

00551
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN
GENÉTICA DURANTE LA ESTIMULACIÓN DE LA
GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ

por

Q.F.B. Alberto Gómez Gutiérrez

Tesis entregada como parte de los requerimientos para la

obtención del grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOQUÍMICA)

Handwritten signature

México, D.F., septiembre del 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	III
JURADO DE EXÁMEN.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
El maíz como modelo de trabajo.....	3
Germinación de semillas.....	5
Modelo a seguir: Aceleración de la germinación.....	7
<i>Osmoacondicionamiento (OSMA)</i>	7
<i>Citocininas</i>	8
Antecedentes inmediatos.....	10
PROPÓSITO PRINCIPAL.....	13
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	15
General.....	15
Particulares.....	15
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Material.....	19
<i>Biológico</i>	19
<i>Reactivos</i>	19
<i>Equipo</i>	20
Métodos.....	21
<i>Métodos Básicos</i>	21
<i>Extracción de ADN genómico de ejes embrionarios de maíz</i>	24
<i>Extracción de ARN total de ejes embrionarios de maíz</i>	24
<i>Ensayos de hibridación en Northern blot</i>	25
<i>Clonación</i>	27
<i>Minipreparación de plásmidos I</i>	28
<i>Minipreparación de plásmidos II</i>	29
<i>Escrutinio de la biblioteca de ADNc</i>	29
<i>Secuenciación</i>	32
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	35

Secuenciaciones Realizadas:.....	35
<i>Epsilon (ε)</i>	35
AA9	39
Búsqueda de un ADNc Completo para AA9.....	41
<i>Primer Intento</i>	41
<i>Aislamiento de clonas de ADNc para AA9</i>	47
Expresión de AA9 durante la Germinación Normal y la GPO	56
DISCUSIÓN	57
Análisis de Secuencias de Epsilon y de AA9.	57
<i>Epsilon(ε)</i>	57
AA9	58
Búsqueda del ADNc Completo de AA9. Esclarecimiento y Análisis.	58
<i>Clonación y secuenciación del ADNc de AA9</i>	59
Expresión de AA9 durante la germinación.	62
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	65
APÉNDICE	67
<i>Direcciones de internet</i>	67
<i>Oligonucleótidos utilizados</i>	67
<i>Preparación de Amortiguadores</i>	68
<i>Preparación de Soluciones</i>	69
<i>Preparación de Medios</i>	71
BIBLIOGRAFÍA	A

JURADO DE EXÁMEN

En el oficio PMDCB/083/2000 del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas fue nombrado el siguiente jurado de examen:

Presidente	Dra. Irma Bernal Lugo
Vocal	Dr. Mario Rocha Sosa
Secretario	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Suplente	Dra. María Elena Ibarra Rubio
Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 114 del Edificio "E" de posgrado del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Química, de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Jorge M. Vázquez Ramos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
<i>Figura 1. Diagrama de semilla de maíz.</i>	4
<i>Figura 2. Diagrama de transferencia de ARN a membrana de nylon.</i>	26
<i>Figura 3. Secuencia de ADNc de doble cadena de Epsilon.</i>	35
<i>Figura 4. Comparación entre AA9 previa y AA9 vuelta a secuenciar.</i>	40
<i>Figura 5. Geles y Southern blots respectivos con sonda AA9. A) Clona 1 y B) Clonas 4 y 7.</i>	41
<i>Figura 6. Gel de cinética de ensayos de restricción con Eco RI de de la Clona 1.</i>	42
<i>Figura 7. Gel y Southern blot de ADN de las clonas 1, 2 y 3 digerido con Eco RI.</i>	43
<i>Figura 8. Secuencia parcial del ADNc AA9 3.7 kb e identidad con el ADNc AA9 de 682 pb.</i>	46
<i>Figura 9. Hibridación en placa del cuarto escrutinio a la biblioteca de ADNc.</i>	47
<i>Figura 10. Gel de los productos de PCR de las clonas 4.1.1.1, 4.1.2.1, 4.1.2.2 y 4.3.1.1 de λ_{gt11}.</i>	48
<i>Figura 11. Gel y Southern blot de la clonación del fragmento de 1.5 kpb en pCR II.</i>	48
<i>Figura 12. Diagrama de la secuenciación del inserto de 1.5 kpb.</i>	49
<i>Figura 13. ADNc AA9 de 1407 pb (No de acceso: AF140475).</i>	50
<i>Figura 14. Traducción teórica del ADNc AA9 de 1407 pb (407 aas; No. de acceso: AAF24189) .</i>	51
<i>Figura 15. Diagrama de hidrofobicidad.</i>	53
<i>Figura 16. Alineamiento múltiple de la proteína teórica del ADNc AA9 de 1407 pb.</i>	55
<i>Figura 17. Ensayo de Expresión del ARNm del ADNc AA9.</i>	56

AGRADECIMIENTOS

A Marina Yolanda y a Vinicio (†) que me enseñaron simple y sencillamente a ser lo que soy, y estoy seguro que siempre me apoyaran aunque no nos encontremos en el mismo lugar.

Es mi deseo agradecer el apoyo constante, la visión científica, los regaños (generalmente) justificados y la confianza total recibidos del Dr. Jorge M. Vázquez Ramos; antes, durante y después de la conclusión del presente trabajo. La conclusión es que ciertamente no soy un genio, pero ... ¿quién quiere serlo?.

Agradezco a DGAPA por el apoyo otorgado a través del proyecto IN-209895.

DEDICATORIAS

A mis amados padres.

A Vini y a Eze quienes han aguantado más bromas de las que he podido gastarles.

A toda mi familia en el DF y en Saltillo y Torreón cuyo apoyo incondicional se ha sentido siempre.

A Alma quien me ha dado su cariño y ante todo su amistad, a pesar de los muchos "impedimentos estéricos".

A los que fueron, son y serán mis amigos del Laboratorio 114; Alma, C'est ci, Dairo, D. Licha, D. Chuy, Edu, Eugene, Fabi, Felipe, Jorge, Goyo, Ivonne, Juan, Mary, Pablo, Pile, Ruth, Yola y Yuri, quienes han pasado, están pasando o pasarán por este camino.

A todos mis amigos en el departamento de bioquímica; Adriana, Alfredo, Andrea, Andrés, Aurora, Beti, Carlos, Charlie Moon, Edith, Erick, Fanny, Felix, Gaby, Grethel, Herminia, Homero, Javier, José Luis, Lahousine, Leti, Lilian, Manue, Martha, Martin, Mayte, Richard, Rogelio, Vane, Zobeida y muy en especial a Maru; cuyo apoyo en conjunto me ayudo a terminar esta tesis.

A mis alumnitos de los cuales siempre aprendo más de lo que pretendo enseñar.

A Jesús H. y Alejandra porque sé que compartimos muchos de los mismos ideales.

A quienes significaron algo especial pero con los(as) que no pude coincidir en el mismo camino.

A mis amigos de la PGR; D. George, Ricardo, José Antonio, Gabriela, Leo, Rubi, Dra. Ma. Elena y Gen. Camilo, para que lo que estén haciendo lo hagan siempre bien hecho.

A quien se llegue a sentir vencido, desesperado, deprimido, devaluado, atrapado; para que nunca se sienta así porque siempre existirá una salida. Créeme yo lo sé.

ABREVIATURAS

aa(s)	aminoácido(Plural).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc(s)	Ácido desoxirribonucleico complementario al respectivo ARNm(Plural).
ARNm(s)	Ácido ribonucleico mensajero (Plural).
ARNr(s)	Ácido ribonucleico ribosomal (Plural).
ARNt(s)	Ácido ribonucleico de transferencia(Plural).
BA, BAP	Benciladenina, 6-benciladenosina, 6-bencilaminopurina.
Ci	Curie, 1 Ci = 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo por gramo de Ra puro.
cpm	Cuentas radiactivas por minuto.
D.O. _λ	Densidad Óptica (Longitud de onda, nm).
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
dCTP	Desoxicitidina trifosfato.
ddATP	Di-desoxiadenosina trifosfato.
ddCTP	Di-desoxicitidina trifosfato.
ddGTP	Di-desoxiguanosina trifosfato.
ddTTP	Di-desoxitimidina trifosfato.
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato.
Differential Display, mRNA-Differential Display	Desplegado diferencial de ARNms.
dITP	Desoxi-inosina trifosfato.
DNasa	Desoxirribonucleasa.
dTTP	Desoxitimidina trifosfato.
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético.
E.S.T.	Marcas de secuencias de expresión (Expressed Sequenced Tags).
EtBr	Bromuro de Etidio Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridio.
GPO	Germinación subsecuente al OSMA.
L.R.	Libre de RNasa.
LB	Medio de crecimiento de Bacterias Luria-Bertrani.
M	Concentración molar.
min	Minuto.
MOPS	Ácido 3-(N-morfolin)-propano sulfónico.
N	Concentración normal.
Na ₄ -EDTA	Etilén-diamino-tetra-acetato tetrasódico.
nt(s)	Nucleótido(Plural).
OSMA	Osmoacondicionamiento.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG	Polietilén glicol.

pfu	Unidades formadoras de placa de bacteriófagos.
Q.P.	Químicamente puro.
r.p.m	Revoluciones por minuto.
Red-Gal	6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido.
RGRB	Amortiguador de corrida para geles de agarosa de ARN.
RNasa	Ribonucleasa.
RT	Transcripción reversa.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa subsecuente a la transcripción reversa.
SAL	Solución amortiguadora de Lisis.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
SM	Medio de propagación de bacteriófagos.
SSC	Amortiguador cloruro-citrato de Sodio pH=8.0.
STE	Amortiguador cloruro de sodio-Tris- Na ₄ -EDTA pH=8.0.
T.A.	Temperatura ambiente (20-25° C).
TAE	Amortiguador Tris-acetato de sodio- Na ₄ -EDTA pH=8.0.
<i>Taq</i>	Polimerasa de ADN de <i>Thermus aquaticus</i> recombinante.
TBE	Amortiguador Tris-Borato- Na ₄ -EDTA pH=8.0.
TCA	Ácido tricloroacético.
TE	Amortiguador Tris- Na ₄ -EDTA pH=7.5.
Tm	Temperatura de fusión de una secuencia de ADN.
U	Unidad de actividad enzimática.
U.A.	Unidad de Absorbencia.
U.V.	Luz Ultravioleta.
V	Volts.
Xg	Fuerza indicada como veces la de la gravedad.
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido.

RESUMEN

La germinación de semillas es un proceso sumamente complejo ya que implica una etapa de cambio de metabolismo hacia proliferación y desarrollo, por lo que ha sido interesante su estudio, ya sea a nivel fisiológico, bioquímico o genético. Para poder estudiar la germinación, nuestro grupo ha utilizado tratamientos que la estimulan, como es la adición exógena de citocininas (BA) durante la imbibición de ejes embrionarios, o el osmoacondicionamiento (OSMA) de semillas completas. La información obtenida a diferentes niveles ha demostrado que estos tratamientos aceleran la germinación; sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se provoca este efecto no han sido esclarecidos.

El presente trabajo se basó en el estudio de la dependencia transcripcional de los eventos metabólicos modificados por los tratamientos utilizados y constituye la continuación de varios intentos por analizar la expresión al nivel de ARNm's en la germinación de semillas de maíz. De los varios ADNc's incompletos obtenidos, que muestran una probable expresión diferencial del mensaje al que pertenecen, se dio seguimiento a dos: (ϵ) y AA9, los cuales tienen diferente grado de avance en su análisis.

