son idénticas en todas las secuencias.

**cDNA-AFLP 30** ----TTGCATCAATAGGTCTTC--CACTTTCACCAGAACTTCAATGACAC  
 IP-ABI3 *Ath* CTGATCCCATGGTTTCACGTGCGCGTCAGGCAGCTGAGCTCTGCCGTTCA  
 IP-ABI3 *Osa* CTCTCCATCAGTCAGTCGTCGTCGCCAGACACCTGAGCTTTGTAGAATA

**cDNA-AFLP 30** CTGGCATTTTCTGCGACAACCCAAGCAATCGACAAAGTTTCAGGTGTCTGAC  
 IP-ABI3 *Ath* CTTGGATTAGCTGAAAAAATGCCCTGGTGTGATTGAAGTTCTCGTGAACAGT  
 IP-ABI3 *Osa* CTTGGGTTGTACAGAACATGCCAGGTGTCATTGGAGTTTTGATTGAAAAAT

**cDNA-AFLP 30** GACGACGACTGCATATGGAAGCAATTTGCACAAGTCATCTTCAT-----  
 IP-ABI3 *Ath* G--GAAAACAGATTGATGCGGTTAACTTGGCATTGCGTTTGAACCTCACAG  
 IP-ABI3 *Osa* G--GGAGAACTATTGATGCAATTAATTGGCTTATGCATTTGAGCTGACTG

**Figura 17.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencias reportadas de la proteína que interactúa con ABI3 reportada en arroz (IP ABI3 *Osa*; 45% de identidad) y en *A. thaliana* (IP ABI3 *Ath*; 38% de identidad), así como el alineamiento con el EST AWO56100 y la clona derivada de los cDNA-AFLP 30. Las bases sombreadas con negro son idénticas en todas las secuencias

Un buen número de clonas solo presentaron homología con fragmentos EST reportados en el banco de genes de maíz (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23). En su gran mayoría la identidad varía entre 96-100 %. Por último, la clona 53 no presentó similitud con ninguna proteína reportada ni con ningún EST de maíz.

**cDNA-AFLP 45** -----ACAACAGATAATCCATGCACCGATGTA-----  
 EST 1021013B03 CTGAACGTACAAATTAACAACAGATAATCCATGCACCGATGTACTACGTCCA

**Figura 18.** Alineamiento a nivel de nucleótidos del fragmento de cDNA clonado cDNA-AFLP 45 con el EST 1021013B03 de maíz (100% de identidad). Los oligonucleótidos sombreados en negro son idénticos en ambas secuencias. La función de este gen no ha sido reportada.

```

cDNA-AFLP 25  ACGTTGGTACAAGAGGGGGAGGGGAGCCAGTAACAACCTTGCAGCATGCT
EST zmrws48   ACATTGGTACAAGAGGGGGAGGGGAGCCAGTAACAACCTTGCAGCATGCT

cDNA-AFLP 25  TTTACTAGTTTACAGGCGGGAGGAATAGGAATCGTAGGTAAGCTGGAA
EST zmrws48   TTTACTAGTTTACAGGCGGGAGGAATAGGAATCGTAGGTAAGCTGGAA

```

**Figura 19.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencia cDNA-AFLP 25 con el EST de maíz zmrws48 (95% de identidad). Los nucleótidos sombreados en negro son iguales en ambas secuencias. La función de este gen no ha sido reportada.

```

cDNA-AFLP 11  ---ACAGTCAGAGGCTTTTATTTCAGTGGCTCAAGGAAGCTGAAGAG
EST PCO145392 TAAACAGTCAGAGGCTTTTATTTCAGTGGCTCAAGGAAGCGGAAGAG

cDNA-AFLP 11  GAGGATGACGAAGAAGAGGAATAACCCCTGGAGTTGAGCTGGCACTC
EST PCO145392 GAGGATGACGAAGAAGAGGAATAACCCCTGGAGTTGAGCTGGCACTC

```

**Figura 20.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia número 11 con el EST PCO145392 (98% de identidad). Los nucleótidos sombreados con negro son idénticos en ambas secuencias. La función de este gen no ha sido reportada.

```

cDNA-AFLP 28  -TTGCAAGGATAG--CTTCAAATTTTCAGTCACACAT-----AGATCATG--AC
GSS PUF PQ19TD ACAACCGAACAGGCCCTCCCGCTTCGGCTACTTGTATCAGGATTCATGTCAT

cDNA-AFLP 28  TAGTATCTGTAATGGT--GTATTCTGCTCTGCACTGCCTCCAGACTTCAAATTT
GSS PUF PQ19TD GGATACGAATATTGGCAAGAGCCCTTTCTGCACTGCCTCCAAATTCCAAATTT

cDNA-AFLP 28  TATGCTGGTGATCACAGAACCTGATGATTTTCCCCAGCAGAAAGCATGCAAAC
GSS PUF PQ19TD TATGCTGGTGATCACAGAACCTGATGATTTTCCCCAGCAGAAAGCATGCAAAC

cDNA-AFLP 28  TGT-----
GSS PUF PQ19TD TGTCAATTCAGATA

```

**Figura 21.** Alineamiento a nivel de nucleótidos del fragmento clonado cDNA-AFLP 28 con el EST de maíz GSS PUF PQ19TD (96% de identidad). Los nucleótidos sombreados en negro son idénticos en ambas secuencias. La función de este gen no ha sido reportada.

```

cDNA-AFLP 29  AAACCTCAAAACAAGTCGAGTAGCTGCGGGTTCACTAGAGTTTCTGACTCAGGAT
EST SAC 178  -----TAAACAAGTCGAGTAGTTCGACCTCACTAGAGTTTCTGACTCAGGAT

cDNA-AFLP 29  TCATGACTTAGGATTCAAGACGTCATGTTTCTTTGGAAGCGGATGTAGTTCGTG
EST SAC 178  TCATGACTTAGGATTCAAGATAATCATGTTTCTTTGGAAGCGGATGTAGTTCGTG

cDNA-AFLP 29  ACTCGTGAGATGGGAGCGGCGGAGCTGATCGCCG-----
EST SAC 178  ACTCGTGAGATGGGAGCGGCGGAGCTGATCGCCGGAATTCCCCACAAATCAAGT

```

**Figura 22.** Alineamiento a nivel de nucleótidos del EST SAC 178 de maíz con el fragmento clonado cDNA-AFLP 29 (96% de identidad). Los oligonucleótidos sombreados en negro son iguales en ambas secuencia. La función de este gen aún no ha sido reportada.



**cDNA-AFLP 31** -----AAGTCTCCACGCTTGTGCGGCCACCAAATTTGAGTT--TCATTC  
 EST PCO072133 AACATATAAAGCTACCATGATCATGGAGGTAGCAGGTGCAGAGACACCCATCA  
  
**cDNA-AFLP 31** CATCTTCTCCTTCTCTAGAACTTTATT--GGAAGCATGCTTGCTGGCAA-----  
 EST PCO072133 AGGTTTCTTCGTCTCTAGTCAATTTGTTACGCAAATTCAAATACAGGTAAAGT

**Figura 23.** Alineamiento a nivel de nucleótidos del EST PCO072133 de maíz con el fragmento clonado cDNA-AFLP 31 (90% de identidad). Los oligonucleótidos sombreados en negro son idénticos en ambas secuencias. La función de este gen no ha sido reportada.

Las secuencias de cDNA-AFLPs de nucleótidos se tradujeron a proteínas y la comparación se hizo a nivel de aminoácidos. En la Tabla 3 se muestran las probabilidades (E) predichas por el BLAST y las posibles proteínas con las que los fragmentos de cDNA-AFLP presentaron homología, así como los ESTs. Con excepción del presentado en el alineamiento de AGM, el valor de E fue menor de  $10^{-4}$ , valor teórico para asignar similitud entre dos secuencias alineadas, indicando que en todos los casos las secuencias obtenidas de los cDNA-AFLP eran homólogas a las proteínas sugeridas por el análisis de nucleótidos y corroboradas por el análisis de las secuencias a nivel de aminoácidos.

**Tabla 3.** Cuadro de similitudes encontradas al analizar las secuencias derivadas de los cDNA-AFLP

Fragmento de cDNA-AFLP	Similitud	Organismo	E
cDNA-AFLP 11	EST PCO145392	<i>Zea mays</i>	$1 e^{-39}$
cDNA-AFLP 12	Acetil-glucosamina fosfato mutasa	<i>Oryza sativa</i>	0.002
cDNA-AFLP 17	Mio-inositol 1-fosfato sintasa	<i>Zea mays</i>	$5 e^{-7}$
cDNA-AFLP 22.5	Peptidil-prolil isomerasa (PPI-L)	<i>Oryza sativa</i>	$1 e^{-23}$
cDNA-AFLP 24	Cistatina II	<i>Zea mays</i>	$4 e^{-26}$
cDNA-AFLP 25	EST zmrws48	<i>Zea mays</i>	$3 e^{-46}$
cDNA-AFLP 26	Receptor tipo cinasa de Serina/treonina (RFK1)	<i>Oryza sativa</i>	$1 e^{-8}$
cDNA-AFLP 28	GSS PUF PQ19TD	<i>Zea mays</i>	$3 e^{-33}$
cDNA-AFLP 29	EST SAC 178	<i>Zea mays</i>	$9 e^{-6}$
cDNA-AFLP 30	Proteína que interactúa con ABI3	<i>Oryza sativa</i>	$1 e^{-15}$
cDNA-AFLP 31	EST PCO072133	<i>Zea mays</i>	$3 e^{-09}$
cDNA-AFLP 45	EST 1021013B03	<i>Zea mays</i>	$1 e^{-7}$
cDNA-AFLP 48	Factor de Splicing alternativo ASF/SF2	<i>Zea mays</i>	$2 e^{-18}$
cDNA-AFLP 52	Glutation-S transferasa (In2-1)	<i>Zea mays</i>	$7 e^{-7}$
cDNA-AFLP 53	Sin similitud reportada	————	® ®

Las figuras 24 a la 30 presentan los alineamientos de las secuencias homólogas a proteínas reportadas, para dar mayor seguridad de nuestros resultados, los alineamientos también se hicieron con otras especies. En todos los casos, la identidad es mayor del 25 %. Por lo que se concluyó que durante la germinación se encuentran presentes los transcritos de estos genes.

```

cDNA-AFLP 12   ---SGKEGEGILNHCGADVFQKERVTPHG-----
AGPM Zma        VRNSGKEGEGILNHCGADVFQKERVTPHGFNPEDVGVRCASLD
AGPM Osa        VRNSGK-GEGILNESCGADVFQKEKVVPLGFGPEDVGFRCASFD
AGPM Ath        IRNTGRDG-GVLNEGVGADVFQKEKVLPVGFGFKDVGMRCASLD
  
```

**Figura 24.** Alineamiento a nivel de proteína del fragmento cDNA-AFLP 12 con la enzima Acetil-glucosamina fosfato mutasa de maíz (AGPM *Zma*; 100% de identidad), arroz (AGPM *Osa*; 77% de identidad y 81% de similitud) y *A. thaliana* (AGPM *Ath* 59% de identidad y 77% de similitud). Los residuos sombreados con color negro son idénticos en todas las secuencias, los sombreados con color gris son residuos con características similares

```

cDNA-AFLP 17   VIGGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAG-----
MIPS Hvu         LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS avena       LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Zma         LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Osa         VIGGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIASYNHLGNNDGMNL
MIPS Nta        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Ade        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS citrus     LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Sin        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Tae        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Ath        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Les        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMSL
MIPS Gma        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
MIPS Pvu        LIIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNL
  
```

**Figura 25.** Alineamiento a nivel de proteína del fragmento clonado número 17 con las secuencias de MIPS reportadas para cebada (MIPS *Hvu*; 96% de identidad y 100% de similitud), avena (MIPS *avena*; 96% de identidad y 100% de similitud), maíz (MIPS *Zma*; 96% de identidad y 100% de similitud), arroz (MIPS *Osa*; 100% identidad), *N. Tabacum* (MIPS *Nta*; 96% de identidad y 100% de similitud), actinidia (MIPS *Ade*; 96% de identidad y 100% de similitud), *citrus* (MIPS *citrus*; 96% de identidad y 100% de similitud), ajonjolí (MIPS *Sin*; 96% de identidad y 100% de similitud), trigo (MIPS *Tae*; 96% de identidad y 100% de similitud), *A. thaliana* (MIPS *Ath*; 96% de identidad y 100% de similitud), tomate (MIPS *Les*; 96% de identidad y 100% de similitud), soya (MIPS *Gma*; 96% de identidad y 100% de similitud) y frijol (MIPS *Pvu*; 96% de identidad y 100% de similitud). Los residuos sombreados en negro son idénticos en todas las secuencias, en gris se somborean los residuos con características similares. Se muestra el dominio funcional 4 de la enzima cercano a nuestro fragmento de gen.

```

cDNA-AFLP 22.5  -PPDNVLFVCKLNPVTQDEDLYTIFSRFGTVTSAEIIRDYKTGDSLCYAFI
PPI-L Osa       KPPDNVLFVCKLNPVTQDEDLYTIFSRFGTVTSAEIIRDYKTGDSLCYAFI
PPI-L Ath       KPPDNVLFVCKLNPVTEDEDLHTIFSRFGTVVSADVIRDFKTGDSLCYAFI
  
```

**Figura 26.** Alineamiento a nivel de aminoácidos del fragmento número 22.5 con las enzimas Peptidilproil isomerasa reportada para arroz (PPI-L *Osa*; 100% de identidad) y *A. thaliana* (PPI-L *Ath*; 88% de identidad y 98% de similitud) a nivel proteína. En negro se somborean los residuos idénticos en las tres secuencias y en gris los residuos que presentan características similares.