Fue terminada la secuenciación del ADNc ϵ y se realizó la comparación con diversas bases de datos de secuencias internacionales, pero se decidió no continuar con el análisis debido a que la información obtenida de las comparaciones, indica que probablemente se relaciona con proteínas de embriogénesis tardía. Con respecto al ADNc AA9, se presentaron problemas diversos al continuar su análisis, mismos que obligaron a reiniciar el trabajo experimental, pero se logró obtener el ADNc correspondiente probablemente completo. De las comparaciones realizadas con este ADNc, cuya expresión se ve adelantada durante la aceleración de la germinación, no se obtiene información que evidencie la función del gen al que pertenece, lo cual se discute.

Se concluye que no es clara la función del gen de AA9 y se plantean diversas perspectivas de trabajo, así como especulaciones sobre la posible función de este gen.

INTRODUCCIÓN

Nuestra inquietud durante estos años ha sido estudiar la germinación de semillas de maíz, no solamente por la implicación científica que representa, sino también por la implicación agronómica/social de su estudio a un nivel básico, que se podrá traducir en posteriores aplicaciones para el mejoramiento de la planta, por ejemplo nutricionalmente, buscando mejorar el contenido de compuestos nutritivos de la semilla en su uso para humanos y animales; o agronómicamente, posiblemente obteniendo una germinación más rápida y eficiente, con mayor vigor, tiempos mas cortos de recolección y de obtención de grano o permitiendo condiciones de siembra menos exigentes, otorgando con esto a sectores sociales dependientes de su siembra, mayor accesibilidad a la semilla. Además, el maíz ha sido una planta cuya semilla se ha utilizado tradicionalmente desde tiempos prehispánicos y su importancia cultural hace todavía más interesante su estudio.

A continuación, se exponen algunas características importantes del maíz y de su semilla, que van a proveer las bases para poder estudiar este modelo biológico.

EL MAÍZ COMO MODELO DE TRABAJO

La información taxonómica es trascendental para el estudio de los organismos, ya que nos sitúa en la elección del método a seguir para estudiar determinado modelo. De acuerdo a lo anterior, el maíz es una planta fanerógama del subtipo de las angiospermas monocotiledóneas que pertenece a la familia de las gramíneas, es integrante de la tribu Maydae específicamente del género *Zea*; siendo su especie, *mays*, la de mayor importancia nutrimental. Como parte importante de las aplicaciones del maíz, se utiliza el grano como alimento por su alto contenido en carbohidratos que se acerca al 80% en composición en forma de almidones, ubicados éstos en el endospermo; por otro lado, posee un bajo contenido proteico comparando con otros cereales. Además, se obtiene aceite de las semillas y la planta se utiliza como forraje. La semilla de maíz, como muchas otras, posee un contenido en agua bajo, de aproximadamente 10% lo cual implica que tendrá un metabolismo muy reducido (Bewley y Black, 1994; Jugenheimer, 1976).

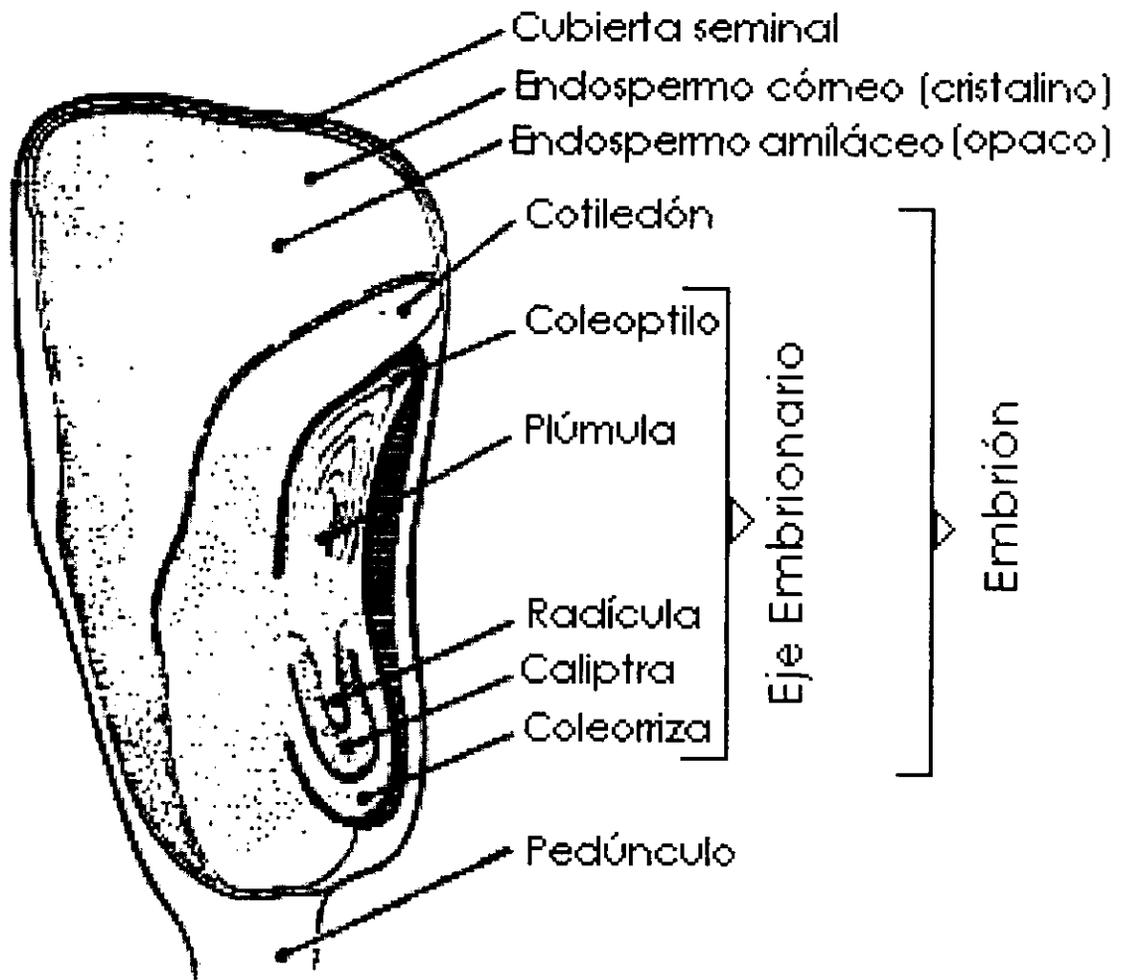


Figura 1. Diagrama de semilla de maíz. Principales órganos (Modificado de Bidwell, 1979).

La semilla de maíz presenta diferentes estructuras anatómicas, que se pueden apreciar en la Figura 1. El tejido que será propiamente la planta adulta es el eje embrionario, que se compone por una raíz rudimentaria, la radícula, la caliptra y la coleoriza, una plúmula que se convertirá en el tallo y las hojas de la planta y el coleoptilo, que en el eje embrionario es el sitio donde se une el cotiledón. Cuando se considera al eje embrionario junto con el cotiledón se le conoce como embrión. A su vez, el embrión se encuentra rodeado por el endospermo, que como se ha mencionado, en maíz es la fuente energética de la semilla por sus reservas en carbohidratos. El pedúnculo es el tejido de unión con la planta madre. Por último, se considera también la estructura de la cubierta seminal como una de las

más importantes, ya que de su composición y permeabilidad depende la conclusión de la germinación con éxito (Bidwell, 1979; Steeves, 1983; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984; Bewley y Black, 1994).

La pregunta que surge es ¿cómo se puede llegar a formar un sistema metabólico altamente complejo, como lo es una planta, partiendo de un sujeto prácticamente inerte como lo es una semilla?. La base de la respuesta a esta pregunta se puede encontrar en la germinación. El estudio de los procesos involucrados en la germinación de la semilla del maíz se hace, no solamente una pregunta básica muy interesante, sino también una necesidad en países con alto consumo de esta semilla, ya que el ciclo de vida de cada planta depende del tiempo y condiciones que tome su inicio a partir de una semilla, por lo que la culminación del proceso germinativo será determinante en el subsecuente desarrollo de la planta. Pero para poder estudiarla se debe definir y delimitar este proceso inicial.

GERMINACIÓN DE SEMILLAS

El término germinación ha sido utilizado de muchas formas, en particular de acuerdo al organismo de estudio, aunque en vegetales tiene como común denominador la reanudación de procesos de desarrollo y crecimiento interrumpidos durante la formación de la semilla, mediante la imbibición o entrada de agua a la semilla, variando el concepto únicamente en el tiempo de conclusión. Por ejemplo, para los agrónomos culmina con la emergencia del suelo de la plántula, lo que implica un tiempo en el que ya habrán ocurrido múltiples procesos que habrán implicado crecimiento de todas las estructuras de la plántula; para los fisiólogos vegetales, la germinación se termina con la elongación inicial y protrusión de la radícula, aún cuando para este momento no se han producido divisiones celulares en este tejido, ya que el primer crecimiento de las células radicales es por elongación.

Para nuestros fines de trabajo y tratando de delimitar más concretamente la germinación, en nuestro grupo consideramos a la germinación como el proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla y que culmina con la consumación de la primera ronda de divisiones celulares, tomando a la germinación como un proceso preparativo para el posterior desarrollo y proliferación de las células en los tejidos que posteriormente formarán la planta. Nuestra hipótesis de trabajo es: la aparición de la capacidad proliferativa celular determina la posibilidad del establecimiento de una plántula.

En realidad, la germinación consiste en la reanudación de un número muy grande de procesos metabólicos y no solamente de aquellos concernientes a los mecanismos proliferativos. Estos procesos

son activados inicialmente por la entrada de agua a la semilla, fenómeno que presenta 3 fases. La fase inicial (fase I) se caracteriza por una entrada rápida de agua de una manera mecánica, produciendo rupturas en las membranas internas por el cambio estructural de los lípidos en las membranas y, por ende, escape de solutos al medio; pero al mismo tiempo se empiezan a reestructurar y reparar tanto membranas como otros componentes celulares, ADN, mitocondrias, ribosomas, y se comienzan a sintetizar proteínas, a partir de ARNms preexistentes. También se reanudan procesos de respiración para la producción de ATP, al mismo tiempo que se comienzan a sintetizar nuevos ARNms, ARNts y ARNrs (Ching, 1972; Sen *et al*, 1974; Osborne *et al*, 1980). En la fase II subsecuente se observa una reducción casi total en la entrada de agua a la semilla; durante esta fase disminuyen los procesos reparativos y se incrementa el número de mitocondrias. A partir de este momento las proteínas se comienzan a sintetizar de los nuevos ARNms. Muchos autores dan por terminada la germinación al final de esta fase, ya que es aquí donde se produce la protrusión de la radícula, pero como se ha comentado previamente, nuestro parámetro de término de germinación es diferente. La fase III coincide con una nueva entrada de agua; es hasta esta fase donde se comienzan a movilizar las reservas de la semilla, en el caso del maíz, carbohidratos en forma de almidón. El comienzo de la replicación del ADN (fase S del ciclo celular) se ubica entre las fases II y III (Bewley, 1997; Osborne *et al*, 1980, 1983).

Todos estos procesos deben estar fuertemente regulados, por su importancia en la subsistencia de la especie. Según Bidwell (1979), existen 3 niveles de control de desarrollo y proliferación, en cualquier etapa de la vida de una planta, desde la formación de la semilla hasta la culminación del crecimiento y desarrollo de la planta adulta. Específicamente, en el ámbito germinativo, el primer nivel llamado genético dependerá de la estimulación de la expresión específica de genes relacionados con la reanudación de actividades metabólicas, proliferativas y de desarrollo. De la misma manera, el control a nivel de tejidos que en general comprende la modificación del desarrollo por medio de la síntesis o degradación de hormonas vegetales, puede activar o desactivar programas de desarrollo y diferenciación, tanto en una acción individual, como en una acción conjunta o modificada al conjugarse con otras sustancias celulares (Sembdner *et al*, 1994). El último nivel de control es independiente de la semilla, pero produce una respuesta de ésta; se trata de todas las condiciones ambientales que conducen a la conclusión de la germinación, como la luz disponible, humedad y pH del medio, disponibilidad de nutrientes, etc. Si estos controles fallan, la semilla puede morir ó entrar en un estado llamado

dormancia; es decir, no terminará la germinación sino hasta que encuentre las condiciones óptimas para concluirla (Bewley, 1997).

MODELO A SEGUIR: ACELERACIÓN DE LA GERMINACIÓN

Una vez delimitadas las bases conocidas del proceso germinativo, tenemos que definir el método a utilizar para estudiarlo, no como un sistema descriptivo aislado, sino como un sistema que produce un cambio de actividad metabólica muy fuerte y debe tener funciones que no proseguirán activas en la planta adulta. De esta forma, ¿cómo se pueden delimitar los procesos de mantenimiento celular a nivel general y los procesos específicos de la germinación, que activan el metabolismo germinativo partiendo de un estado quiescente? Esta pregunta se trató de responder utilizando los que se han llamado modelos de aceleración o de estimulación de la germinación; es decir, producir artificialmente una modificación en el proceso germinativo, para comparar los procesos moleculares entre una germinación acelerada y una sin acelerar, obteniendo de esta forma a un mismo tiempo de germinación diferencias metabólicas a cualquier nivel de control de desarrollo entre las semillas aceleradas y las no aceleradas, y por ende, indicios de la regulación propia de la germinación. En un comienzo, estos tratamientos de aceleración solamente se habían caracterizado fenotípicamente mediante la observación de una reducción en los tiempos de germinación o del enverdecimiento de tallos, es decir, aparentemente se aceleraba la germinación. Actualmente, se cuenta con más datos que fueron obtenidos tanto por nuestro grupo como por otros, sobre los cambios en el metabolismo que son inducidos por estos tratamientos.

Se utilizaron 2 técnicas para lograr la aceleración de la germinación, que aunque pueden tener otro tipo de enfoque fisiológico o bioquímico, únicamente se utilizaron para producir una modificación metabólica por la aceleración del proceso germinativo: mediante el previo osmoacondicionamiento de semillas o mediante el uso de citocininas en la imbibición de ejes embrionarios de maíz.

Osmoacondicionamiento (OSMA).

El osmoacondicionamiento (OSMA) consiste en una preimbibición de la semilla completa en una sustancia altamente higroscópica, como lo es el polietilén-glicol (PEG), de tal forma que deje entrar solamente una determinada cantidad de agua, permitiendo con esto que la germinación comience, más

no que concluya. Una semilla osmoacondicionada será aquella que no presente protrusión radicular y en la cual la germinación posterior al OSMA (GPO) sea más rápida y sincrónica que la germinación normal. Las semillas en proceso de OSMA pueden sintetizar proteínas y ácidos nucleicos; sin embargo, no se presentan indicios de división celular, ya que no tienen el compromiso del avance en la germinación por la cantidad limitada de agua.

En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que las semillas de maíz durante el tratamiento de OSMA no presentan replicación de ADN ni se observan figuras mitóticas (Cruz-García *et al*, 1995); resultados semejantes se han observado en poro (*Allium porrum*; Ashraf y Bray, 1993). Por otro lado, una cierta actividad replicativa se ha determinado durante el OSMA en semillas de jitomate o de pimienta (Bino *et al*, 1992; Lantieri *et al*, 1993), sugiriendo esto que la ocurrencia o no de la replicación de ADN durante el OSMA es especie-dependiente (Cruz-García, 1997). No obstante no existe división celular.

En nuestro grupo se ha especulado sobre el mecanismo por medio del cual el OSMA adelanta la germinación; de esta forma, se ha determinado en general que procesos de reparación tanto organelar como molecular, así como la reactivación metabólica, se adelantan e incrementan (Cruz-García, 1997; Zúñiga-Aguilar, 1998); se desconoce sin embargo, si existe alguna expresión génica diferencial que sea germinación específica.

Citocininas.

Las citocininas son una clase de hormonas vegetales o fitorreguladores, que como su nombre indica promueven la citocinesis o división celular. Debido a su estructura ha sido relativamente fácil sintetizar análogos funcionales a las sustancias naturales encontradas, que algunas veces pueden tener varios efectos aún en un solo tejido (Sujatha y Reddy, 1998). Se utilizan mucho en cultivo de tejidos vegetales, pero se ha demostrado que posiblemente sean multifuncionales y que participen en diversos procesos; por ejemplo, inducen la formación de cloroplastos y regulan la senescencia (Bidwell, 1989; Wingler *et al*, 1998; Gan y Amasino, 1996), participan en regulación nutricional y por luz (Sano y Youssefian, 1994), activan orígenes de replicación (Houssa *et al*, 1990), inducen proteínas relacionadas con fitopatogénesis (Carpin *et al*, 1998), aumentan la resistencia de las plantas a diversas formas de estrés (Kaminek, 1992), regulan la expresión genética tanto a nivel transcripcional como traduccional

(Schmülling *et al*, 1997) y participan en la formación de órganos (Subramaniam *et al*, 1994), entre otros procesos. Además, como se ha demostrado que los fitorreguladores pueden actuar conjuntamente (Sembdener *et al*, 1994), se ha determinado la participación de las citocininas con auxinas en procesos de desarrollo (Coenen y Lomax, 1998), o con el etileno en su biosíntesis y sus efectos fisiológicos (Vogel *et al*, 1998a, 1998b).

En el laboratorio hemos demostrado que las citocininas provocan un enverdecimiento más rápido durante la imbibición de ejes embrionarios. Durante la germinación, las citocininas promueven la síntesis reparativa de ADN nuclear (Zaraín *et al*, 1987), estimulan la actividad de ADN polimerasas (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990) en particular aquellas enzimas de tipo replicativo (Gómez-Roig, 1999), incrementan hasta por 3 veces el índice mitótico celular (Reyes *et al* 1991), estimulan la actividad de enzimas indicadoras de fosforilación y de reparación (Zúñiga-Aguilar *et al*, 1995) y estimulan proteínas putativamente reguladoras del ciclo celular en ejes embrionarios de maíz, sugiriendo un adelanto en el ciclo celular por acortamiento de las fases G1 y S (Cruz-García *et al*, 1998).

Su mecanismo de acción no es muy claro; en varios casos solamente se tienen ideas sobre su papel regulatorio por inducción o represión de genes cuya función se conoce (Downes y Crowell, 1998; Fang y Hirsch, 1998; Yu *et al*, 1998) y en genes cuya función permanece por determinar (Teramoto *et al*, 1994, 1996; Iwahara *et al*, 1998; Zúñiga-Aguilar *et al*, 1995). Se sabe desde hace algún tiempo que existen proteínas de unión a citocininas (CBP) para las cuales no se ha establecido un papel claro (Moore, 1989; Binns, 1994), aunque se les ha considerado como probables receptores de citocininas (Gonneau *et al*, 1998; Kulaeva *et al*, 1998). Como resultado de los trabajos más completos, se han propuesto 2 sistemas de receptores putativos de citocininas en plantas: el primero, como un análogo a un sistema de 2 componentes bacteriano (Chang y Stewart, 1998) con un receptor putativo (CKI1, Kakimoto 1996, 1998a, 1998b) y reguladores de respuesta (IBC6, IBC7, Brandstatter y Kieber, 1998; ZmCip1, Sakakibara, 1998); el segundo, como un sistema de receptores acoplado a proteínas G (GCR1, Plakydou-Dymock, 1998). El tener al menos 2 tipos de receptores asociados a la acción de las citocininas coincide con el amplio espectro funcional de las mismas, que seguramente depende de la especie, el tejido y la etapa de desarrollo de la planta (Estelle, 1998).

ANTECEDENTES INMEDIATOS

Los dos mecanismos de aceleración de la germinación, el OSMA y la adición exógena de citocininas, aparentemente sincronizan las células del eje embrionario en la fase G1 del ciclo celular, de tal forma que posiblemente lo hagan por los mismos mecanismos moleculares; de esta forma, nuestro grupo ha estudiado este fenómeno tanto con un enfoque deductivo, a través del estudio de proteínas específicas de ciclo celular durante la germinación (Cruz-García, 1997; Zúñiga-Aguilar, 1998), como con un enfoque inductivo, por la búsqueda e identificación de genes cuya expresión sea modificada por la aceleración de la germinación (Gómez-Gutiérrez, 1997; Cruz-García, 1997; Zúñiga-Aguilar *et al.*, 1995, 1998). Se ha determinado que la aceleración de la germinación por citocininas es dependiente de la transcripción, ya que con la adición de inhibidores de ésta última, no se producen los efectos observados (Zúñiga-Aguilar *et al.*, 1995). Debido a lo anterior, se realizó un análisis de ARNms presentes a tiempos determinados durante la germinación acelerada, tanto por OSMA (Cruz-García, 1997) como por citocininas (BA) (Gómez-Gutiérrez, 1997; Zúñiga-Aguilar, 1998), comparándola contra la germinación normal, mediante hibridación substractiva o utilizando desplegados diferenciales en geles de secuenciación ("mRNA-Differential Display", Liang y Pardee, 1992).

La técnica que mejores resultados nos ha dado fue la última, "mRNA-Differential Display", ya que se lograron aislar varios ADNcs de cada tratamiento a diferentes tiempos de germinación, provenientes de ARNms cuya expresión se modificaba putativamente por la aceleración de la germinación; pero debido a que la técnica es muy sensible al detectar diferencias de expresión, por mínimas que sean éstas, dada la amplificación del ADNc por PCR, no fue posible confirmar la expresión de muchos de estos ADNcs por ensayos de hibridación en Northern blot de ARN total.

De los varios ADNcs que fueron obtenidos a partir del "mRNA-Differential-Display", únicamente dos fueron analizados para el presente trabajo: uno llamado epsilon (ϵ) y otro llamado AA9.

El ADNc ϵ fue aislado de muestras de 5 horas de germinación estimulada con citocininas, presentando un comportamiento de disminución en su expresión en comparación con la germinación normal (Gómez-Gutiérrez, 1997), lo que probablemente indicaba que se trataba de una función propia de la embriogénesis tardía.

Por otro lado, el ADNc con el cual se ha tenido un mayor avance es el llamado AA9, que fue obtenido de muestras de 24 horas de GPO (germinación posterior al osmocondicionamiento) y en este caso la expresión del mensajero correspondiente fue confirmada por ensayos tipo Northern blot. Se observó que su expresión se adelanta al estimular la germinación, ya que durante la germinación normal aparece hasta las 24 horas y en la GPO aparece desde las 10-15 horas. El tamaño aproximado del mensajero correspondiente es de aproximadamente 2 kb y se ha determinado que además de expresarse durante la germinación, también se expresa en raíz pero no en tallo ni en hoja de plántula de maíz. El ADNc de AA9, correspondiente a un fragmento de 682 pb, fue secuenciado sin poder determinar un marco definido de lectura de codificación de aminoácido. Las comparaciones realizadas en bases de datos internacionales mostraron alta identidad con una clona de secuencias marcadoras de expresión (EST) en *Arabidopsis thaliana* (Cruz-García, 1997). Así mismo, se determinó que en el tratamiento de estimulación de la germinación con BA, su mensaje se expresaba desde las 6 horas de imbibición, horas antes que en la imbibición normal (Zúñiga-Aguilar, 1998).

PROPÓSITO PRINCIPAL

Identificar la función del producto codificado por el gen AA9 y epsilon.

HIPÓTESIS

La hipótesis que se trabajó fue:

“Realizando comparaciones al nivel de secuencias de ADNc y de la proteína teórica con una base de datos internacional, será posible determinar indicios de la función de las proteínas de los transcritos correspondientes a los ADNcs epsilon y AA9.”