**cDNA-AFLP 26**    --MSRAVSIILAGDVEVGOVANKPSYITWQIKGGN-----TSSF<sub>M</sub>  
 RfK1 *Osa*        PMSRVMAILAGDIEVTEVVTKPSYITWQLRGGGDTSYATSSYY

**cDNA-AFLP 26**    SSNVSGEFREKREIAPLNSYPGIAGRIDEGR  
 RfK1 *Osa*        SGSTIGQSGVAPRSASHASSQFVGSVIEEGR

**Figura 27.** Alineamiento a nivel de proteína del fragmento 26 con la secuencia de Receptores tipo cinasa de serina/treonina reportadas en bancos de datos para arroz (RfK1 *Osa*; 65% de identidad y 72% de similitud). En negro se somborean los residuos idénticos en todas las secuencias y en gris los residuos con características similares.

**cDNA-AFLP 30**    ---NEDDLCKLLPYVSRRRQTP<sub>EL</sub>CRLLGLSQKMPGVIEVLVESGRPIDA--  
 IP ABI3 *Osa*      SEFAEDELCKLLPSVSRRRQTP<sub>EL</sub>CRILGLSQNMPGVIGVLIENGRITDAIN  
 IP ABI3 *Ath*      ADFKED<sub>EL</sub>LLKLLIPVSRRRQ<sub>AA</sub>ELCRSLGLAEKMPGVIEVLVNSGKQIDAVN

**Figura 28.** Alineamiento a nivel de proteína de la secuencia clonada número 30 con las secuencias de una proteína que interactúa con ABI3 reportada en arroz (ABI3 IP *Osa*; 82% de identidad y 91% de similitud) y en *A. thaliana* (ABI3 IP *Ath*; 73% de identidad y 84% de similitud). Los residuos sombreados en negro son idénticos en todas las secuencias, en gris se somborean los residuos con características similares.

**cDNA-AFLP 48**    ----DHMRKAGDVCFSKVYREGGGTVGIVDYTNYYDDMKYAIKKLDDT--  
 ASF/SF2 *Osa*      QDLKDHMRNAGDVCYSEVYREGGGTIGIVDYTNYYDDMKYAIRKLDDSEF  
 ASF/SF2 *Zma*      QDLKDHMRNAGDVCFTDVYREAGATIGIADYTNYYEDMKHAI<sub>R</sub>KLDDSEF  
 ASF/SF2 *Ath*      QDLKDHMRKAGDVCFAEVT<sub>RD</sub>SDGTYGVVDYTNYYDDMKYAIRKLDDTEF

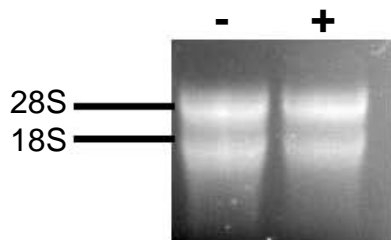
**Figura 29.** Alineamiento a nivel de proteína del fragmento cDNA-AFLP 48 con el factor de splicing alternativo ASF/SF2 reportado en maíz (ASF/SF2 *Zma*; 97% de identidad y 100% de similitud), arroz (ASF/SF2 *Osa*; 86% de identidad y 97% de similitud) y *A. thaliana* (ASF/SF2 *Ath*; 79% de identidad y 90% de similitud). Los residuos sombreados con color negro son idénticos en todas las secuencias, los sombreados con color gris son residuos con características similares.

**cDNA-AFLP 52**    ---IDEMNKIEAYAQT<sub>KND</sub>PLFL<sub>LD</sub>LAKNH-----  
 IN2-1 *Zma*        QEFIDEMNKIEAYAQT<sub>KND</sub>PLFL<sub>LD</sub>LAKSHLKIA--  
 GST *Osa*         EK<sub>F</sub>IEEINRIEAYT<sub>Q</sub>T<sub>KND</sub>PLYLL<sub>LD</sub>LAKTHL<sub>KAR</sub>PL  
 IN2-1 *Tae*        ERYTEEMNKIEAYK<sub>Q</sub>T<sub>KNV</sub>PLALL<sub>DA</sub>KRHLKIA--

**Figura 30.** Alineamiento a nivel de aminoácidos del fragmento cDNA-AFLP 52 con las enzimas Glutacion S Transferasas reportadas para maíz (IN2-1 *Zma*; 96% de identidad y 100% de similitud) y arroz (GST *Osa*; 77% de identidad y 92% de similitud) y trigo (IN2-1 *Tae*; 76% de identidad y 80% de similitud). En negro se somborean los residuos idénticos en las tres secuencias y en gris los residuos que presentan características similares.

## CORROBORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE LA GERMINACIÓN DE LOS GENES IDENTIFICADOS.

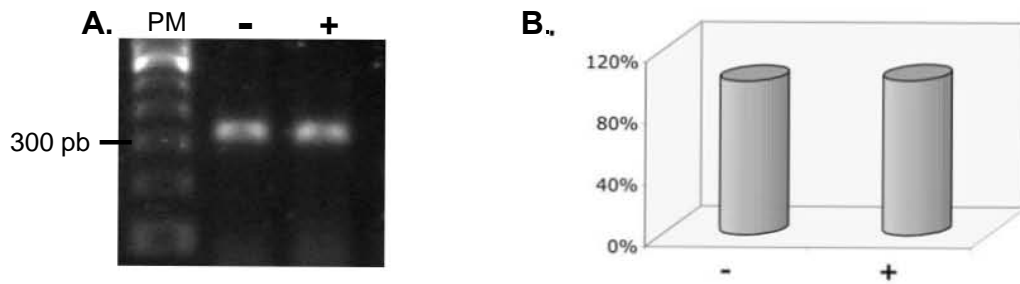
La expresión diferencial de los 6 fragmentos de genes identificados y secuenciados cDNA-AFLP 12, cDNA-AFLP 17, cDNA-AFLP 26, cDNA-AFLP 30, cDNA-AFLP 48 y cDNA-AFLP 52 que presentaron similitud con proteínas ya reportadas en las bases de datos, AGM, MIPS, RLK1, IP ABI3, ASF/SF2 y IN2-1 respectivamente, se verificó mediante RT-PCR. Para realizar estos ensayos se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los fragmentos (ver métodos). En primer lugar, estos ensayos se realizaron usando como templado cantidades similares de RNA total (Figura 31) de semillas sin germinar y semillas germinadas (mezcla de germinación).



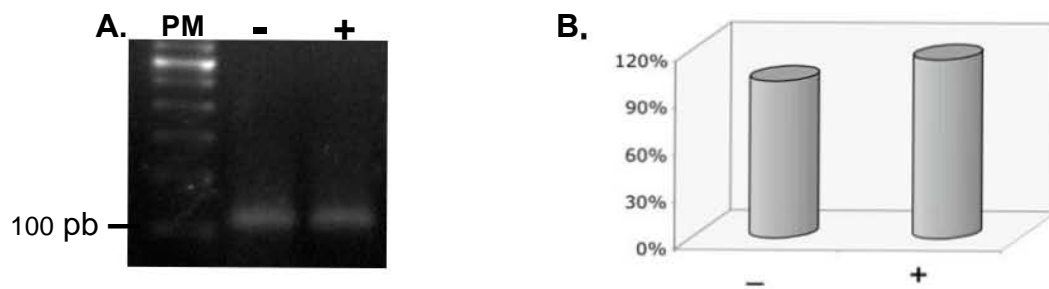
**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y teñido con bromuro de etidio que muestra la integridad y Control de cargado de los RNAs totales extraídos de embriones de semillas sin germinar (-) y mezcla de semillas germinadas (+).

Previo a las RT-PCR de cada uno de los fragmentos de genes clonados, se realizó una RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de ubiquitina, el producto de amplificación esperado al usar estos oligonucleótidos es de 300 pares de bases. Dado que la expresión de este gen no se altera por efecto de la germinación, lo usamos como control de carga, debido a que la enzima Transcriptasa Reversa no siempre tiene la misma eficiencia al sintetizar la primera cadena de cDNA y por lo tanto, con un control de carga aseguramos que las diferencias de expresión observadas sean reales y no se deban a diferencias en las concentraciones de molde usadas en las reacciones de PCR. En la Figura 38 se muestra la separación electroforética de esta RT-PCR y se observa la banda esperada de ubiquitina de 300 pares de bases. La densitometría de la Figura 39 G muestra la similitud de intensidad de estas bandas. Las RT-PCR posteriores se realizaron con base a esta calibración de cDNA de cadena sencilla. Para cada RT-PCR se realizó un análisis densitométrico en el cual la expresión encontrada en embriones de semillas sin germinar se consideró como el 100%.

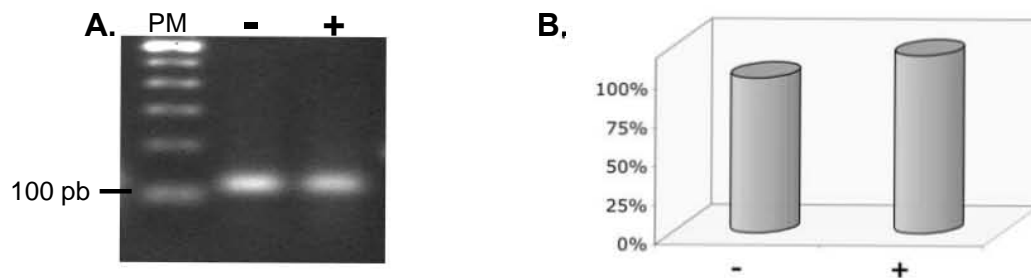
Con excepción de la secuencia homóloga a RFK1, cuya abundancia no se modificó por efecto de la germinación (Figura 32), el resto de las secuencias incrementaron su abundancia durante la germinación. Este incremento fue discreto en el caso de los fragmentos homólogos a las proteínas MIPS (14%; Figura 33) y IN2-1 (15%; Figura 34); moderado en el caso de los que presentaron homología a IP-ABI3 (67%; Figura 35) y ASF/SF2 (64%; Figura 36); y pronunciado en el caso de AGM (346%; Figura 37).



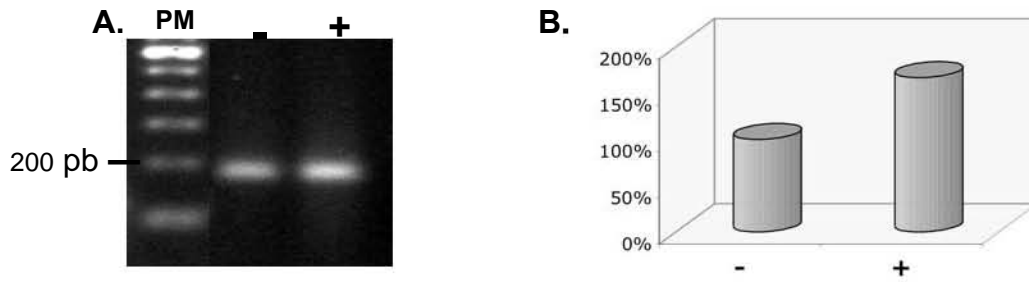
**Figura 32.** Análisis de la expresión del fragmento de 329 pb, cDNA-AFLP 26, que presentó homología con el receptor tipo cinasa de serina/treonina RFK1. **A.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR; **B.** Análisis densitométrico de la expresión; embriones sin germinar (-), embriones germinados (+), peso molecular (PM).