OBJETIVOS

Dado lo anterior la presente tesis tiene como objetivos:

GENERAL

- ✓ Aportar datos bioinformáticos sobre la posible función de las expresiones proteicas de los transcritos de ADNc epsilon y AA9.

PARTICULARES

- ✓ Secuenciar completamente los ADNcs obtenidos, epsilon y AA9.
- ✓ Comparar las respectivas secuencias con bases de datos internacionales.
- ✓ Determinar, utilizando su secuencia, la posible función durante la germinación de maíz.
- ✓ Determinar la expresión del ARNm correspondiente al ADNc AA9 de una manera más específica durante la estimulación de la germinación de maíz.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Partiendo de los ADNc previamente obtenidos por los ensayos de “mRNA-Differential Display”, específicamente epsilon y AA9, se continuó la búsqueda de la función de la proteína para la que codifica el mensaje al que pertenece cada uno de estos ADNc, mediante la comparación de la secuencia de nucleótidos, la determinación del marco de lectura abierto y el análisis de la secuencia de proteína teórica.

En el caso de epsilon se terminó su análisis con la secuenciación completa del ADNc obtenido. Debido a que la identidad y similitud encontrada en las comparaciones con bases de secuencias, tanto a nivel mensaje como a nivel de proteína teórica, fueron de poco interés para el grupo de investigación, por lo que no se realizó ningún trabajo adicional con esta secuencia.

En el caso de AA9, debido a que el ADNc que se tenía estaba incompleto, se busco el ADNc completo para determinar su marco de lectura abierto. Para este fin, primero se utilizaron escrutinios del banco de ADNc con los que ya se contaba, pero con su aislamiento, secuenciación y el análisis de tipo Southern blot se determinó que se contaba más bien con clonas genómicas con las cuales se realizó un nuevo escrutinio del banco original de ADNc.

Se aisló el ADNc completo y se secuenció. La secuencia se analizó comparándola con bases de datos de transcritos de proteínas conocidas, determinando así el marco de lectura abierto, la proteína teórica para la que codifica y las propiedades teóricas propias de la proteína codificada.

Se realizó un nuevo ensayo de hibridación en ARN total para confirmar que el nuevo ADNc de 1407 pb pertenece al mismo transcrito y tiene el mismo comportamiento que el presentado con la sonda utilizada para el escrutinio, AA9 de 682 pb.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se enumeran los materiales y equipo utilizados en la realización de la presente tesis. Se obvian materiales comunes existentes en laboratorios de investigación. Los componentes de medios y soluciones se detallan en el apéndice.

MATERIAL

Biológico

Semilla de maíz *Zea mays* L. var. Chalqueño.

Bacteria *Escherichia coli* cepa Inv α F' y cepa Y1090.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo analítico o grado "biología molecular", salvo los casos en que se especifique otra cosa.

Las enzimas *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Sst* I, *Sac* I, transcriptasa reversa recombinante (SuperScript II), RNasa libre de DNasa, polimerasa de ADN termoestable (*Taq*); así como el dATP, el dGTP, el dCTP y el dTTP, se adquirieron de Gibco-BRL o Böehringer Mannheim (Roche).

La acrilamida, la agarosa, el citrato de sodio, la escalera de masas moleculares de ADN (DNA Mass Ladder), la escalera de tamaños moleculares de ADN de 100pb, el extracto de levadura, el medio LB, el medio LB sólido, la metilén bis-acrilamida, el MOPS, el sistema de purificación de plásmido en minipreparaciones (CONCERT™), la peptona, el tris base, la urea y la solución de extracción de ARN de un solo paso (TRIzol®), se adquirieron de GIBCO-BRL Life Technologies Inc.

El Alcohol isoamílico, el ácido tricloroacético, el alcohol isopropílico, el cloroformo, el ácido acético glacial, el acetato de potasio, el acetato de sodio, el etanol absoluto, el ácido etilén-diamino-tetra-acético, el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico, el cloruro de potasio, el cloruro de magnesio, el

fosfato mono-hidrogenado de sodio, el cloruro de sodio, el fosfato di-hidrogenado de sodio, el fenol, el hidróxido de sodio y la sacarosa, se adquirieron de J.T. Baker ó MERCK.

El β -mercaptoetanol, la BA, el EtBr, el glioxal, el cloranfenicol y el DEPC, se adquirieron de SIGMA-ALDRICH Chemicals.

El sistema de marcaje radiactivo por cebador aleatorio (Random Primer), la [^3H]-Timidina y el α [^{32}P]-dCTP se adquirieron de NEN[®]-Dupont.

El α [^{33}P]-ddATP, el α [^{33}P]-ddCTP, el α [^{33}P]-ddGTP, el α [^{33}P]-ddTTP, el sistema de secuenciación por PCR utilizando terminadores (Thermo Sequenase), el sephadex G-40 y el sephadex G-50, se adquirieron de Amersham Pharmacia Biotech.

La agarosa, el fenol equilibrado a pH=7.5, la Red-Gal, el X-Gal, se obtuvieron de Research Organics.

El paquete de purificación de fragmentos de PCR por gel de agarosa (GEN CLEAN), se adquirió de Promega.

La seda miracloth, las cajas petri de plástico estériles, las navajas, el papel filtro 3MM y el parafilm, se adquirieron de casas comerciales locales.

La película fotográfica y las membranas de nylon cargadas positivamente, se adquirieron de Amersham Pharmacia Biotech.

Los microtubos tipo eppendorf y las puntas de plástico para micropipeta, se adquirieron de RAININ Instrument Co.

Los tubos de 0.5 mL de pared delgada para ensayos de PCR fueron obtenidos de Axygen Inc..

Equipo

La autoclave, el vortex, el horno seco y el politrón, de marca ADEA; las micropipetas, de marca RAININ Instrument Co.; la centrífuga de velocidad media y la microcentrífuga, de marca Sorvall-Dupont; los aparatos de electroforesis vertical, los aparatos de electrofordeis horizontal, las fuente de poder y el secador de gelde, de marca GIBCO-BRL Life Technologide, Inc.; el horno de hibridación, de marca LabNet; el transiluminador de luz U.V., de marca UVP Inc.; el termociclador de marca Perkin Elmer; el horno de entrecruzamiento por luz U.V., de marca Spectronics Corp.; la incubadora digital,

de marca Thermoline; la incubadora 25°C cristal líquido, de marca Lab-Line; contador de centelleo para viales, de marca Beckman; la campana de flujo laminar horizontal, de marca NuAire.

MÉTODOS

Métodos Básicos

Obtenidos de trabajo previo de nuestro laboratorio y los métodos generales de biología molecular de Sambrook *et al* 1989.

Todos los amortiguadores y soluciones se detallan en la sección de apéndice.

Obtención de Ejes Embrionarios de Maíz.

Utilizando una navaja afilada se disecó manualmente el eje embrionario de semillas de maíz, separándolo casi en su totalidad del resto del embrión, procurando no dañar la estructura del eje. Se utilizó inmediatamente ó bien se almacenó a 4°C en un desecador hasta su empleo.

Imbibición de Ejes Embrionarios de Maíz con o sin BA.

Se desinfectaron los ejes embrionarios utilizando hipoclorito de sodio 0.5% por 1 min, enjuagando con agua estéril bidestilada/desionizada por 3-4 veces, dejándose secar completamente al aire estéril de la campana de flujo laminar. En cajas petri estériles se colocó papel filtro y se agregó suficiente solución de imbibición con o sin BA para saturar el papel filtro. Se colocaron los ejes embrionarios tomando como el tiempo de inicio de la imbibición el término de la colocación de los ejes en el papel filtro. Se tapó y selló cada caja petri con parafilm, incubando a 25°C en oscuridad, por el tiempo deseado.

Prueba de Estimulación de la síntesis de ADN por BA en Ejes Embrionarios de Maíz.

Se imbibieron 3 series de 10 ejes embrionarios con solución de imbibición con BA (10^{-6} M) y 3 series de 10 ejes embrionarios con solución de imbibición sin BA por 24 horas, adicionando en todos los casos 20 μ Ci/mL de [3 H]-timidina. Al terminar este tiempo se eliminó la solución de imbibición residual lavando, por cada 10 ejes embrionarios, con 5 mL de citrato de sodio 5% estéril, separándose como material radiactivo. Se agregaron 2 mL de SAL por cada 10 ejes embrionarios, homogeneizando

perfectamente en un politrón utilizando el vástago adecuado, procurando que no quedaran residuos de ejes embrionarios.

Las macromoléculas se precipitaron con 1 mL de TCA al 20% por cada 2 mL de homogenado, reposando en hielo por 15min. Se filtró al vacío, lavando con 10mL de TCA al 10%, después con 10mL de TCA 5% y, finalmente, con 10 mL de etanol grado industrial, dejando evaporar casi a sequedad. Los filtros se terminaron de secar en un horno a 54°C por 30min-1hora. Se agregaron 2 mL de solución de centelleo por cada filtro a un frasco vial leyéndose las c.p.m. por 1 min.

Cuantificación de ARN y ADN: Método espectrofotométrico.

Se utilizó cuando se esperaba una concentración mayor a 150 ng/ μ L. Se midió la absorbencia de 1 μ L de ARN o ADN a cuantificar en una celda de cuarzo de 1 mL a 260 nm de longitud de onda, aforando al volumen de la celda con agua bidestilada. Se corrigieron las lecturas tomadas restando las lecturas de los blancos, que se habían tomado previamente, tomando en cuenta que 40 μ g/mL de RNA = 1 U.A. a 260 nm y 50 μ g/mL de ADN = 1 U.A. a 260 nm. Con estos datos se determinó la concentración en μ g/mL de ARN o de ADN en la muestra original. Para verificar su pureza se midió la absorbencia a 280 nm y se calculó la relación $U.A._{260}/U.A._{280}$ verificando que esta estuviera entre 1.9 y 2.0.

Cuantificación de ADN: Método electroforético.

Se utilizó cuando se esperaba una concentración menor a 150 ng/ μ L. Se agregó 1 μ L de la escalera de masas moleculares de ADN ("DNA Mass Ladder", 2 μ L de esta mezcla tienen ADN de: 2000 pb (100 ng), 1200 pb (60 ng), 800 pb (40 ng), 400 pb (20 ng), 200 pb (10 ng) y 100 pb (5 ng), (Gibco-BRL, 1999)) y 1 μ L del ADN a cuantificar con amortiguador de carga para ADN, en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X y se sometió a una diferencia de potencial de 83 V hasta que el colorante azul de bromofenol estuvo aproximadamente a 1 cm del final del gel. Se visualizó el gel en un transiluminador de luz U.V. y se obtuvo la concentración del ADN a cuantificar por comparación visual con la tabla provista por el fabricante.

Corte de ADN con enzimas de restricción.

Aproximadamente por cada 100 ng de ADN resuspendidos en 8 μL totales, se agregó como máximo 1 μL (10 U) de la enzima de restricción a utilizar y 1 μL del amortiguador respectivo, obteniendo como volumen final 10 μL . Se incubó a 37 °C por al menos 4 horas ó toda la noche si la enzima tenía suficiente estabilidad. En el caso de una doble restricción, cuando el amortiguador servía para ambas enzimas, se disminuyó a la mitad la cantidad de enzima, es decir, se agregó como máximo 0.5 μL (5 U) de cada una de las enzimas. Si se daba el caso de la ausencia de corte, se disminuía la concentración del ADN diluyéndolo con agua estéril y ajustándolo a 8 μL como volumen total de ADN.

Marcaje de sondas radiactivas por cebador aleatorio ("Random primer").

Se desnaturalizaron de 30-50 ng del ADN de doble cadena a marcar, incubándose a 100 °C por 5 min. Se enfrió en hielo 5 min. Se agregaron 6 μL de amortiguador de reacción con los cebadores, 6 μL de dNTPs menos dCTP, $\sim 30 \mu\text{Ci}$ de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP, agua hasta los 30 μL y 1 μL del fragmento Klenow de la ADN pol I de *E. coli*. Se incubó por 2 h a 37 °C o durante toda la noche. Se adicionaron 8 μL de $\text{Na}_4\text{-EDTA}$ 250 mM pH=8.0 y 160 μL de STE, se purificó pasando la mezcla de reacción por una columna de sephadex G-50, utilizándose directamente para hibridación.

Para medir la incorporación del isótopo radiactivo al nuevo ADNc marcado radiactivamente, se tomó 1 μL de la reacción antes de purificarla y 1 μL de la reacción de purificación, comparándose la cantidad de marca radiactiva antes y después de la reacción de síntesis de la sonda

Purificación de ADN por columna de sephadex G-50.

La columna de purificación se empaquetó lentamente en una jeringa de 1 mL con la resina sephadex G-50 equilibrada en STE pH=7.0, centrifugándola a 1600 $\times g$ / 5 min /T.A., hasta completar 1 mL. Se lavó 4 veces con 100 μL de STE pH=8.0. Se agregó la reacción a purificar y se dio un último ciclo de centrifugación a la misma velocidad y temperatura, recolectándose la sonda marcada en un tubo de 1.5 mL

Extracción de ADN genómico de ejes embrionarios de maíz.

Se homogeneizaron 20-50 ejes embrionarios con nitrógeno líquido en un mortero hasta dejar un polvo fino. Se agregaron 20 mL de amortiguador de extracción y se incubó a 65 °C por 10 min. Se adicionaron 6.6 mL de acetato de potasio 5 M, se mezcló bien e incubó en hielo 30 min. Se centrifugó a 38600 xg / 20 min / 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de una tela Miracloth, en un tubo que contenía 20 mL de isopropanol a 4 °C, mezclando suavemente y se dejó reposar a -20 °C por al menos 30 min. Utilizando un gancho de vidrio estéril se colectó el ADN precipitado en forma viscosa y se transfirió a un tubo estéril de 1.5mL, se resuspendió en 100 μ L de H₂O y se trató con RNasa.

Tratamiento de ADN genómico con RNasa.

Se trataron aproximadamente 100 μ g de ADN resuspendido con 200 U de RNasa durante al menos 30 min a 37 °C. Se precipitó de nuevo con 0.1 de volumen de acetato de sodio 3 M pH=5.2 y 2 volúmenes de etanol, y se dejó a -20 °C por al menos 30 min para su precipitación. Se resuspendió en un volumen conocido.

Extracción de ARN total de ejes embrionarios de maíz.

Se homogeneizaron perfectamente 10 ejes embrionarios (~ 100 mg) en un mortero con 1 mL de TRIzol®, incubándose por 10 min a T.A. Inmediatamente, se procedió a centrifugar a 15000 xg / 10 min / 4 °C para sedimentar restos celulares. Se tomó el sobrenadante procurando no llevar ningún resto del sedimento y se le agregaron 0.3 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), se agitó fuertemente en un vórtex y se centrifugó a 11500 xg / 10 min / 4 °C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo más 500 μ L de TRIzol®, se incubó de nuevo 10 min. a T.A., se extrajo con 0.3 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se centrifugó bajo las mismas condiciones descritas previamente. Se tomó la fase acuosa y se extrajo en un nuevo tubo con ½ volumen de cloroformo, centrifugándose en las condiciones descritas y transfiriéndose la fase acuosa a un nuevo tubo. En este último paso se precipitó el ARN con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100 % a -20 °C, mezclando suavemente por inversión del tubo. Se dejó reposar 20-30 min a -70 °C, se procedió a una centrifugación de 12000 xg / 10 min / 4 °C, se lavó la pastilla formada con etanol 70% y se volvió a centrifugar por solamente 5 min, repitiéndose este

lavado. Se secó al aire la pastilla por aproximadamente 5 min y se reconstituyó en 100-200 μ L de agua libre de RNasa. Se procedió a su cuantificación.

Tratamiento de ARN total con DNasa I.

A un tubo de 1.5 mL se le adicionó: 50 μ g de ARN total, 20 U de inhibidor de RNasa, 10 U de DNasa I libre de RNasa, 5 μ L de amortiguador de DNasa 10 X y agua libre de RNasa hasta 50 μ L. Se incubó por 45 min a 37 °C. Se aforó con agua libre de RNasa a 300 μ L y se extrajo con 300 μ L de fenol-cloroformo (5:1). Se centrifugó a 15000 xg / 5 min / T.A. y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH= 5.2 y 2 volúmenes de etanol 100 % a -20 °C. Se dejó reposar 30 min a -70 °C y se centrifugó a 15000 xg / 5 min / 4 °C. Se resuspendió la pastilla en aproximadamente 50 μ L de agua libre de RNasa. Se cuantificó de nuevo el ARN y se precipitó el volumen que se iba a utilizar para resuspender el volumen de carga deseado en agua libre de RNasa y observar la integridad del ARN en un gel desnaturizante utilizando glioxal.

Ensayos de hibridación en Northern blot.

Electroforesis desnaturizante de ARN: método con glioxal.

Se prepararon las muestras de ARN total de la siguiente forma: se colocó suficiente ARN (1-5 μ g), ajustando su volumen al 18.1 % de una mezcla con 18.1 % glioxal, 53.8 % de dimetilsulfóxido y 10 % de RGRB 1X; en el caso de que los volúmenes de las muestras de ARN tuvieran que variar para tener las mismas cantidades en el gel, se utilizó agua libre de RNasa para completar el porcentaje marcado, sin excederlo. El volumen de la muestra a cargar dependió del volumen de los pozos del gel realizado. Se homogeneizó la mezcla y se incubó por 1 hora a 50 °C, terminado este tiempo se enfrió en hielo y se agregó de 2-4 μ L de RGLB, quedando lista para ser cargada en el gel.

Durante la incubación anterior, se elaboró un gel de agarosa al 1.5 %, con agua libre de RNasa en el cual fueron cargados los ARNs como se indica. Una vez cargadas las muestras en los pozos, se sometió el gel a electroforesis en una cámara con FGRB 1X por un tiempo aproximado de 4 horas con una diferencia de potencial de 90 V. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con una solución que contenía acetato de amonio 0.1 M y EtBr 0.1% por 20 min, y se observó en un transiluminador de luz U.V. para corroborar su correcto corrimiento y calibración. A continuación se eliminó en su mayoría el

EtBr del gel eluyéndolo con 5 volúmenes de agua libre de RNasa por 3-4 veces durante 1-2 horas. Después de este tratamiento, el ARN del gel se transfirió a una membrana de nylon por elución capilar como se esquematiza en la Figura 2.

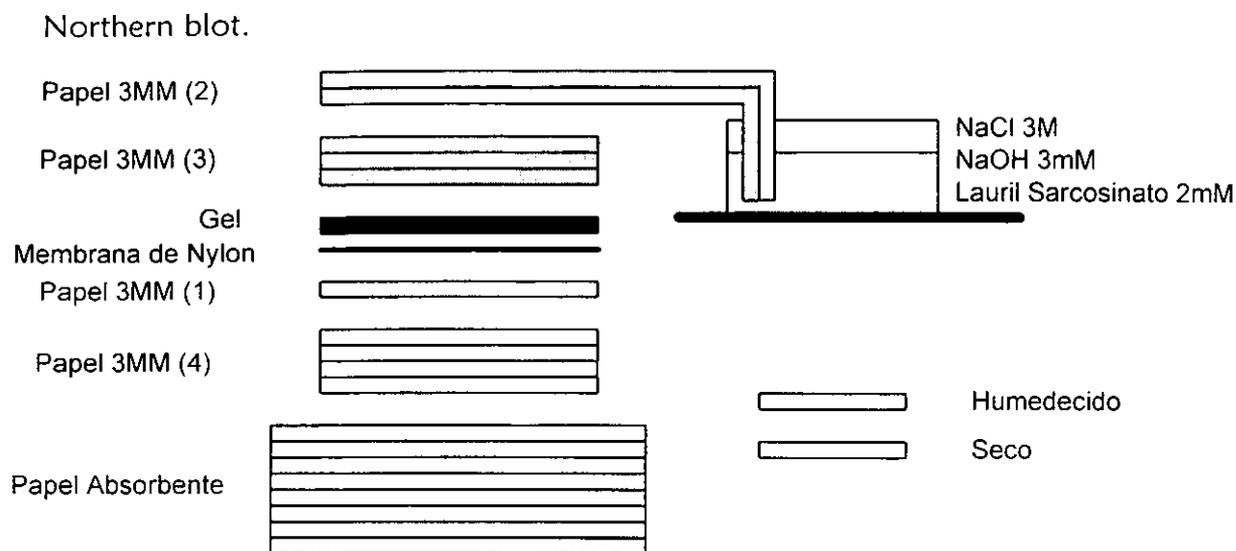


Figura 2. Diagrama de transferencia de ARN a membrana de nylon

Antes de colocar la membrana de nylon se humedeció en la solución de transferencia de forma homogénea para evitar la formación de burbujas en ella y se colocó sobre el papel 3 MM humedecido con la misma solución. Se colocó el gel con los pozos hacia arriba para que la membrana tuviera el mismo orden de carga que el gel. Se colocaron por encima varias capas de papel 3 MM humedecido, cuidando que el papel 3 MM fuera del mismo tamaño que el gel y la membrana, salvo los que estuvieron introducidos en el amortiguador. Se transfirió por 12-24 horas y una vez terminada la transferencia, se cortó el gel junto con la membrana marcando el sitio de posición de los pozos. Se verificó la transferencia completa del ARN a la membrana, incubando el gel en una solución con EtBr 1 mg/mL y observándose en el transiluminador de U.V.

Se fijó el ARN a la membrana de nylon en un horno de entrecruzamiento de luz U.V. a $120,000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 2 veces por 30 s.

En ocasiones se observó el ARN en la membrana incubando esta por 1 min con una solución de azul de metileno 0.03 % y acetato de sodio 0.3 M y lavándola en varias ocasiones con agua libre de RNasa.

Hibridación y autorradiografía.

Se realizó una prehibridación colocando la membrana fijada en solución de hibridación e incubándola en un agitador a 60-65 °C por 4-15 horas en el horno de hibridación. El segmento de ADN de doble cadena marcado radiactivamente por cebador aleatorio a utilizar como sonda, se desnaturalizó por 5 min y se enfrió en hielo; se utilizó suficiente sonda para tener 10⁷ c.p.m. por hoja de membrana de nitrocelulosa (12x14cm). Una vez transcurrido el tiempo de prehibridación, se desechó la solución de hibridación presente y se agregó nueva solución atemperada, junto con la sonda radiactiva desnaturalizada teniendo cuidado de no bajar la temperatura del horno por mucho tiempo. Se mantuvo en el horno de hibridación en rotación continua a 60-65 °C durante 12-20 horas. Se lavó la membrana en SSC 0.1 X y SDS 0.5 % (p/v) a 60-65 °C dos veces por 5 min y dos veces por 10 min, cambiando la solución de lavado. Se realizó una autorradiografía de la membrana de nylon, envuelta en plástico para que no se secase, estimando el tiempo de exposición por las c.p.m.

Clonación.

Preparación de células competentes (Inoue et al 1990).

Se propagaron células bacterianas de la cepa de elección por una noche en medio LB. Después se propagó una alícuota en medio SOB a 18 °C hasta una D.O.₆₀₀=0.6 y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 2500 xg / 10 min / 4 °C y se resuspendió suavemente el paquete celular en 80 mL de TB a 4 °C. Se repitió la centrifugación a las mismas condiciones y se resuspendió el paquete en 20 mL de TB a 4 °C. Se agregó DMSO para tener una concentración final del 7 %. Se incubó en hielo 10 min y se almacenó a -70 °C en alícuotas de 50 µL hasta su uso, previo a 1 mes. Estas células tienen una eficiencia de transformación de 2 x 10⁸ células transformantes por µg de ADN de plásmido.