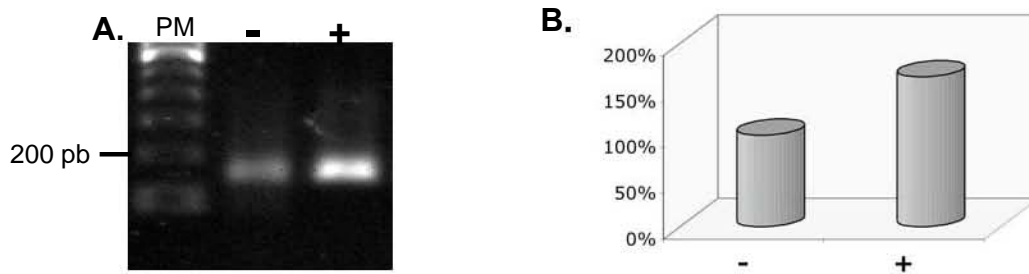
**Figura 33.** Análisis de la expresión del fragmento cDNA-AFLP 17, de 100 pb que es homólogo a la enzima Mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS). **A.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR; **B.** Análisis densitométrico de la expresión; embriones sin germinar (-), embriones germinados (+), peso molecular (PM).



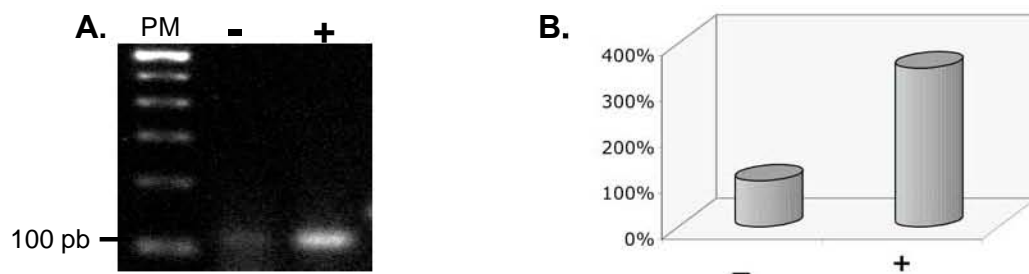
**Figura 34.** Análisis de la expresión del fragmento de 116 pb, cDNA-AFLP 52, que presentó homología con la enzima IN1-2. **A.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR; **B.** Análisis densitométrico de la expresión; embriones sin germinar (-), embriones germinados (+), peso molecular (PM).



**Figura 35.** Análisis de la expresión del fragmento de 184 pb, cDNA-AFLP 30, homólogo a una proteína que interactúa con ABI3 (IP ABI3). **A.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR; **B.** Análisis densitométrico de la expresión; embriones sin germinar (-), embriones germinados (+), peso molecular (PM).



**Figura 36.** Análisis de la expresión del fragmento cDNA-AFLP 48, de 152 pb que presentó homología con el factor de splicing alternativo ASF/SF2. **A.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR; **B.** Análisis densitométrico de la expresión; embriones sin germinar (-), embriones germinados (+), peso molecular (PM).

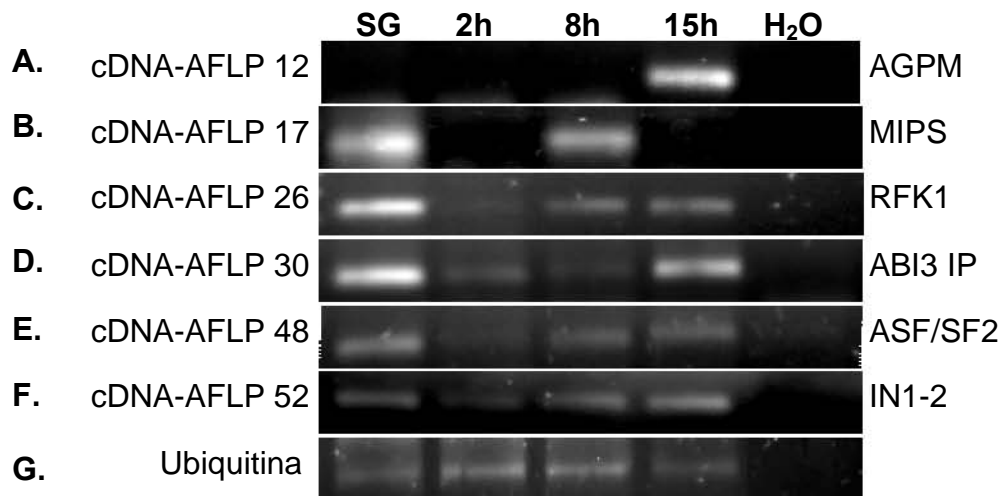


**Figura 37.** Corroboración de la expresión diferencial del fragmento de 112pb, cDNA-AFLP 12, homólogo a la enzima N-acetilglucosamina fosfato mutasa (AGPM). **A.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR; **B.** Análisis densitométrico de la expresión; embriones sin germinar (-), embriones germinados (+), peso molecular (PM).

En la Figura 38, se muestra un curso temporal de la expresión de las 6 posibles proteínas clonadas estudiado por RT-PCR.

Tanto en la electroforesis (Figura 38 A) como en el análisis densitométrico (Figura 39 A) el fragmento homólogo a la enzima AGM (acelilglucosamina fosfato mutasa), se expresa hasta las 15 h de imbibición de las semillas de maíz. El fragmento clonado cDNA-AFLP 17 con homología a la MIPS presenta niveles de expresión cíclicos, aunque se expresa en embriones sin germinar, a las 2 h de imbibición su expresión no se detectó; sin embargo, a las 8h de germinación nuevamente este se expresa (64% con respecto a los embriones sin germinar) y finalmente, transcurridas 15 h de imbibición la expresión no se detecta; el análisis densitométrico se muestra en la Figura 39 B.

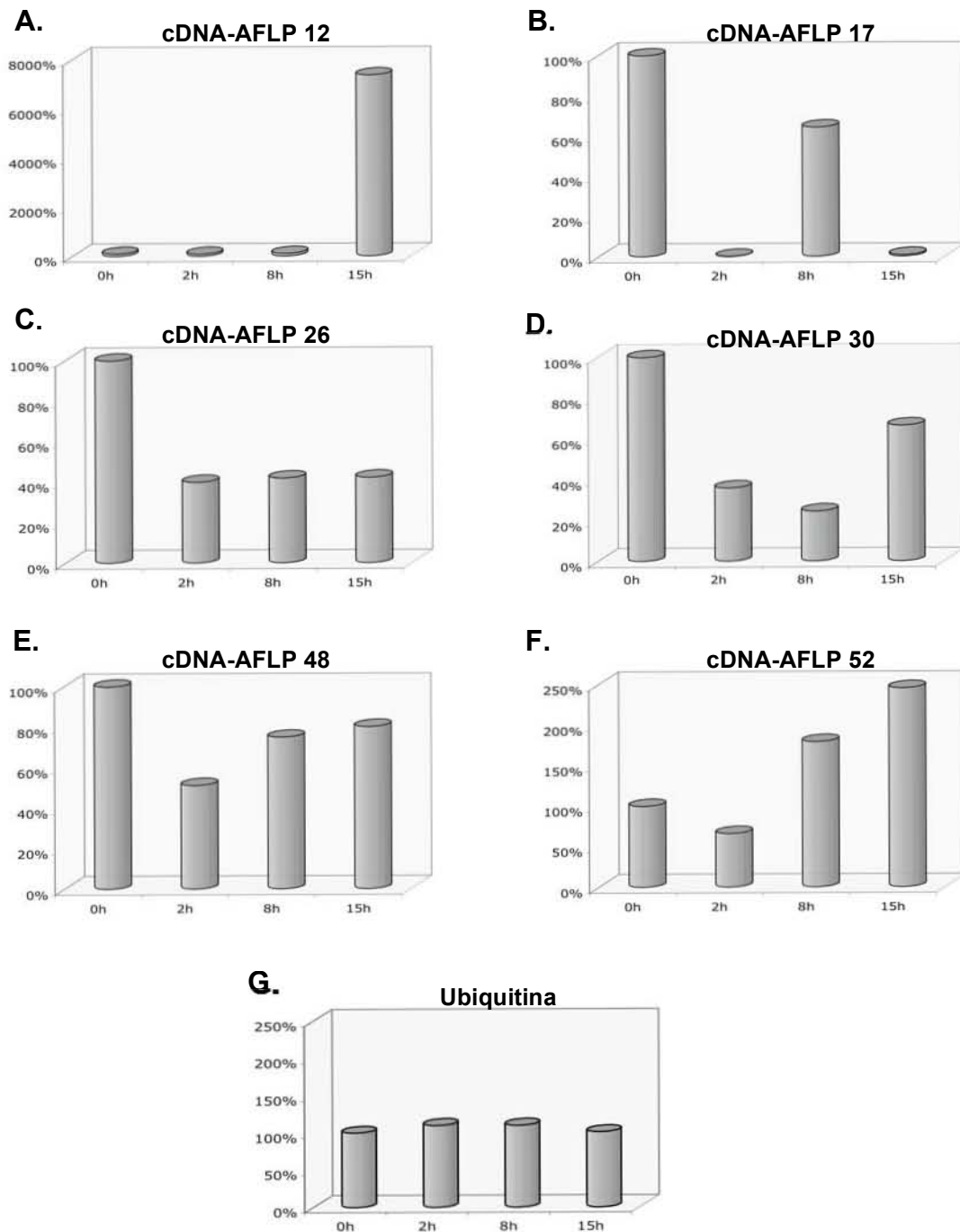
En cuanto al fragmento cDNA-AFLP 26 homólogo a RFK1, este se expresa en embriones de semillas sin germinar, pero transcurridas 2 h de germinación, la expresión disminuye 61% con respecto a la observada a las 0 h de germinación. Aunque la expresión aumenta conforme avanza el tiempo de imbibición, solo alcanza el 42% de intensidad; por lo tanto el aumento observado es pequeño (Figura 38 C y 39 C).



**Figura 38.** Separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por RT-PCR a diferentes tiempos de germinación. Izquierda, nomenclatura del fragmento clonado; derecha, proteínas con las cuales presentan homología. AGPM (Acetilglucosamina fosfato mutasa), MIPS (mio-inositol 1-fosfato sintasa), RFK1 (Receptor tipo cinasa de serina/treonina), ABI3 IP (Proteína que interactúa con ABI3), ASF/SF2 (Factor de splicing alternativo SF2) IN1-2 (Miembro de la superfamilia de las Glutation S Transferasa). SG, embriones sin germinar.

El fragmento del gen cDNA-AFLP 30 homólogo a ABI3-IP se expresa en embriones sin germinar. A las 2 h de germinación, la expresión de este gen disminuye 64% y a las 8 h disminuye aun más (75%), y es hasta las 15 h de imbibición cuando se observa una aumento

en su expresión (66%), sin que llegue a alcanzar el nivel observado a las 0 h de imbibición (Figura 38 D y 39 D).



**Figura 39.** Análisis densitométrico de la expresión de los genes a diferentes tiempos de germinación. **A.** cDNA-AFLP 12 homólogo a AGPM; **B.** cDNA-AFLP 17 homólogo a MIPS; **C.** cDNA-AFLP 26 homólogo a RFK1; **D.** cDNA-AFLP 30 homólogo a IP ABI3; **E.** cDNA-AFLP 48 homólogo a ASF/SF2; **F.** cDNA-AFLP 52 homólogo a IN1-2 **G.** Ubiquitina como control de carga.



También en las Figuras 38 E y 39 E, se muestra que el fragmento homólogo al factor de splicing alternativo ASF/SF2, cDNA-AFLP 48, aumenta su nivel de expresión al avanzar la germinación. A las 2 h se observa una expresión menor que la observada en embriones no germinados, la expresión decae hasta 51%, sin embargo aumenta de forma continua a las 8 y 15 h (75% y 80% respectivamente).

Del mismo modo, el fragmento del gen cDNA-AFLP 52 homólogo a la enzima IN1-2 miembro de las GST, presentan expresión en embriones de semillas no germinadas; la expresión temporal durante la germinación aumenta conforme avanza el proceso de germinación. En la Figura 39 F se muestra el análisis densitométrico de la expresión temporal de este fragmento durante la germinación. En él se muestra que a las 2 h de germinación la expresión de este fragmento es 34% menor que la observada en embriones sin germinar, pero es mayor a las 8 h de germinación (180%) y continúa su aumento, ya que a las 15 h de imbibición se observa que su expresión es 245% mayor.

Los resultados anteriores muestran que existe expresión diferencial de los genes en estudio durante la germinación. A pesar de que se expresaron en embriones de semillas de maíz sin germinar, al parecer se transcriben *de novo*. La amplificación que se observa en embriones de semillas germinadas, puede deberse a que los transcritos de estos genes provienen de las fases de maduración y desecación de las semillas que están parcialmente degradados en su extremo 3' y que como los cDNA-AFLPs fueron generados con mRNA, estos transcritos residuales no se aislaron junto con los demás mensajes. Pero como la corroboración de la expresión de estos genes por RT-PCR se hizo con RNA total, los transcritos parcialmente degradados sí están presentes.

La germinación involucra cambios en la expresión génica que conducen a la síntesis de proteínas específicas de este estado de desarrollo (Bewley y Black, 1994; Gallardo *et al.*, 2002; Rajjou *et al.*, 2004; Potokina *et al.*, 2002). A la fecha, para semillas quiescentes, en las que la protrusión de radícula se presenta antes de la movilización de las reservas, existe muy poca información acerca de la identidad de estos genes. Utilizando la técnica de cDNA-AFLP se identificaron 413 fragmentos derivados de transcritos, diferencialmente expresados durante el proceso de germinación del maíz, los cuales fueron agrupados de acuerdo a su detección cuantitativa (Figura 7). El primer grupo de transcritos deberá estar formado por los genes residuales de los programas de maduración y desecación de la semilla, los cuales generalmente se degradan o disminuyen su abuncia durante las primeras horas de germinación. Este grupo está representado por el 53 % de los fragmentos detectados, de los cuales 43 % disminuyen su nivel de expresión durante la germinación y 10 % se expresan únicamente en semillas sin germinar. El restante 47 % de fragmentos derivados de transcritos comprendió dos subgrupos de genes; en el primero se encuentran los genes cuya expresión se incrementó durante la germinación (29 % de los transcritos), y que comprende los genes del metabolismo básico celular, que durante la germinación se reactiva e incrementa notablemente, siendo ésta la razón por la cual los transcritos de estos genes estarían presentes en la semilla seca y se verían incrementados en embriones germinados. En el segundo subgrupo, se encuentran los genes que fueron inducidos durante la germinación (17 %), siendo estos 75 fragmentos los que se escogieron para desarrollar el presente trabajo. De estos, sólo se pudieron clonar 15, siete de los cuales presentaron un alto porcentaje de identidad con ESTs de maíz, uno no presentó similitud con ninguna secuencia reportada y seis fueron similares a proteínas con función conocida. Cuando la expresión de estos seis genes se estudió a diferentes tiempos de germinación, se encontró que en todos los casos, el mRNA estaba presente en el embrión seco. La diferencia en el comportamiento cuantitativo de los genes identificados en el momento de la detección por cDNA-AFLP y por RT-PCR, podría deberse a que para el primer análisis se utilizó mRNA y para el segundo RNA total. Existe la posibilidad de que en semilla seca los transcritos residuales sean degradados parcialmente en su extremo poli A y por eso no hayan sido detectados en el mRNA de estas mismas semillas. O bien a que los genes específicos de la germinación se encuentran entre los genes cuya expresión se incrementa. A continuación se describen las funciones de estos genes y su posible participación en la germinación.

FUNCIÓN DE LOS GENES CUYOS TRANSCRITOS SE ACUMULAN DURANTE LA GERMINACIÓN Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN ESTE PROCESO.

### ***Genes que participan en la señalización celular***

La **Acetil glucosamina fosfato mutasa** (AGM; fragmento cDNA-AFLP 12) es una enzima que pertenece a la familia de las hexosa-fosfato mutasas. Cataliza la interconversión reversible de N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcN-6-P) y N-acetilglucosamina 1-fosfato (GlcN-1-P; Jolly, 2000). Esta enzima ha sido caracterizada en animales (humano y ratón: Li *et al.*, 2000), bacterias (*Escherichia coli*: Jolly *et al.*, 1999), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*: Hofmann *et al.*, 1994) y en algunas plantas (*Arabidopsis*, maíz y arroz; Hofmann, *et al.*, 1994). Su importancia radica en que es una enzima esencial en la síntesis de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Este gliconucleótido proporciona la N-acetilglucosamina para la glicosilación de proteínas, ya sea en el sistema de retículo endoplásmico y Golgi o en el citoplasma y núcleo. En el primer caso la modificación se realiza principalmente en un residuo de asparagina y el destino de estas proteínas es el de ser secretadas o formar parte de las membranas (Hofmann *et al.*, 1994, Li *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2002). Mientras que en el segundo caso la modificación se realiza en residuos de treonina o serina y en todos los casos las proteínas blanco forman parte de complejos supramoleculares. Se postula que esta modificación participa en la señalización celular de una manera similar a la fosforilación (Hanover, 2001).

En levaduras y bacterias se ha reportado que el gen que codifica a la AGM es esencial para la viabilidad y el crecimiento celular (Hofmann *et al.*, 1994), por su participación en la formación del precursor UDP-GlcNAc del peptidoglicano de la pared celular. Si algunos de los peptidoglicanos de la pared celular en maíz también están formados de GlcN-1-P, la actividad de esta enzima sería fundamental durante el proceso germinativo, durante el cual se requiere la remodelación de la pared celular y por tanto resulta indispensable sintetizar polímeros de pared celular para mantener y asegurar la viabilidad y el crecimiento celular (Hofmann *et al.*, 1994; Jolly *et al.*, 2000). Otro de los eventos importantes de la germinación es la biogénesis de membranas. Para este proceso, es necesario contar con proteínas glicosiladas que formen parte de las estructuras membranales. (Jolly *et al.*, 2000). Dado que en levaduras se ha demostrado que la AGM está involucrada en el proceso de glicosilación de proteínas (Hofmann *et al.*, 1994), cabe la posibilidad de que en maíz, la AGM esté glicosilando a proteínas que constituirán parte de las nuevas membranas.

Por otro lado, durante la germinación debe realizarse una significativa remodelación de cromatina, ya que durante este proceso se requiere activar la transcripción de ciertos genes e inhibir la transcripción de otros. Es decir, apagar el programa de maduración y desecación de la semilla y activar el programa de germinación. Lo anterior, requiere de cambios post-traduccionales en algunas de las proteínas cromosomales que permitan la transición de regiones de cromatina transcripcionalmente activas a regiones transcripcionalmente inactivas y viceversa. Dado que en células animales se ha demostrado que la interacción proteína-proteína, proteína-DNA y la actividad de proteínas cromosomales puede modificarse por glicosilación con GlcNAc (factores de transcripción, nucleoporinas, oncoproteínas RNA-polimerasa II), es posible que en semillas de maíz en germinación esté ocurriendo un proceso similar y por tanto requerirse la expresión de AGM cuya función constituye un paso esencial para la biosíntesis de GlcNAc. Aún más, encontramos que la transcripción de este gene se incrementa casi 3.5 veces respecto al control, 15 h después de iniciada la imbibición (Figura 38), tiempo en el cual la síntesis de proteínas que asegura el éxito de la germinación, depende completamente de mRNAs sintetizados de *novo* (Sánchez y Aguilar, 1984). Todo lo anterior sugiere que el gen de la AGM podría ser un gen germinación específico.

Un segundo gene cuyos transcritos se expresan diferencialmente durante la germinación es el que codifica para la **mio-inositol-1-fosfato sintasa** o MIPS (*EC 5.5.1.4*), la cual cataliza la reacción de glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) a Inositol 1-fosfato (I(1)P). Posteriormente, mediante una fosfatasa, el inositol 1-fosfato es convertido a mio-inositol. La MIPS es una enzima altamente conservada en la escala filogenética (Johnson, 1994); contiene tres motivos conservados que definen los dominios funcionales de la enzima (Majumder *et al.*, 1997). La secuencia que se clonó a partir de embriones germinados, se encuentra a 7 residuos de aminoácidos de uno de los tres dominios conservados de estas enzimas, conformado por la secuencia SYNHLGNNDG (Fig. 25). En los tejidos de las plantas, han sido reportadas dos formas de MIPS, una citosólica que se ha involucrado en importantes reacciones metabólicas, y la de cloroplasto asociada con membranas tilacoides y regulada por las condiciones de luz (Chun *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* y en maíz se encontraron dos genes activos para la primera especie (Johnson, 1994; Johnson y Burk, 1995; Johnson y Sussex, 1995) y siete loci con secuencias homólogas a MIPS para la segunda (Larson y Raboy, 1999). En este último caso no se demostró la funcionalidad de todos los loci. Sin embargo la existencia de múltiples genes de MIPS permite la expresión diferencial de MIPS para muchas y diferentes funciones fisiológicas (Hegeman *et al.*, 2001).

El mio-inositol y el inositol-1-fosfato (I(1)P), son metabolitos cuya biosíntesis es regulada por la MIPS, esenciales para la sobrevivencia de células eucarióticas, ya que participan en diversas rutas metabólicas (Hegeman *et al.*, 2001). El I(1)P es utilizado en la síntesis de fosfoinosítidos que forman parte de las membranas plasmáticas, los cuales son involucrados como fuente de segundos mensajeros en las vías de señalización del fosfatidilinositol (Hegeman *et al.*, 2001). Además, el I(1)P es fosforilado a ácido inositol hexacisfosfórico, o ácido fítico con fuertes uniones a cationes metálicos ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , y  $Zn^{2+}$ ), vía asociación iónica con fosfatos cargados negativamente (Lott *et al.*, 1995) y constituye la reserva de fósforo y iones de la semilla. Por su parte, el mio-Inositol combinado con galactosa es incorporado a los azúcares de la familia de la rafinosa. Este oligosacárido está presente en semillas y representa una forma de almacenamiento de carbohidratos (Yoshida *et al.*, 1999). Los mio-inositoles oxidados sirven como componentes celulares de las gomas y los azúcares precursores de polímeros no celulósicos de pared celular como la xilosa, la arabinosa, el ácido glucourónico y el ácido galactourónico. Estos carbohidratos también participan en la biosíntesis de la región glicada de las glicoproteínas y mucílagos (Loewus y Loewus, 1983); por otra parte, los mio-inositoles metilados se involucran en la osmoprotección en plantas halofíticas (Ishitani *et al.*, 1996).

El hecho de que el transcrito de la MIPS haya sido encontrado en el embrión de semillas secas podría deberse al hecho de que durante la formación de la semilla, la MIPS es expresada porque participa en la síntesis de inositol, metabolito precursor de la fitina y de la rafinosa, dos compuestos sintetizados durante la deposición de reservas de la semilla en desarrollo y por tanto la MIPS estaría presente en la semilla seca y constituiría un transcrito residual. De hecho, durante el desarrollo de la semilla de frijol se ha demostrado que 1) la MIPS es localizada en diferentes órganos (raíz, hojas, suspensor y/o embrión y cotiledones) y que 2) estas formas de la enzima están presentes en diferentes estados del desarrollo (estado I y II: donde se forma el suspensorio del óvulo y los cotiledones respectivamente) por lo que estas enzimas reflejan controles regulatorios a niveles transcripcionales y transduccionales y aporta más evidencias de que isoformas de la MIPS participan durante todo el desarrollo de la semilla, desempeñando funciones particulares, dependiendo de la etapa en que se encuentre la semilla (Johnson, 1994). Por otro lado, el hecho de que durante la germinación la expresión sea cíclica y su nivel de expresión siempre esté por debajo del nivel detectado en embrión seco, sugiere que el gene expresado en la germinación de la semilla es diferente del expresado durante el desarrollo de la misma y que quizá la máxima expresión de este nuevo transcrito se da a tiempos tardíos de la

germinación, como se reportó para semillas de ajonjolí en las cuales se incrementaron los niveles de expresión de la MIPS 24 h después de la germinación (Chun *et al.*, 2003).