Ligación en plásmido.

Se utilizó el plásmido pCR™ 2.1 ó el plásmido pBluescript KS (+), para clonar fragmentos de ADN. Los fragmentos y el plásmido fueron digeridos con la misma enzima de restricción para poder ligarse. En el caso de los productos de PCR sin sitios conocidos de restricción para su ligación, se utilizó la reacción de PCR con menos de 5 horas de realizada para no perder las desoxiadenosinas que

coloca la *Taq* polimerasa en los extremos hacia 3' del segmento amplificado, utilizadas para la ligación en el plásmido diseñado para este fin.

Se colocó la reacción de ligación como sigue: 1 μL de amortiguador de ligación, 1 μL de T4 DNA ligasa, 25 ng del plásmido, 10-20 ng de ADN a clonar y agua estéril hasta completar 10 μL de la reacción. Se incubó a 14 °C por toda la noche y se guardó a 4 °C.

Transformación en bacterias.

La reacción de transformación se realizó de la siguiente manera: a 2 tubos conteniendo cada uno 50 μL de células *Inv* α F' competentes se les agregó, a cada uno, 2 μL de β -mercaptoetanol 0.5 M, mezclando suave y cuidadosamente con la punta de la pipeta. Se agregaron respectivamente, 2 μL y 4 μL de la reacción de ligación en cada tubo, agitando de la misma manera y se incubaron por exactamente 30 min en hielo. Se realizó un choque térmico a 42 °C por exactamente 30 s sin agitar los tubos y se regresaron a hielo por otros 2 min. Se agregaron 450 μL de medio SOC a temperatura ambiente y se agitaron los tubos por 1 hora a 37 °C a 225 r.p.m. en un agitador orbital. Se sembraron 200 μL y 400 μL de cada tubo en 2 cajas respectivamente que contenían medio LB con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de X-Gal. No se agregó IPTG porque la cepa de *E. coli* *Inv* F' no expresa el represor *lac*, por lo que no necesita inductor. Se dejó crecer por 24 horas y se realizaron minipreparaciones de las colonias de bacterias que tuvieran el plásmido (resistentes) con el inserto (blancas).

Minipreparación de plásmidos I.

Este tipo de minipreparación se utilizó para realizar comprobaciones en donde no se necesitara alta pureza del plásmido.

Se tomó una asada de la colonia y se propagó por 12 horas en 2 mL de medio líquido LB con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Se tomaron 1.5 mL y se centrifugaron a 4000 $\times g$ / 10 min / 4 °C. Se resuspendió en 200 μL de solución I a 4 °C. Se adicionaron 400 μL de solución II a temperatura ambiente agitando manualmente. Por último, se agregaron 300 μL de solución III a 4 °C, se agitó por 10 s y se dejó en hielo 3.5 min. Se centrifugó a 12000 $\times g$ por 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

(25:24:1) y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol 100 % a -20 °C. Se resuspendió en STE pH=8.0 según el volumen de la pastilla.

Minipreparación de plásmidos II.

Este método se utilizó cuando se necesitó plásmido de mayor pureza para poder secuenciar ya sea manualmente o utilizando un secuenciador automático.

Se utilizó el sistema CONCERT de GIBCO-BRL para aislamiento de plásmidos de minipreparaciones con alta pureza. Se siguió el protocolo tal como lo recomienda la casa comercial.

Escrutinio de la biblioteca de ADNc.

Se escrutinio una biblioteca de ADNc pertenecientes a ARNms aislados de raíz y tallo de plántula de maíz, clonados en el bacteriófago con sitios de corte para la enzima de restricción *Eco* RI utilizados para la liberación de inserto del ADNc del ADN del bacteriófago λ gt₁₁.

Preparación de bacterias hospederas para cultivo en placa (Y1090).

Debido al reconocimiento del bacteriófago por los receptores a maltosa presentes en la bacteria, se tiene que preparar un cultivo con medio básico y maltosa para la infección de los bacteriófagos. Se inoculó una colonia de la bacteria hospedera, cepa de *E. coli* Y1090, en 50 mL de medio de crecimiento para bacterias hospederas del bacteriófago en un frasco estéril y se propagó toda la noche en agitación a 30 °C para que existiera sobre-población de las bacterias. Se centrifugaron las células a 2500 \times g / 10 min / 4 °C. Se decantó el medio y el paquete celular se resuspendió en aproximadamente 15 mL de sulfato de magnesio 10 mM sin utilizar el vórtex. Se diluyeron las células con sulfato de magnesio 10 mM hasta obtener una D.O.₆₀₀=0.5. Se utilizaron aproximadamente 600 μ L de células con esta densidad óptica para plaquear en caja petri de 150 mm de diámetro y 200 μ L para cajas petri de 100 mm. No se utilizaron células propagadas después de 2 días de la incubación.

Titulación de la biblioteca.

Por el tamaño del banco de ADNc de maíz se utilizaron diluciones del bacteriófago que dependieron del título previo de la biblioteca en el momento del tamizado, para que permitieran

sondear entre 300,000-400,000 clonas. Se esperaba un título del banco del orden de 1×10^{12} - 1×10^{12} pfu/mL, por lo que las diluciones que se manejaron fueron del orden de 1×10^7 . Se realizaron varias diluciones del banco de ADNc para poder obtener unidades formadoras de placas que pudiesen ser contadas. Se adicionó 1 μ L de la dilución de bacteriófagos a 200 μ L de células hospederas con $D.O_{600}=0.5$ y se incubó 15 min a 37 °C para permitir que los bacteriófagos reconocieran a las bacterias. Se vertió, en campana de flujo laminar, todo el contenido de la suspensión de bacteriófagos en cajas con medio LB atemperadas a 20-25 °C y se adicionó agar suave (45-48 °C, 2.5-3 mL en cajas de 100 mm de diámetro y 4-5 mL en cajas de 150 mm de diámetro), se agitó circularmente con suavidad hacia la derecha, izquierda, arriba y abajo, para homogeneizar antes de la solidificación del agar. Se incubó a 37°C por 6-8 horas y se contaron las placas para determinar las unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/mL) de la muestra original.

Protocolo de tamizado de la biblioteca.

El primer escrutinio se realizó en cajas petri de 150 mm de diámetro, utilizando bacterias hospederas preparadas y conociendo el título de la biblioteca. Fueron sembradas aproximadamente 50,000 pfu/caja petri con agar NZYDT utilizando 600 μ L de células con $D.O_{600}=0.5$ y 4-5 mL de agar suave. Se realizó un total de 8 plaqueos para tamizar aproximadamente 400,000 pfu. Se incubaron a 37 °C por 6-8 horas o toda la noche. Una vez terminada la incubación, se refrigeró a 4 °C por 2 horas para prevenir que la membrana utilizada se pegara al agar suave. Se colocó un círculo de membrana de nylon en la caja petri del tamaño de ésta y se marcó picando con una aguja en 3 esquinas de la membrana, marcando esta posición en las orillas de la caja petri por afuera con tinta indeleble y se dejó transferir por 2 min procurando mantener una temperatura baja y en zona de esterilidad. Una vez terminado el tiempo, se separó la membrana del agar con cuidado de no levantarlo y se desnaturalizó sumergiéndola por 2 min en una solución 1.5 M de cloruro de sodio y 0.5 M de hidróxido de sodio, procurando eliminar los residuos de agar. Se neutralizó sumergiéndola por 2 min en una solución 1.5 M de cloruro de sodio y 0.5 M de Tris-HCl pH=8.0. Por último, se enjuagó 30 s en una solución 0.2 M de Tris-HCl pH=8.0 y 2X SSC. Se secó en un papel filtro 3MM en la campana de flujo laminar y se fijó por entrecruzamiento con luz U.V. Se guardaron las cajas de agar a 4 °C para un análisis posterior.

Hibridación.

Se realizó la prehibridación en las membranas con solución de hibridación a 66 °C, por 2 horas. Se utilizó el ADNc de doble cadena llamado AA9 de 682 pb marcado radiactivamente por el método de cebador aleatorio como sonda, agregándose una reacción de marcaje ya desnaturalizada por cada 2 membranas a hibridar. Se agregó aproximadamente 1 mL de solución de hibridación atemperada a 66 °C por cada una de las membranas. Se hibridó a 66 °C por 18-20 horas, se lavó a la misma temperatura con solución 0.1 X SSC y 0.1 % SDS, 2 veces por 15 min y 1 vez por 5 min. Se expusieron las membranas contra una película fotográfica.

Segundo y tercer tamizado.

Las películas expuestas del primer escrutinio se utilizaron para realizar el segundo y tercer escrutinio, alineándolas con la caja respectiva en un transiluminador y se seleccionaron las placas putativas de hibridación positiva que tuvieran la señal más fuerte, cortando aproximadamente 1 cm² alrededor de la placa de lisis elegida. Se eluyó la sección de agar con 1 mL de medio SM y 20 µL de cloroformo con agitación fuerte por 1 min. Se centrifugó para sedimentar el cloroformo y el agar residuales, vertiéndose la fase acuosa a un tubo estéril nuevo con 20 µL de cloroformo. Se utilizó este nuevo concentrado de bacteriófagos para hacer el segundo escrutinio de la misma forma que el primero pero en cajas petri de 100 mm de diámetro. Una vez teniendo los resultados de este segundo tamizado se realizó un tercero para aislar la clona de mayor interés. En ocasiones se realizó un cuarto tamizado para asegurar más la pureza de la clona.

Extracción de ADN de bacteriófago λ por el sistema de QIAGEN.

Se aisló ADN del bacteriófago λ_{g11} a partir del 3° ó 4° escrutinio de la biblioteca de ADNc por medio del sistema de extracción de ADN de lisados en placa de QIAGEN. Se siguió el protocolo tal como lo recomienda la casa comercial.

Amplificación de insertos por PCR

Para la realización de un escrutinio rápido de las clonas aisladas en el 3° o 4° escrutinio de la biblioteca de ADNc, se realizaron ensayos de amplificación con los cebadores del bacteriófago con el

fin de corroborar el tamaño del inserto y poder comprobar su hibridación con la sonda sin extraer ADN del bacteriófago.

Se preparó una caja petri de 150 mm de diámetro con agar LB, adicionándole 600 μ L de bacteriófago incubado con el hospedero específico (cepa *E. coli* Y1090) con un título aproximado de 1×10^8 pfu/mL. Una vez observada la aparición clara de las placas de lisis, se eluyeron en 5 mL de medio SM. Se preparó la siguiente reacción de amplificación generalmente en una reacción de 100 μ L.

Reactivo:	Cantidad (μ L)
Amortiguador <i>Taq</i> (10 X)	10.0
MgCl ₂ (15 mM)	6.0
dNTPs (10 mM)	2.5
Cebador λ_{gt11} FORWARD (10 μ M)	3.0
Cebador λ_{gt11} REVERSE (10 μ M)	3.0
Elución de Placas	10.0
<i>Taq</i> Polimerasa	1.5
H ₂ O	64.0

Se sometió la reacción a 30 ciclos de: 94 °C por 1 min después a 60 °C por 2 min y por último a 72 °C por 2 min , con un tiempo final de 10 min a 72 °C para terminar la extensión.

Secuenciación

Reacción de Secuenciación

Se utilizó el sistema de marcaje radiactivo por PCR utilizando didesoxinucleótidos terminadores de la reacción Thermo Sequenase de Amersham Pharmacia Biotech, que utiliza una polimerasa recombinante termo-resistente. Se siguió el método recomendado por la casa comercial con variaciones de ajuste que se consideran directamente en el manual del sistema. Se diseñaron oligonucleótidos para funcionar como cebadores en la reacción de secuenciación, utilizando el programa Primer Design (ver apéndice) y se mandaron a sintetizar en Biosynthesis, Inc.