Las clonas que se han encontrado recientemente con altas identidades a MIPS en *Arabidopsis*, *Phaseolus vulgaris*, *Citrus paradisi*, etc., muestran que sus transcritos se inducen en estrés por sal y frío y en respuesta al fotoperíodo (Ishitani *et al.*, 1996). Por otro lado, en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) se ha demostrado que una disminución del nivel celular de inositol provoca pérdida en la viabilidad celular, mientras que en células de plantas cultivadas, la reducción de este metabolito inhibe la división celular (Yoshida *et al.*, 1999). Durante la germinación, la MIPS podría estar manteniendo los niveles de inositol requeridos para mantener la viabilidad de la célula y preparándola para la división celular a realizarse poco después que haya concluido la germinación. Asimismo, podría participar en numerosos procesos indispensables que se llevan a cabo durante la germinación, como formación de pared celular, biogénesis de membrana, defensa contra diferentes tipos de estrés y generación de fosfoinosítidos que participan en numerosas cascadas de señalización, no es extraño el haberla encontrado como uno de los genes que se expresa durante la germinación, aunque no podemos decir con precisión si este transcrito es específico de los eventos que acompañan este proceso, pues se encuentra también en semillas secas.

Por otra parte, el fragmento cDNA-AFLP 26 presentó a nivel de aminoácidos una identidad del 65% y un 72% de similitud con el receptor tipo cinasa de serina/treonina (RFK1) de arroz (Figura 27). Este es un tipo de receptores característico de plantas. Es importante destacar que las secuencias de aminoácidos de esta familia de proteínas no son conservadas, sin embargo, dependiendo de la subclase a la que pertenecen, contiene pequeños dominios, que las clasifica dentro de uno de las cuatro subclases descritas para estos receptores. Desafortunadamente, ninguno de ellos están incluidos en la secuencia obtenida. Sin embargo, el porcentaje de identidad y el valor de E encontrado ( $10^{-9}$ ) sugiere que se trata de un homólogo de esta proteína.

Los receptores tipo cinasa (RLK o receptor like cinasa) de plantas presentan rasgos topológicos de receptores de tirosina, pero contienen secuencias de motivos característicos de cinasas serina/treonina (Yamamoto y Knap, 2001; Shiu y Bleecker, 2001; Breckraft, 1998). Se caracterizan por tener un péptido señal hidrofóbico en el extremo amino terminal, y una secuencia interna hidrofóbica seguida por una secuencia básica, que constituye la secuencia

señal para su localización (“stop-transfer”) sugiriendo que se trata de un proteína de membrana tipo II, la cual tiene una sola hélice transmembranal. Los dominios cinasa de las proteínas se localizan en las regiones intracelulares del C terminal (Hardie, 1999; Shiu *et al.*, 2004). Estos receptores perciben las señales a través de sus dominios extracelulares y las propagan mediante su dominio cinasa intracelular. Consistente con lo anterior, los ligandos de muchas RLKs ha sido identificados y encontrados como componentes integrales de las vías de señalización de los RLKs (Shiu *et al.*, 2004).

Las funciones biológicas de los RLKs de plantas pueden clasificarse en dos grandes categorías. La primera categoría incluye RLKs que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Becraft, 2002), por ejemplo en *A. thaliana*, ERECTA determina la forma de los órganos (Torii *et al.*, 1996), CLAVATA1 interviene en el mantenimiento del meristemo (Clark *et al.*, 1997) y BR11 involucrado en la regulación del crecimiento celular (Li and Chory, 1997). Por otro lado, en maíz CRINKLY4 juega un papel en el control de la morfogénesis celular y la diferenciación (Becraft *et al.*, 2002), y en zanahoria (*Daucus carota*) PSKR, está relacionada con el control de la proliferación celular (Shiu *et al.*, 2004). La segunda categoría incluye RLKs involucrados en interacciones planta-microorganismo (Shiu *et al.*, 2004; Hardie, 1999). En esta categoría, algunas RLKs están involucradas en interacciones planta-patógeno, por ejemplo en arroz (*Oriza sativa*) Xa21e proporciona resistencia a bacterias patógenas (Song *et al.*, 1995), FLS2 esta involucrado en percepción de flagelos bacterianos en *Arabidopsis* (Gomez-Gomez and Boller, 2000), SR160 en señalización sistémica en tomate (*Lycopersicon esculentum*), mientras que el resto son cruciales en las interacciones simbióticas incluyendo NORK/SYMRK y HAR1 en simbiosis fúngica y/o bacterial (Krusell *et al.*, 2002) y los motivos Lys que contienen las RLKs involucradas en los estados tempranos de nodulación y percepción del factor Nod (Shiu *et al.*, 2004).

Debido a que existen diferentes tipos de RLKs y a que el fragmento identificado como cDNA-AFLP 26 no contiene las secuencias que permitan su clasificación, no es posible proponer su función específica en la germinación de las semillas de maíz. Sin embargo, su localización en membrana plasmática lo hace un buen candidato para integrar la serie de señales externas e internas que la semilla debe percibir, integrar e interpretar para germinar de manera exitosa. Entre los factores ambientales críticos que la semilla debe percibir para el desarrollo exitoso de la germinación y la futura sobrevivencia de la plántula están el agua, la temperatura, la luz y algunos patógenos del suelo. Así como también debe responder a los diferentes factores de

crecimiento de las plantas, como ABA, auxinas, citocinas, etileno, GA, entre otras (Wang *et al.*, 1998). En otros sistemas se ha reportado que en la percepción y transducción de estos factores participan la fosforilación de proteínas a través de cinasas de proteínas (Yang *et al.*, 2004). Por otro lado, a lo largo del proceso de germinación también es necesario que procesos como crecimiento, morfogénesis, diferenciación y proliferación celular, interacción entre paredes celulares y membranas, desarrollo de órganos y sistemas de defensa contra patógenos sean reguladas y en todos estos casos se ha reportado la participación de receptores tipo cinasa de serina/treonina (RLKs).

Al estudiar la expresión temporal de cDNA-AFLP-26 durante la germinación (Fig. 38 y 39) se observó amplificación en semillas no germinadas; a las dos h de iniciada la germinación, el nivel de expresión disminuyó 61% y se mantuvo en esos niveles hasta las 15 h de imbibición. Por lo anterior, aunque un RLK podría tener funciones importantes y/o críticas en el desarrollo de la germinación, no podemos decir que este fragmento en particular sea un gen germinación-específico, ya que no se obtuvo evidencia de que se sintetice de *novo* como en el caso del gen homólogo a la MIPS, que deja de expresarse en las primeras h de imbibición para después inducirse nuevamente.

#### ***Procesamiento del mRNA.***

El cDNA-AFLP 48 presentó homología con un factor de splicing alternativo. La remoción de intrones del pre-mRNA (splicing) es un paso crucial en la expresión de genes eucarióticos (Petersen *et al.*, 1999). Los intrones de las plantas contienen secuencias conservadas de GU y AU, rodeados por secuencias consenso similares a las de animales y levaduras (Lopato *et al.*, 1999). Este splicing puede ser siempre en mismo orden o bien alternativo para producir diferentes mRNAs que codifican a proteínas con diferentes funciones fisiológicas (isoformas) frecuentemente tejido-específicas o desarrollo-específicas y es un importante mecanismo de regulación de la expresión de genes (Gao *et al.*, 2004), contribuyendo de este modo a la diversidad de los genes producidos y a la regulación de la expresión genética como en la determinación del sexo en *Drosophila* (Gao *et al.*, 2004). El splicing alternativo se realiza por una serie de proteínas denominadas factores de splicing alternativo y que son miembros de la familia SR. Estos factores son ricos en serina y arginina (Lopato *et al.*, 1999), y funcionan como activadores o represores de splicing, dependiendo del sitio de unión al pre-mRNA (Petersen *et al.*, 1999). También interactúan entre ellos a través de las interacciones del dominio SR y así reclutan otras proteínas clasificadas como proteínas no SR al spliceosoma (Petersen *et al.*,



1999). El mecanismo mediante el cual se realiza el splicing alternativo es a través de la unión del factor de splicing alternativo, ya sea directamente o a secuencias cercanas del intrón en el premRNA, convirtiendo de este modo una débil señal de splicing alternativo a una más fuerte, a través de un sitio de splicing eficientemente seleccionado (Lopato *et al.*, 1999). Una forma común de splicing alternativo en plantas es la retención del intrón, el cual probablemente refleje un pobre reconocimiento del intrón o bien la inhibición de la reacción de splicing (Brown y Simpson, 1998).

El splicing alternativo ha sido documentado en numerosos genes de plantas. Los factores de transcripción que en plantas regulan numerosas vías son frecuentemente encontrados como productos de splicing alternativo como es el caso del transcrito Vp-1 en trigo (McKibbin *et al.*, 2002) y los genes *r1* (Procissi *et al.*, 2002) y MADS box (Gao *et al.*, 2004) ambos en maíz. Algunos sistemas de defensa contra patógenos en tabaco, *Arabidopsis* y tomate dependen del splicing alternativo, como herramienta de los receptores de señalización para emitir la respuesta (Gao *et al.*, 2004). Las vías de respuesta sistémicas a heridas en plantas de tomate involucra el splicing alternativo de prosistemina (Li y Howe, 2001). Las respuestas de las plantas a factores ambientales como luz o concentraciones de sal, así como el control del tiempo de floración, requiere splicing por proteínas SR-like o genes producidos por splicing alternativo (Forment *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004).

El factor ASF/SF2 es miembro de la familia SR. Gao y colaboradores (2004) describieron en maíz tres genes de splicing similares al ASF/SF2 de humanos, *zmSRp30*, *zmSRp31* y *zmSRp32*; sin embargo, existe la posibilidad de que existan más homólogos de SF/SF2 en maíz. Los tres genes de maíz son funcionales a juzgar por su acumulación de transcritos en diferentes tejidos de las plantas. Los transcritos de *zmSRp30* y *zmSRp31* se encontraron en diferentes estados del desarrollo y órganos de la planta, mientras que los transcritos de *zmSRp32* se acumularon en las zonas meristematicas tanto de la planta como en embriones inmaduros. También en maíz, se ha descrito a un factor de splicing que puede realizar splicing constitutivo y tiene la capacidad de regular el splicing alternativo cuando se sobreexpresa *in vivo* o se añade un exceso *in vitro* (Petersen *et al.*, 1999). Asimismo, también se han identificado diversas secuencias similares al factor de splicing ASF/SF2 de humanos en el genoma de *Arabidopsis*. En ambos casos se ha descrito que los genes de los factores de splicing alternativo a su vez sufren splicing alternativo, lo que da lugar a varias isoformas. Tal es el caso del *atSRp34*, donde el intrón 9 es un sitio de splicing alternativo que genera cinco

isoformas de proteínas para el mismo pre-mRNA (Gao *et al.*, 2004).

Indiscutiblemente, muchos pueden ser los procesos que involucren la participación de proteínas derivadas de splicing alternativo durante la germinación, dado que durante este proceso la semilla queda expuesta a diferentes factores ambientales y a la acción de organismos patógenos que obstaculizan este proceso, por lo tanto, requiere de mecanismos como los de defensa contra patógenos y de respuesta a los diferentes factores ambientales que le permitan llevar a cabo con éxito la germinación. Pero la necesidad de productos de splicing alternativo de la semilla no está limitada a la germinación; evidentemente, la expresión de los genes ASF/SF2-like es importante en la embriogénesis, organogénesis y morfogénesis (Gao *et al.*, 2004). Inclusive, es indispensable durante el desarrollo de la plántula hasta la floración; es decir, existe evidencia suficiente que indica que el splicing alternativo es indispensable en todo el ciclo de vida de las plantas. Razón por la cual resulta interesante el haber encontrado la expresión de un homólogo al gen ASF/SF2 en semillas germinadas de maíz.

Por otra parte, al igual que el homólogo a ASF/SF2 de humanos, los genes reportados en maíz contienen la secuencia señal SWQDLK de los factores ASF/SF2 y el dominio SR (Gao *et al.*, 2004). Al secuenciar y analizar el fragmento clonado cDNA-AFLP 48, encontramos una parte de la secuencia señal característica de estos factores de splicing alternativo, QDLK (Figura 29), lo que confirma la posibilidad de que el cDNA-AFLP-26 provenga del transcrito de un gene similar al ASF/SF2 de maíz, fue por esto que al diseñar los oligonucleótidos para realizar los RT-PCRs tomamos la secuencia señal completa y con esto incrementamos la posibilidad de que el producto amplificado fuese un fragmento homólogo a este gen.

En cuanto a la expresión diferencial, por el resultado arrojado del RT-PCR indicó que el fragmento cDNA-AFLP 48 se expresa en embriones no germinados y que su expresión aumenta 64% con la germinación (Figura 36); al analizar la expresión temporal (Figura 38 y 39 E) vemos que a las dos h de germinación disminuye su expresión 49% con respecto a la observada en semillas sin germinar, lo que indica que la presencia encontrada en embriones sin germinar podría deberse a mensejes que se sintetizaron durante el desarrollo de la semilla, se mantuvieron durante la desecación y están siendo utilizadas en las primeras h de imbibición, pero que conforme avanza la germinación comienzan a sintetizarse de *novo*, puesto que su nivel de expresión aumenta un 70% y 80% a las 8 y 15 h respectivamente. Es decir, al parecer

se sustituyen los viejos transcritos por nuevos, ya sea por que se han degradado o por que ya han sido utilizados, pero evidentemente se continúan expresando durante toda la germinación.

### ***Plegamiento de Proteínas.***

El fragmento cDNA-AFLP 22.5 presentó homología a nivel de residuos de aminoácidos con la **Peptidil prolil cis-trans isomerasa** (PPIasa), que es una proteína ubicua presente en organismos eucarióticos y procarióticos. Su función es la de incrementar la velocidad de plegamiento de proteínas a través de la isomerización de enlaces peptídicos en los que participa la prolina (Martínez y Hegardt, 1995). Las PPIasas también reciben el nombre de inmunofilinas debido a que unen drogas inmunosupresoras. Se conocen dos familias de inmunofilinas: las ciclofilinas que unen ciclosporinas y el grupo de proteínas que unen FK506 y rapamicina (FKBP). En plantas, miembros de ambas familias han sido clonados y caracterizados. Estas proteínas se localizan en citosol, cloroplasto, mitocondria y retículo endoplásmico. Recientemente se ha demostrado que el transcrito de una de estas proteínas wFKBP73 se acumula en embriones de trigo germinado (Martínez y Hegardt, 1995; Breiman *et al.*, 1995). Dada su función y el hecho de que se acumule durante la germinación, la PPI podría proveer asistencia para el correcto plegado de las proteínas ricas en prolina que deben sintetizarse durante la germinación de maíz para la remodelación de pared celular requerida para la elongación celular. En maíz de la raza Chalqueño, el transcrito de una proteína de pared celular rica en hidroxiprolina se incrementó a las 12 h de iniciada la germinación logrando su máxima acumulación a las 24 h de germinación (Martínez y Hegardt, 1995; Breiman *et al.*, 1995).

### ***Genes Reguladores que participan en la transición de programas de desarrollo.***

El fragmento clonado cDNA-AFLP 30 presentó a nivel de residuos de aminoácidos un 82% de identidad con una posible proteína de arroz que interactúa con el factor de transcripción ABI3. Este factor y las proteínas homólogas en otras especies como VP1 en maíz (McCarty *et al.*, 1998), OsVP1 de arroz (Hattori *et al.*, 1994), PvAlf de frijol (Bobb *et al.*, 1995), AfVP1 en avena (Jones *et al.*, 1997), C-ABI3 en zanahoria (Shiota *et al.*, 1998), participan en la maduración de los embriones (Zhang *et al.*, 2005). Entre la evidencia que apoya esta propuesta está el hecho de que el transcrito de ABI3 y su proteína son abundantes en semilla madura, pero se degradan en las primeras horas de germinación (Kurup *et al.*, 2000; Finkelstein *et al.*, 2002). Aparentemente, ABI3 está involucrado en la respuesta de las semillas al fitorregulador ácido abscísico (ABA) durante la maduración del embrión, ya que mutantes de *Arabidopsis*,

maíz, avena, etc. que son deficientes en la síntesis de ABA o en la respuesta a esta hormona, tienen maduración y latencia, durante la embriogénesis somática (Finkelstein *et al.*, 2002; Parcy *et al.*, 1997). Para realizar su función, ABI3 interacciona con diversas proteínas, lo que le permite regular adecuadamente el gran número de procesos que ocurren durante la maduración del embrión. En *Arabidopsis* se han reportado al menos tres diferentes proteínas que interactúan con ABI y se denominan AIP-1, AIP-2 y AIP-3 (Kurup *et al.*, 2000). AIP-1 mostró alta homología con CONSTANS, una proteína que regula el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Estudios genéticos mostraron que la función de CONSTANS parece ser la represión de la función de ABI3 (Putterill *et al.*, 1995).

AIP-2 es un regulador negativo de la señalización de ABA y que ejecuta su función por poliubiquitinación de ABI3, convirtiéndolo en blanco del proteosoma 26S para su degradación. La interacción de ABI3 y AIP-2 *in vitro* sugiere que ABI3 es modificado por AIP-2 *in vivo*, cuya función es mantener los niveles de ABI3 reprimidos (Zhang *et al.*, 2005).

La proteína AIP3 de *Arabidopsis* fue identificada como homólogo a la proteína AfVIP3 de *Avena fatua* (Jones *et al.*, 2000), que interactúa con el homólogo VO1 de *A. fatua* (AfVP1; Jones *et al.*, 1997). Esta proteína muestra homología con el gen C1 de humanos y está involucrado en la regulación de la fase de transición de G<sub>1</sub> – S durante el ciclo celular (Kurup *et al.* 2000). Su expresión es abundante en mutantes de latencia reducida, pero aún no se conoce el modo de interacción con ABI3.

Dada la homología del fragmento cDNA-AFLP 30 con la AIP-2 de arroz y siendo la función de ésta la de promover la degradación de ABI, es de esperarse que durante la germinación de maíz la AIP-2 también desempeñe una función similar, permitiendo que se inhiba el programa de desarrollo de la semilla y se inicie el de germinación. El hecho de que el transcrito esté presente en semilla seca, no es sorprendente, ya que su producto debe ser requerido para completar adecuadamente el desarrollo de la semilla. Durante las primeras ocho h de germinación la abundancia de este transcrito disminuye hasta en un 75% y su acumulación se incrementa hacia las 15 h de germinación, aunque siempre por debajo de la observada en embriones sin germinar, este comportamiento indica que el mRNA está siendo sintetizado de novo. A medida que la germinación procede, los niveles de ABA o la sensibilidad del tejido al fitorregulador disminuyen (Zhang *et al.*, 2005), por lo que el resultado de que la expresión de genes ABA específicos, como AIP2 no inhiba su expresión, sugiere que durante las primeras 15

h de germinación, ciertas fases del programa de maduración de la semilla se han inhibido debido quizás a que los niveles de ABA, aún cuando hayan disminuído, son suficientes para mantener la expresión de algunos de los genes ABA-específicos.

Como la principal función de ABI3 es bloquear la fase de transición durante el desarrollo de la planta, la rápida destrucción de ABI3 es un pre-requisito para la germinación (Finkelstein *et al.*, 2002; Parcy *et al.*, 1997), y al parecer, es indispensable contar con proteínas que interactúen con ABI3 regulando negativamente su función o manteniendo sus niveles reprimidos. El fragmento de gen cDNA-AFLP 30 podría formar parte de una de estas proteínas y desempeñar un papel inhibidor de ABI3 para permitir que la germinación se lleve a cabo, razón por la cual nos parece de sumo interés el haberla encontrado en este estudio.

Una vez dilucidada la posible identidad del fragmento cDNA-AFLP 30, se realizaron ensayos de RT-PCRs para analizar su expresión diferencial, se observó un aumento del 67% en la intensidad de expresión en embriones de semillas germinadas con respecto a las no germinadas (Figura 35). De esta manera, al analizar el comportamiento de la expresión de este gen en el curso temporal de la germinación, encontramos que al inicio de la imbibición, la expresión disminuye hasta un 75% a las 8 h, pero a las 15 h de germinación comienza a recuperarse esta expresión, aumentando 60%, pero este valor sigue siendo menor que el observado en embriones de semillas sin germinar. El comportamiento anterior nos da evidencia de que el mensaje de esta proteína estaba presente en la semilla seca y que pudiera corresponder al programa de desarrollo, disminuyendo tal vez por efecto de degradación o por que está siendo traducido a proteína, y el aumento de expresión encontrado a las 15 h de germinación podría deberse a síntesis *de novo* de este mRNA. El comportamiento encontrado no resulta extraño si se toma en cuenta que para iniciar la germinación es necesario disminuir el efecto de ABI3 en la semilla, lo cual, como se mencionó anteriormente, se logra mediante la interacción de ABI3 con proteínas AIP de las cuales podría formar parte nuestro fragmento, y aunque no de forma activa, podría sintetizarse en etapas de embriogénesis tardía y comenzar a interactuar con ABI3 reprimiendo su función hasta que la semilla se encuentre lista para germinar.

#### ***Enzimas detoxificadoras y transportadoras.***

El cDNA-AFLP 52 presentó alta identidad con las proteínas IN2-1 de maíz y trigo (97% y 82% respectivamente) y con Cla30 (78%) también de trigo. Estas proteínas son miembros de las

superfamilia de las glutatión-S-transferasas (GSTs) inducidas por herbicidas seguros, un grupo de compuestos químicos diversos, no tóxicos, que incrementan el metabolismo de herbicidas en especies cultivadas de monocotiledóneas, vía el incremento en la actividad de GSTs (Marrs, 1996). Las enzimas glutatión-S-transferasas (E.C.2.5.1.18) catalizan la conjugación del tripéptido glutatión (GSH) a una gran variedad de herbicidas y otros citotóxicos. Una vez conjugadas estas moléculas son transportadas a la vacuola a través de transportadores que unen ATP, para posteriormente ser degradadas (Marrs, 1996). Algunas GSTs también actúan como peroxidasas dependientes de glutatión catalizando la reducción de lipoperóxidos y alquenos tóxicos. Otra de las funciones de las GSTs en plantas es la de servir como proteínas que unen ligandos de manera irreversible, tal es el caso del ácido cinámico, y cumárico o auxinas. Estos compuestos se unen a GSTs específicas pero no se conjugan con glutatión (Marrs, 1996). Aparentemente, en el caso de las auxinas es uno de los mecanismos de transporte de este regulador de crecimiento.

Las GSTs son codificadas por una familia de genes. En maíz se han detectado 42 genes, en frijol soya 23 y en *Arabidopsis* 45, al menos en maíz y en soya todos ellos se expresan. Independientemente de la función que estas proteínas desarrollan en la planta, la proteína funcional es un dímero formado por dos subunidades del mismo gen que forman homodímeros o de diferentes genes para formar heterotrímeros (Edwards *et al.*, 2000). A la fecha se han descrito tres tipos de monómeros. Los tipos I y III son los de mayor número de miembros.

Las proteínas IN2-1 y Cla30, como antes se indicó, son las que presentan mayor porcentaje de identidad con el cDNA-AFLP 52, son miembros de la familia GST porque presentan dominios conservados de GSTs, pero también de glutatión peroxidasa y de glutaredoxinas y se clasifican como miembro de la familia tau de GSTs. A la fecha, a las proteínas IN2-1 y Cla30 no se le ha detectado actividad de transferasas. Por analogía, cDNA-AFLP 52 podría presentar actividad de glutatión peroxidasa o de glutaredoxina, estas dos actividades serían muy importantes durante la germinación ya que la desecación de la semilla se acompaña de peroxidación de lípidos de membrana los cuales son removidos durante la germinación (Camacho, 1999). Esta remoción de lipoperóxidos podría llevarse a cabo por peroxidasas dependientes de glutatión, función atribuida a los miembros de la familia tau. Por otro lado, durante la desecación de la semilla, diversas proteínas con grupos disulfuro podrían perder el estado redox apropiado para desempeñar su función. Por lo que las glutaredoxinas serían necesarias para catalizar la reacción reversible de grupos sulfhidrilo y reestablecer la función de dichas proteínas. Tal es el caso de la ribonucleótido reductasa cuya función es la de sintetizar los ácidos

desoxirribonucleicos que son requeridos en la reparación del DNA. En maíz, este evento se realiza durante las primeras h de germinación (Zaraín *et al.*, 1987). Los desoxinucleótidos también serán utilizados durante la replicación del DNA, aunque este evento se llevará a cabo después de la elongación celular (Baíza *et al.*, 1989). la otra función que podría estar realizando en cDNA-AFLP-52 durante la germinación es regular los niveles de fitorreguladores, auxinas y citocininas a través de la unión de GSTs a estos. Ambos fitorreguladores participan en la germinación, el primero participa en la protrusión del eje embrionario y el segundo incrementa la velocidad de replicación del DNA.