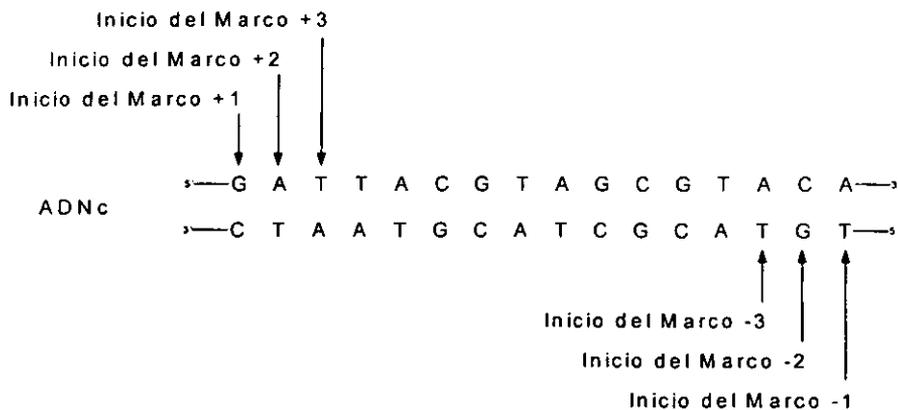
Se utilizó también el servicio de secuenciación automática del Instituto de Biotecnología de la UNAM, ubicado en Cuernavaca, Morelos para realizar las últimas secuenciaciones del ADNc aislado.

Método de análisis de las secuencias:

Se realizaron comparaciones de la secuencia contra las bases de datos disponibles con los programas que utilizan el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) versión 2.0.10, BLASTN, a nivel de nucleótidos, y BLASTX, que compara la secuencia peptídica de los 6 marcos de lectura posibles. Este programa tiene un algoritmo de búsqueda de similitudes entre secuencias, utiliza como unidad fundamental los pares de segmentos de alineamiento de alto puntaje (HSP), analizando la significancia de las comparaciones entre secuencias de nucleótidos ó aminoácidos por medio de ecuaciones estadísticas (Karin y Altschul, 1990; 1993). Compara secuencias parciales de la secuencia total hasta llegar al límite de error que se le asigna previamente al programa, considerando identidad, similitud (solo en secuencias peptídicas), tamaño de la secuencia comparada, tamaño de la secuencia analizada, saltos dentro del alineamiento, como las principales características que darán el Error Esperado de que la secuencia sometida a análisis sea la secuencia encontrada en la base de datos. Con base en la experiencia adquirida se buscaron probabilidades de error menores de 0.1 en secuencias nucleotídicas y menores o alrededor de 1.0 en secuencias peptídicas, para que el alineamiento fuera más representativo.

En los casos en que se realizó la búsqueda de secuencias consenso de poliadenilación pertenecientes al extremo 3' de un ARNm de especies eucariontes, se utilizó el método Hamming-Clustering (Milanesi *et al*, 1996) para detección de señales de poliadenilación.

Cuando se realizó la determinación del marco de lectura de la secuencia se consideraron los 6 marcos posibles de lectura de una secuencia de doble cadena de ADNc, como se ejemplifican en el siguiente diagrama:



Se lee la secuencia de 5'-3' en todos los marcos + y -, pero la dirección en los marcos - con respecto a la referencia es 3'-5', que por consenso es la cadena superior.

Utilizando el código genético universal, los codones leídos codifican para las siguientes secuencias peptídicas, según el ejemplo:

Marco	Marco	Marco
+1: gat-tac-gta-gcg-tac	+2: att-acg-tag-cgt-aca	+3: tta-cgt-agg-gta
Asp-Tyr-Val-Ala-Tyr	Ile-Thr-stop-Arg-Thr	Leu-Arg-Ser-Val
D Y V A Y	I T - R T	L R S V

Marco	Marco	Marco
-1: tgt-acg-cta-cgt-aat	-2: gta-cgc-tac-gta-atc	-3: tac-gct-acg-taa
Cys-Thr-Leu-Arg-Asn	Val-Arg-Tyr-Val-Ile	Tyr-Ala-Thr-stop
C T L R N	V R Y V I	Y A T -

RESULTADOS Y ANÁLISIS

SECUENCIACIONES REALIZADAS:

Epsilon (ϵ)

Como se mencionó en la introducción, epsilon es un ADNc aislado a partir de una reacción de RT-PCR utilizando ARN total ("mRNA-Differential Display"), con una expresión diferencial de inhibición aparente ante la estimulación de ejes embrionarios por BA (Gómez-Gutiérrez, 1997).

El inserto, con un tamaño de 241 pb, fue secuenciado en su totalidad. La secuencia se presenta en la Figura 3, producto de la amplificación del "mRNA-Differential Display" utilizando un oligonucleótido cebador de anclaje a la cola de poliadenina (5'-TTTTTTTTTTTCC-3') y un oligonucleótido cebador como decámero aleatorio (5'-TCTGGCGCAC-3'), sin incluir los sitios de ligación y corte para *Eco* RI flanqueantes de la secuencia, que son incluidos por el sistema de clonación para productos de PCR (Invitrogen, 1995).

```
5' TCTGGCGCAC accgttgag ggcgggtctt gctacgatcg gttggccttc gcgctgcatg
3' AGACCGCGTG tggcaacctc ccgcccagaa cgatgctagc caaccggaag cgcgacgtac

agtgcaatct cttgctcgag ttccgagccc tetgctccta gtctcatatc atctgtcaca
tcacgttaga gaacgagctc aaggctcggg agacgaggat cagagtatag tagacagtgt

ctttggcttg cacggagaca cgtggcgta gcctcaagga tctttctgct tttgaaggtt
gaaaccgaac gtgcctctgt gcaccgcaat cggagttcct agaagacga aaacttccaa

gcggttcttg atgcgcaagg cccataggct gtagctgttc ttctgctgGG AAAAAAAAAA A 3'
cgccaagaac tacgcgttcc gggtatccga catcgacaag aagacgacCC TTTTTTTTTT T 5'
```

Figura 3. Secuencia de ADNc de doble cadena de Epsilon. Nucleótidos en negrita mayúscula (5'-TCTGGCGCAC-3', 5'-TTTTTTTTTTTTCC-3'): Oligonucleótidos utilizados para el "mRNA-Differential-Display" y para la posterior reamplificación (Gómez-Gutiérrez, 1997).

Utilizando el programa BLAST (ver: materiales y métodos, apéndice), en la comparación contra secuencias de los bancos de datos a nivel de nucleótidos en la base de datos EST (Expressed Sequenced Tags, Genbank), se encontró una secuencia que producía el menor error esperado de epsilon, la cual se muestra a continuación:

Numero de Acceso: **AI734351.1**

Descripción: "Ear tissue cDNA library from Schmidt lab *Zea mays* cDNA, mRNA sequence".
ADNc de *Zea mays*, biblioteca de ADNc de tejido de mazorca tierna, laboratorio de Schmidt.

Longitud = 556 nucleótidos.

Alineamiento: (|: Existe Identidad, *: No existe identidad, -: Salto)

```
Epsilon:      41 gttggccttcgcgctgcatgagtgcaatctcttgctcgagttcc-gagccctctg 94
                |||*|||*|||*|||
AI734351.1: 128 gttggccttcgcgctgcatgagcgcaatctcttgcttgagttcctgagccctctg 74

Epsilon:      95 ctctagtctcatatcatctg 115
                |||*|||
AI734351.1:  73 ctctcgtctcgtatcatctg  53
```

Identidad = 71 nt / 76 nt (93%).

Cadena Comparada = Epsilon 5'-3' / AI734351.1 Complementaria.

Salto = 1 nt / 76 nt (1%).

Error Esperado = 2×10^{-20} .

El ADNc contra el que se compara fue obtenido de una biblioteca de ADNc de ARNm aislado de mazorca completa de maíz en etapas tempranas de su formación, específicamente cuando consigue obtener un tamaño entre 0.5 y 2.0 cm de longitud (Walbot, 2000). Debido a que es un EST, no se ha determinado ninguna función asociada al ARNm de este ADNc, salvo su presencia en el tejido del cual se aisló.

Como se aprecia, el error esperado es muy bajo, debido a la identidad alta y a que solamente presenta un salto en la comparación entre secuencias, aunque cabe mencionar que solamente se comparan 76 nucleótidos de la secuencia obtenida de epsilon que tiene 241 pb, por lo que se comparó únicamente el 31.54 % de la secuencia obtenida, que realmente es un segmento pequeño. En cuanto a

la secuencia codificante, se observa que el programa comparó principalmente la secuencia marcada en el banco de EST como complementaria.

Debido a que la comparación a nivel de nucleótidos presentó poca información sobre la posible función o características del ARNm del ADNc epsilon, se buscaron secuencias consenso para sitios de poliadenilación, por la premisa de que por el método de "mRNA-Differential-Display" se aíslan los ADNc de ese extremo (3') del ARNm (Liang y Pardee, 1992), sin lograr determinar alguna secuencia consenso.

Se compararon los 6 posibles marcos de lectura de secuencias peptídicas que presenta este ADNc tratando de determinar el marco de lectura correcto de epsilon, pero no se encontró ningún marco que fuera confiable, debido a varios codones de detención de la traducción (STOP, en ADNc: TAG, TAA ó TGA) existentes en estos marcos, por lo cual se compararon todos los marcos de lectura de contra traducciones o proteínas secuenciadas.

Las comparaciones con menor error esperado a nivel de traducción conceptual de epsilon en las bases de datos de secuencias no redundantes (Traducciones de ARNms, PDB, SwissProt, SPUpdate y PIR), se obtuvieron en su mayoría con identidad y similitud alta en el marco de lectura -3. Estas comparaciones se muestran a continuación, alineando la secuencia comparada contra la del marco -3 de epsilon:

1) Número de Acceso: AAA33458.1.

Descripción : "Late embryogenesis abundant protein".

Proteína abundante en embriogénesis tardía de maíz [*Zea mays*], del ADNc con número de acceso M90554, gen Emb5 [*Zea mays*].

Longitud = 110 aminoácidos.

Alineamiento: (|: Existe identidad, +: Existe similitud, *: No existe identidad ni similitud)

```
Epsilon: 95 AEGSELEQEIALMQREGQPIVAR 27
          |*|*|**+|+|*|**|||*+|||
LEA:      2  ASGQESREELARMAEEGQTVVAR 24
```

Marco de Lectura Comparado = Epsilon -3' / LEA reportada

Error Esperado = 0.11.

Identidad = 12 aas / 23 aas (52%).

AA9

Como se comentó en la introducción, al inicio de la presente tesis se contaba con un ADNc obtenido por "mRNA-Differential-Display" de ARN total de semilla de 24 horas de GPO, que mostraba un aumento en su expresión durante la GPO, en comparación con su conducta durante la germinación normal (Cruz-García, 1997). Además, se determinaron identidades altas del ADNc con secuencias de ADNc de arroz en bancos de EST y también de las proteínas conceptuales de los 6 marcos de lectura producidos por este ADNc, con una proteína de traducción conceptual de *Arabidopsis thaliana*.

Debido a que se tenían algunas dudas con respecto a la secuencia, ya que no presentaba marcos de lectura claros y bien definidos para el análisis a nivel traduccional con la proteína conceptual, se realizó una secuenciación manual más minuciosa de este ADNc. Cabe mencionar, como característica específica de este ADNc, que desde los ensayos de "mRNA-Differential Display", de donde fue aislado (Cruz-García, 1997), fue amplificado utilizando un solo oligonucleótido como cebador para los ensayos de PCR, que fue un decámero aleatorio con una T_m de alineamiento baja (32 °C) y que por lo tanto puede producir alineamientos inespecíficos.