Aparentemente, la expresión del cDNA-AFLP-52, homólogo a algún miembro de la familia GST se induce durante la germinación, pues el transcrito disminuye en las primeras 2 h de germinación y se incrementa a partir de las 8 h.

- Se confirmó que durante la germinación de semillas de maíz la expresión génica en el embrión se modifica.
- De los 73 fragmentos derivados de los cDNA-AFLPs cuya expresión se indujo por efecto de la germinación, al menos seis genes fueron identificados *in silico*.
- Los fragmentos de cDNA que se expresan en embriones de semillas de maíz germinados presentaron homología con las siguientes proteínas:  
Acetil glucosamina fosfato mutasa (AGM), Peptidil-prolil isomerasa (PPI-L), una proteína que interactúa con ABI3 (IP-ABI3) y un Receptor tipo cinasa de serina/treonina (RLK) todas en arroz; Mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS), Factor de splicing alternativo (ASF/SF2) y glutatión S-transferasa (In2-1) de maíz. Todas ellas involucradas en procesos que se realizan durante la germinación de semillas.
- Aunque no podemos asegurar que los fragmentos de genes identificados en este trabajo son germinación-específicos, resultan buenos candidatos a estudiar debido a los antecedentes que los vinculan con el proceso de germinación.



- Aspart, L., Meyer, Y., Laroche, M. y Penon, P. 1984. Developmental regulation of the synthesis of proteins encoded stored mRNA in radish embryos. *Plant Physiol.* 76: 664-673.
- Attucci S., Carde, J., Raymond, P., Saint Gès, V., Spiteri, A., y Pradet, A. 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiol.* 95: 390-398.
- Baíza, A., Vázquez-Ramos, J. y Sánchez de jiménez, E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135: 416-421.
- Becraft, P. 2002. Receptor kinase signaling in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 163-192.
- Becraft, P. 1998. Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Sci. Reviews*, 3: 384-388.
- Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A., y Sánchez de Jiménez, E. 1995. Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* 28: 327-336.
- Bewley J. y Black M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York.
- Bewley, J. 1982. Protein and nucleic acid synthesis during germination and early seedling growth. En *Encyclopedia of Plant Physiol.* Vol. 14A, D. Boulter and B. Parthier, eds (New York: Springer-Verlag). 61-81.
- Bewley, J. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* 9: 1055-1066.
- Bobb, A., Eiben, H. y Bustos, M. 1995. PvAlf, an embryo specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant J.* 9: 2261-2270.
- Botha, F., Potgieter, G., y Botha, A. 1992. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *J. Plant Growth Regul.* 11: 211-224.
- Bradford, K. 1990. A water relation analysis of seed germination rates. *Plant Physiol.* 94: 840-849.
- Bradford, K., Chen, F., Cooley, M., Dahal, P., Downie, B., Fukunaga, K., Gee, O., Gurusinghe, S., Mella, R. y Nonogaki, H. 2000. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. En M Black, KJ Bradford, J Vázquez-Ramos, eds, *Seed Biology: Advances and Applications*. CAB International, Wallingford, UK. 231-251.
- Breiman, A., Fawcett, T., Ghirardill, L. y Mattooll, A. 1995. Plant organelles contain distinct peptidylprolyl *cis*, *trans*-isomerases. *J. Biol. Chem.* 30: 21293-21296.
- Brocklehurst, P. y Fraser, R. 1980. Ribosomal RNA integrity and rate of seed germination. *Planta.* 148: 417-421.
- Brown, J. y Simpson, C. 1998. Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 77-95.
- Bushnell, D., Cramer, P. y Kornberg, R. 2002. Structural basis of transcription:  $\alpha$ -amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 1218-1222.
- Camacho, A. 1999. Producción y detoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 55 pp.
- Chen, F. y Bradford, J. 2000. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol.* 124: 1265-1274.

- Chun, J., Jin, U., Lee, J., Byung, Y., Hyung, N., Kang, M., Pyee, J., Suh, M., Kang, C., Seo, H., Lee, S. y Chung, C. 2003. Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta*. 216: 874-880.
- Clark, S., Williams, R. y Meyerowitz, E. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*. 89: 575-85.
- Consonni, G. Gavazzi, G. y Dolfini, S. 2005. Genetic analysis as a tool to investigate the molecular mechanisms underlying seed development in maize. *Ann. Bot.* 96: 353-362.
- Díaz-Camino, C., Conde, R., Ovsenek, N. y Villanueva M. 2005. Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* 56: 557-565.
- Downie, B., Dirk, L., Hadfield, K., Wilkins, T., Bennett, A. y Bradford, K. 1998. A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Anal Biochem*. 264: 149-157.
- Edwards, R., Dixon, D. y Walbot, V. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci*. 5: 193-198.
- Ehrenshaft, M., y Brambl, R. 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol*. 93: 295-304.
- Finkelstein, R., Gampala, S. y Rock, C. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*. S15-S45.
- Forment, J., Naranjo, M., Roldan, M., Serrano, R., y Vicente, O. 2002. Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J*. 30: 511-519.
- Gallardo K., Job C., Groot S., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J. y Job D. 2002. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol*. 126: 835-848
- Gao, H., Gordon-Kamm, W. y Lyznik, L. 2004. ASF/SF2-like maize pre-mRNA splicing factors affect splice site utilization and their transcripts are alternatively spliced. *Gene* 339: 25-37.
- Gomez-Gomez, L. y Boller, T. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*. 5: 1003-1011.
- Guilfoyle, T. y Jendrisak, J. 1978. Plant DNA-dependent RNA polymerases: subunit structures and enzymatic properties of the class II enzymes from quiescent and proliferating tissues. *Biochemistry*. 17: 1860-1866.
- Hanover, J. 2001. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J*. 15: 1865-1876.
- Hardie, D. 1999. Plant protein Serine/threonine kinase: Classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 97-131.
- Hattori, T., terada, T. y Hamasuna S. 1994. Secuence and functional analyses of a rice gene homologous to the maize Vp1. *Plant. Mol. Biol.* 24: 805-810.
- Hegeman, C., Good. L. y Grabau, E. 2001. Expression of D-myoinositol-3-Phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiol*. 125: 1941-1948
- Hofmann, M., Boles, E. y Zimmermann, F. K. 1994. Characterization of the essential yeast gene encoding N-acetylglucosamine-phosphate mutase. *Eur. J. Biochem*. 221:741-747.
- Ishitani, M., Majumder, A., Bornhouser, A., Michalowski, C., Jensen, R. y Bohnert, H. 1996.

Coordinate transcriptional induction of *myo*-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J.* 9: 537-548

- Jendrisak, J. 1980. The use of  $\alpha$ -amanitin to inhibit in vivo RNA synthesis and germination in wheat embryos. *J. Biol. Chem.* 255: 8529-8533
- Jiang, L. y Kermodé, A. R. 1994. Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seed Sci. Res.* 4:149-173.
- Johnson, M. 1994. The *Arabidopsis thaliana myo*-inositol 1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4). *Plant Physiol.* 105: 1023-1024
- Johnson, M. y Burk, D. 1995. Isozyme of 1L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase from *Arabidopsis* (accession no. U30250; PGR95-067). *Plant Physiol.* 109: 721
- Johnson, M. y Sussex, I. 1995. 1-L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 613-619.
- Jolly, L., Ferrari, P., Blanot, D., van Heijenoort, J., Fassy, F. y Mengin, D. 1999. Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 262: 202-210.
- Jolly, L., Pompeo, F., van Heijenoort, J., Fassy y Mengin, D. 2000. Autophosphorylation of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriology.* 182: 1280-1285.
- Jones, H., Peters, N. y Holdsworth, M. 1997. genotype and environmental interac to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. *Plant J.* 12: 911-920.
- Jones, H., Kurup, S., Petersen, N. y Holdsworth, M. 2000. Identification and analysis of proteins that interact with *Avena fatua* homologue of the maize transcription factor VIVIPAROUS 1. *Plant J.* 21: 133-142.
- Karssen C.M., Zagórski, S., Kepczynski, J., y Groot, S.P.C. 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann. Bot.* 63:71-80.
- Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 51:33-36
- Krusell, L., Madsen, L., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N. y Stougaard, J. 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature.* 420: 422-426.
- Kurup, A., Jones, D. y Holdsworth, J. 2000. Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J.* 21: 143-155.
- Lalonde, L. y Bewley, J. D. 1986. Desiccation during germination and its effects on the messenger RNA population. *J. Exp. Bot.* 37:754-764.
- Lane, B. G. 1991. Cellular desiccation and hydration: Developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J.* 5:2893-2901.
- Larson, S. y Raboy, V. 1999. Linkage mapping of maize and barley *myo*-inositol 1-phosphate synthase DNA sequences: correspondence with a *low phytic acid* mutation. *Theor. Appl. Genet.* 99: 27-36.
- Li, M. y Chory, J. 1997. A putative leucinerich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell.* 90: 929-38.
- Li, L. y Howe, G. 2001. Alternative splicing of prosystemin pre-mRNA produces two isoforms that are active as signals in the wound response pathway. *Plant Mol. Biol.* 46: 409- 419.
- Li, C., Rodriguez, M. y Banerjee, D. 2000. Cloning and characterization of complementary

DNA encoding human *N*-acetylglucosamine-phosphate mutase protein. *Gene* 242:97-103.

- Lin, C., Roberts, J. K. y Key, J. L. 1984. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. Synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol.* 74:152-160.
- Loewus, F. y Loewus, M. 1983. Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34 137-161.
- Logan, D., Millard, A., Sweetlove, L., Hill, S. y Leaver, C. 2001. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* 125:662-672.
- Lopato, S., Kalyna, M., Dorner, S., Kobayashi, R., Krainer, A.R. y Barta, A.. 1999. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev.* 13: 987- 1001.
- Lopato, S., Forstner, C., Kalyna, M., Hilscher, J., Langhammer, U., Indrapichate, K., Lorkovic, Z.J. y Barta, A. 2002. Network of interactions of a novel plant-specific Arg/Ser-rich protein, atRSZ33, with atSC35-like splicing factors. *J. Biol. Chem.* 277: 39989-39998.
- Lott, J., Greenwood, J. y Batten, G. 1995. Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. In J Kigel, G Galili, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, pp 215-235.
- Majumder, A., Johnson, M. y Henry, A. 1997. 1L-*myo*-Inositol-1-phosphate synthase. *Biochim. Bioph. y Acta.* 1348: 245-256.
- Marrs, K. 1996. The function and regulation of Glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.
- Martínez, J. y Hegardt, F. 1995. Characterization of a cDNA encoding a cytosolic from peptidylprolyl cic trans-isomerase *Blatella germanica*. *Euro. J. Biochem,* 234: 284-292.
- McCarty, D. R., Carson, C. B., Stinard, P. S. y Robertson, D. S. 1989. Molecular Analysis of *víviparous-1*: An Abscisic Acid Insensitive Mutant of Maize. *The Plant Cell.* 1: 523-532.
- McKibbin, R., Wilkinson, M., Bailey, P., Flintham, J., Andrew, L., Lazzeri, P., Gale, M., Lenton, J. y Holdsworth, M. 2002. Transcripts of Vp-1 homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 10203-10208.
- Morohashi, Y. 1986. Patterns of mitochondrial development in reserve tissue of germinated seeds: A survey. *Plant Physiol.* 66:653-658.
- Morohashi, Y., and Bewley, J.D. 1980. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons during and following germination of the axis. *Plant Physiol.* 66: 70-73.
- Osborne D. J. 1980. Senescence in seeds. In KV Thimann, ed, *Senescence in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 13-37
- Pang, H., Koda, Y., Spejima, M. y Kimura, H. 2002. Identification of human phosphoglucomutase 3 (PGM3) as *N*-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM) *Ann. Hum. Genet.* 66: 139-144
- Papi, M., Sabatini, S., Bouchez, D., Camilleri, C., Costantino, P. y Vittorioso, P. 2000. Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev.* 14:28-33.
- Parcy, F., Valon, C., Hohara, S., Miséra, S. y Giraudat, J. 1997. The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3, y LEAFYCOTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell.* 9: 1265-1277.
- Petersen, S., Estmer, C., Ohrmalm, C., Matthews, D., Russell, W. y Akusjärvi, G. 1999. The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA

binding and phosphorylation. *EMBO Journal*. 18: 1014-1024.

- Potokina, E., Srevasulu, N., Altschmied, L., Michalek, W. y Graner, A. 2002 Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct Integr Genomics* 2: 28-39.
- Procissi, A., Piazza, P. y Tonelli, C. 2002. A maize r1 gene is regulated post-transcriptionally by differential splicing of its leader. *Plant Mol. Biol.* 49: 239- 248.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. y Coupland, G. 1995. The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc-finger transcription factors. *Cell*. 80: 847-857,
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Job, C. y Job, D. 2004. The effect of α-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol*. 2000 134:1598-1613.
- RayChaudhuri, A., Hait, N., DasGupta, S., Bhaduri, T., Deb, R. y Majumder, A. 1997. *L-myoinositol 1-phosphate synthase* from plant source: Characteristics of the chloroplastic and cytosolic enzymes. *Plant Physiol*. 115: 727-736.
- Raymond, P., Al-Ani, A. y Pradet, A. 1985. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobic and anaerobic in twelve fatty and starchy seeds. *Plant Physiol* 79:879-884
- Reuzeau, C. y Cavalié, G. 1997. Changes in RNA and protein metabolism associated with alterations in the germination efficiency of sunflower seeds. *Annals of Botany* 80:131-137.
- Reuzeau, C., Goffner, D. y Cavalié, G. 1992. Relations between protein composition and germinative capacity of sunflower seeds. *Seed Science Research*. 2: 223-230.
- Ritchie, S. y Gilroy, S. 1998. Tanksley review no. 100. Gibberellins: regulating genes and germination. *New Phytol*. 140:363-383
- Sánchez de Jiménez E, y Aguilar, R. 1984. Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol*. 75:231-234
- Sánchez-Martínez, D., Puigdomènech, P., y Pagès, M. 1986. Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination of maize. *Plant Physiol*. 82:543-549.
- Shiota, H., Satoh, R., Watabe, K., Harada, H. y Kamada, H. 1998. *C-ABI3*, the carrot homologue of the *Arabidopsis* ABI3, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. *Plant Cell Physiol*. 39: 1184-1193.
- Shiu, S. y Bleecker, A. 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 11: 10763-10768.
- Shiu, S., Karlowski, M., Pan, R., Tzeng, Y., Mayer, K. y Li, W. 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*. 16: 1220-1234.
- Sitrit, Y., Hadfield, K. A., Bennett, a., Bradford, K. J. y Downie, B. 1999. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol*. 121:419-428
- Song, W., Wang, G., Chen, L., Kim, H. y Pi, L. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *xa21*. *Science*. 270: 1804-1806.
- Thompson, S., Bryant, J. A. y Brocklehurst, P. A. 1987. Changes in levels and integrity of ribosomal RNA during seed maturation and germination in carrot (*Daucus carota* L.). *J. Exp Botany*. 193:1343-1350.
- Torii, K., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y. y Yokoyama, R. 1996. The *Arabidopsis*

*erecta* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*. 8:735-746.

- Ullah, H., Chen, J. G., Wang, S. y Jones, A. M. 2002 Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol*. 129:897-907
- Vázquez-Ramos, J. y Osborne, D. 1986. Analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Res*. 166: 39-47.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 23: 4407-4414.
- Wang, M., Oppedijk, B. J., Caspers, M. P. M., Lamers, G. E. M., Boot, M. J., Geerlings, D. N. G., Bakhuizen, B., Meijer, A. H. y Duijn, B. 1998. Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germinating barley. *J. Exp. Bot*. 49:1293-1301
- White, C., Proebsting, W. M., Hadden, P. y Rivin, C. J. 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol*. 122:1081-1088.
- Yamamoto, E. y Knap, H. 2001. Soybean receptor-like protein kinase genes: Paralogous divergence of a gene family. *Mol. Biol. Evol*. 18: 1522-1531.
- Yang, T., Chaudhuri, S., Yang, L., Chen, Y. y Poovaiah, B. 2004. Calcium/Calmodulin Up-regulates a Cytoplasmic Receptor-like Kinase in Plants. *J. Biol. Chem*. 279: 42552-42559.
- Yoshida, K., Wada, T., Koyama, H., Mizobuchi, R. y Naito, S. 1999. Temporal and spatial patterns of the accumulation of transcript of *Myo*-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol*. 119: 65-72.
- Zaráin, M., Bernal-Lugo, I., Vázquez Ramos, J. 1987. Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutation Res*. 181: 103-110.
- Zhang, X., Garretton, V. y Chua, H. 2005. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes and Develop*. 19: 1532-1543.
- Zlatanova, J.S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimshirova, K.V., y Stanchev, B.S. 1987. DNA repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Mol. Biol*. 10:139-144.

APÉNDICE A

Cebadores utilizados en los cDNA-AFLP

Clave	Nombre	Secuencia
ML 33	MseI adapt. 1	GACGATGAGTCCTGAG
ML35	EcoRI adapt. 1	CTCGTAGACTGCGTACC
ML37	Mse Core + adapt	GACGATGAGTCCTGAGTAA
ML38	Eco Core + adapt	CTCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML42	Eco+1.1	AGACTGCGTACCAATTCA
ML43	Eco+1.2	AGACTGCGTACCAATTCT
ML44	Eco+1.3	AGACTGCGTACCAATTCCG
ML45	Eco+1.4	AGACTGCGTACCAATTCC
ML46	Eco+2.1	AGACTGCGTACCAATTCAA
ML47	Eco+2.2	AGACTGCGTACCAATTCAT
ML48	Eco+2.3	AGACTGCGTACCAATTCAG
ML49	Eco+2.4	AGACTGCGTACCAATTCAC
ML50	Eco+2.5	AGACTGCGTACCAATTCTA
ML51	Eco+2.6	AGACTGCGTACCAATTCTT
ML52	Eco+2.7	AGACTGCGTACCAATTCTG
ML53	Eco+2.8	AGACTGCGTACCAATTCTC
ML54	Eco+2.9	AGACTGCGTACCAATTCGA
ML55	Eco+2.10	AGACTGCGTACCAATTCGT
ML56	Eco+2.11	AGACTGCGTACCAATTCGG
ML57	Eco+2.12	AGACTGCGTACCAATTCGC
ML58	Eco+2.13	AGACTGCGTACCAATTCCA
ML59	Eco+2.14	AGACTGCGTACCAATTCCT
ML60	Eco+2.15	AGACTGCGTACCAATTCGG
ML61	Eco+2.16	AGACTGCGTACCAATTCCT
ML62	MseI+1.1	GATGAGTCCTGAGTAAA
ML63	MseI+1.2	GATGAGTCCTGAGTAAT
ML64	MseI+1.3	GATGAGTCCTGAGTAAG
ML65	MseI+1.4	GATGAGTCCTGAGTAAC
ML66	MseI+2.1	GATGAGTCCTGAGTAAAA
ML67	MseI+2.2	GATGAGTCCTGAGTAAAT

Clave	Nombre	Secuencia
ML68	Mse+2.3	GATGAGTCCTGAGTAAAG
ML69	Mse+2.4	GATGAGTCCTGAGTAAAC
ML70	Mse+2.5	GATGAGTCCTGAGTAATA
ML71	Mse+2.6	GATGAGTCCTGAGTAATT
ML72	Mse+2.7	GATGAGTCCTGAGTAATG
ML73	Mse+2.8	GATGAGTCCTGAGTAATC
ML74	Mse+2.9	GATGAGTCCTGAGTAAGA
ML75	Mse+2.10	GATGAGTCCTGAGTAAGT
ML76	Mse+2.11	GATGAGTCCTGAGTAAGG

---



## APÉNDICE B

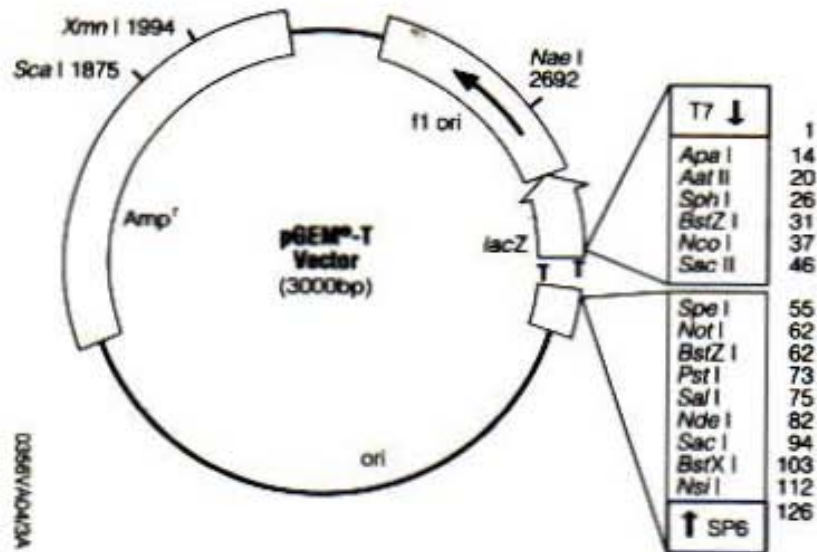
Combinaciones de oligonucleótidos utilizadas para realizar los cDNA-AFLP y analizar la expresión diferencial de genes por efecto de la germinación. Los oligonucleótidos de *EcoRI* fueron marcados radiactivamente. Cada combinación se usó para semillas sin germinar y para semillas germinadas.

<i>EcoRI</i> ([ <sup>33</sup> P]dATP)	<i>MseI</i>
ML42	ML62 a ML76
ML43	ML62 a ML75
ML44	ML62 a ML76
ML45	ML62 a ML73
ML46	ML62 a ML75
ML47	ML62 a ML76
ML48	ML62 a ML76
ML49	ML62 a ML75
ML50	ML62 a ML76
ML51	ML62 a ML76
ML52	ML62 a ML76
ML53	ML62 a ML76
ML54	ML62 a ML76
ML55	ML62 a ML76

---

## APÉNDICE C

Diagrama del Vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T-Easy (Promega).



## APÉNDICE D

Claves de acceso en el Genbank de las proteínas con las que presentaron homología los fragmentos clonados cDNA-AFLP.

Proteína	Organismo	Acceso
AGM	<i>Zea mays</i>	BUO51514
AGM	<i>Oriza sativa</i>	XP476984.1
AGM	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAB09465.1
MIPS	<i>Hordeum vulgare</i>	AAC17133.1
MIPS	<i>Avena sativa</i>	BAB40956.2
MIPS	<i>Zea mays</i>	AAC15756.1
MIPS	<i>Oriza sativa</i>	NP921086.1
MIPS	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAA95788.1
MIPS	<i>Actidina deliciosa</i>	AAF97409.1
MIPS	<i>Citrus paradisi</i>	CAA83505.1
MIPS	<i>Sesamun indicum</i>	AAG01148.1
MIPS	<i>Triticum aestivum</i>	AAD26331.1
MIPS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM63143.1
MIPS	<i>Lycopersicum esculentum</i>	AAG23846.1
MIPS	<i>Glycine max</i>	AAK49896.1
MIPS	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AAK69514.1
PPI-1	<i>Oriza sativa</i>	BAD45991.1
PPI-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP175776.2
RFK1	<i>Oriza sativa</i>	XP480583.1
IP-ABI3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAA96959.1
IP-ABI3	<i>Oriza sativa</i>	XP450265.1
ASF/SF2	<i>Oriza sativa</i>	XP479479.1
ASF/SF2	<i>Zea mays</i>	AAU29329.1
ASF/SF2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG52185.1
IN2-1	<i>Zea mays</i>	CAA41447.1
IN2-1	<i>Oriza sativa</i>	AAF70831.1
IN2-1	<i>Triticum aestivum</i>	CAA76758.1