Este resultado se presenta en la Figura 4 en la que se compara la nueva secuenciación con la secuencia que se había obtenido previamente, en donde se indican los sitios de variación en la secuencia, los que fueron solamente sitios de ausencia o presencia de nucleótidos, en comparación con la secuencia anterior. Así mismo se muestra la secuencia completa del decámero aleatorio utilizado como cebador.

Se determinó una secuencia de 682 pb, que presenta una variación muy pequeña con respecto a la secuencia inicial (11/682, 1.61 %), y aunque se corrigieron estas omisiones y adiciones encontradas en la secuencia original, la secuencia permanecía sin presentar marcos de lectura claros y definidos.

Por el interés que despertó este ADNc, con respecto a los datos de expresión e identidad o similitud con los bancos de secuencias, se dedicó una buena parte del tiempo experimental en aislar el ADNc completo de una biblioteca de ADNc de maíz.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
AA9O	--CTTGCGGAACTAC	CAATAAAACTGTTAA	GGTACCAAGGAACTT	CACTCTTAAGACTCC	AGGCC-TGGGTACAC	ATGTGGGCGTGCCAT							87
AA9N	<u>GTCTTGCGGAACTAC</u>	CAATAAAACTGTTAA	GGTACCAAGGAACTT	CACTCTTAAGACTCC	AGGCC <u>TGGGTACAC</u>	ATGTGGGCGTGCCAT							90
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
AA9O	TGTTGGCAGGCCTAC	GAAGTTTTTCACCGC	GGACGGGCGCAGGGC	AACCCAAGCTCTAAT	GACATGGAATGTGAC	CTGCACATATTTCCA							177
AA9N	TGTTGGCAGGCCTAC	GAAGTTTTTCACCGC	GGACGGGCGCAGGGC	AACCCAAGCTCTAAT	GACATGGAATGTGAC	CTGCACATATTTCCA							180
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
AA9O	ATTTCTTGCTT GCAA	GAAGGCTCCATCCTG	CTGTGTATCTCTCTC	ATCGTTTTATAATGA	CACAATTGTGAAGT	CCCAACATGCTCATG							267
AA9N	ATTTCTTGCTC-- A	GAAGGCTCCATCCTG	CTGTGTATCTCTCTC	ATCGTTTTATAATGA	CACAATTGTGAAGT	CCCAACATGCTCATG							267
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
AA9O	TGGCTGCCAGAACCC	AAGTGGGTCAAAGT	TGTGAATGAGGATTC	ACCTAATCTACAAGC	TGCAATTGACGGTCC	TGGCAAATGGACTGG							357
AA9N	TGGCTGCCAGAACCC	AAGTGGGTCAAAGT	TGTGAATGAGGATTC	ACCTAATCTACAAGC	TGCAATTGACGGTCC	TGGCAAATGGACTGG							357
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
AA9O	TCAGCCC CTTGTACA	ATGCACTTCCCACAT	GTGCCCGATAAGAAT	CCACTGGCATGTGAA	GCTCAACTACAAGGA	TTACTGGAGAGTGAA							447
AA9N	TCAGCCC-TTGTACA	ATGCACTTCCCACAT	GTGCCCGATAAGAAT	CCACTGGCATGTGAA	GCTCAACTACAAGGA	TTACTGGAGAGTGAA							446
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
AA9O	AATCACTATCACAAA	CTTCAACTTCCGCAT	GAATTA-ACGCAGTG	GAACCTTAGTAGCTCA	GCATCCAAACTTTGA	TATATCACTCAGGTT							536
AA9N	AATCACTATCACAAA	CTTCAACTTCCGCAT	GAATTA C ACGCAGTG	GAACCTTAGTAGCTCA	GCATCCAAACTTTAT	AATATCACTCAG-TT							535
	541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630	
AA9O	GTTTCAGCTTCAACTA	CAAACCACTTACTCC	ATATGGTGGTGGCAT	AAATGATACGGCAAT	GTTCTGGGGTGTA	ATTCTACAATGATCT							626
AA9N	GTTTCAGCTTCAACTA	CAAACCACTTACTCC	ATATGGTGGTGGCAT	AAATGATACGGCAAT	GTTCTGGGGTGTA	ATTCTACAATGATCT							625
	631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720	
AA9O	GCTGATGCAAGCCGG	CAAACCTTGGGAATGT	GCAATCAGAGCAGCT	TCTCCGCAAG--									
AA9N	GCTGATGCAAGCCGG	CAAACCTTGGGAATGT	GCAATCAGAGCTGCT	<u>TCTCCGCAAGAC</u>									

Figura 4. Comparación entre AA9 previa (O) y AA9 vuelta a secuenciar (N), bases diferentes en la secuencia comparada (negritas), bases ausentes en la secuencia comparada (negritas subrayadas). oligonucleótido utilizado para amplificar el ADNc (5'-GTCTTGCCA-3'), (negritas itálicas).

BÚSQUEDA DE UN ADNc COMPLETO PARA AA9.

Primer Intento

Para la búsqueda del ADNc completo de AA9, se contaba con un escrutinio parcial de una biblioteca de ADNc creada a partir de raíz y tallo de plántulas de maíz de 2 semanas de germinación (Cruz-García, 1997), del cual se pudo obtener algunas clonas de ADNc purificadas hasta un cuarto escrutinio. Por lo tanto, se intento sub-clonar el inserto de ADNc contenido en estas clonas del banco de ADNc de bacteriófago λ_{gt11} en un plásmido.

Se aisló ADN de una de las clonas obtenidas del escrutinio, nombrada como No. 1, y se cortó con *Eco* RI para liberar al inserto ya que el banco fue creado con estos sitios flanqueantes a la secuencia insertada, pero el patrón de corte que produjo la enzima en el ADN fue de varios fragmentos, que daban una hibridación múltiple, como se aprecia en la Figura 5A. Se intentó probar hibridando ADN de otras clonas (4 y 7) suponiendo que solo fuera la primera clona la que ofreciera el múltiple bandeo, pero se obtuvo un resultado similar en cuanto a la hibridación múltiple (Figura 5B).

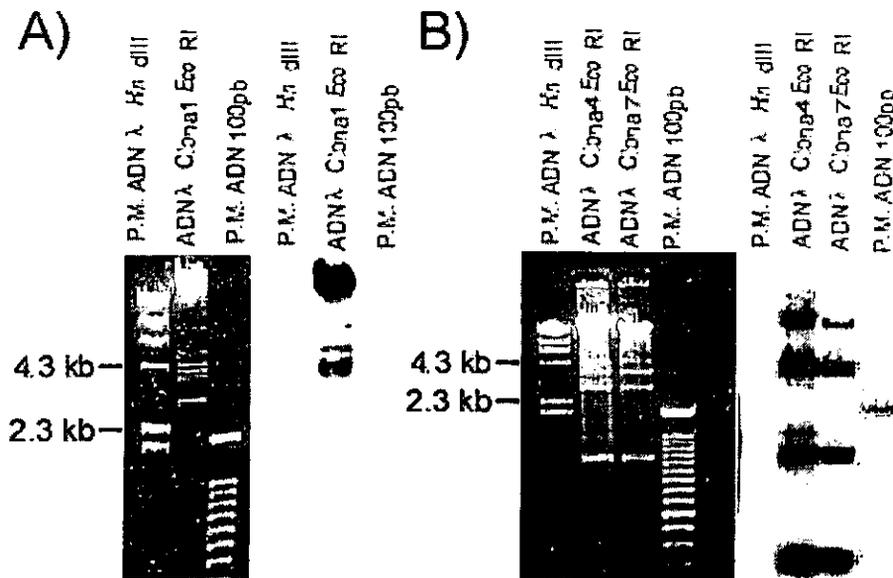


Figura 5. Geles de Agarosa y Southern blots respectivos con sonda AA9. A) ADN de bacteriófago λ extraído de la clona 1 cortado con *Eco* RI. Hibridación con AA9; B) ADN de bacteriófago λ extraído de las clonas 4 y 7 cortado con *Eco* RI. Hibridación con AA9.

Para intentar explicar estos resultados, se planteó que el múltiple bandeo podría deberse a que la enzima *Eco* RI estuviera presentando una relajación de la especificidad o actividad “estrella” (Nasri, M. y Thomas, D., 1986; 1987), llamada así porque al variar las condiciones de corte de enzimas de restricción *in vitro* (pH alto, baja fuerza iónica, alta concentración de glicerol, tiempo de incubación prolongado, alta concentración de enzima, baja concentración de sustrato, cambio del Mg^{2+} por Mn^{2+} ó Co^{2+}), esta enzima puede cortar en sitios para los cuales no es específica. Coincidiendo con este dato, se utilizaba una concentración de enzima bastante alta (5.0-7.5 U/ μ g ADN), siendo que las pruebas de control de la enzima referida indicaban que con 1 U era suficiente para digerir 1 μ g de ADN del bacteriófago . Debido a esto se realizaron ensayos de dilución de la enzima, utilizando menos sustrato para poder dilucidar si esta pudiese ser la causa del múltiple bandeo.

Los resultados de la cinética ensayada con la clona No. 1 se muestra en la Figura 6.

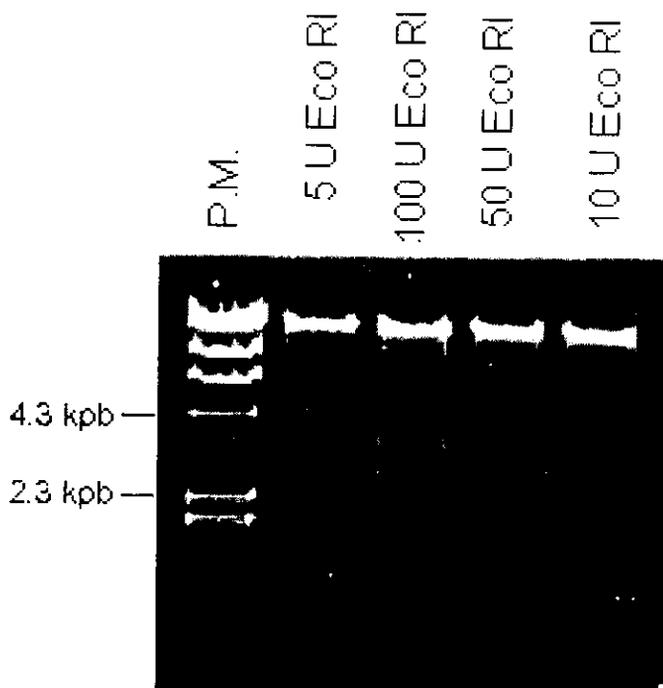


Figura 6. Gel de Agarosa teñido con EtBr. Cinética básica de ensayos de restricción con *Eco* RI de ADN del bacteriófago λ_{g111} , extraído de la clona 1.

Como es de apreciarse, no se evidencia una actividad como la antes mencionada, a estas concentraciones de enzima, de ADN y de sales, ya que solamente se observa el corte de la enzima en 100 y en 50 U, lo que produce el mismo patrón múltiple de corte que se observa en la Figura 5.

Un intento más de confirmación fue el realizar ensayos de PCR con los cebadores para el ADN del bacteriófago λ_{gt11} (λ_{gt11} FORWARD y λ_{gt11} REVERSE) para amplificar el inserto que estuviese contenido en el ADN fágico, con las condiciones descritas en materiales y métodos. No se obtuvo ninguna amplificación detectable, aún modificando concentraciones de molde de ADN, cebadores, oligonucleótidos y del catión magnesio. Como en los ensayos de PCR puede existir mucha variación si no se tiene estandarizado el método, se concluyó hasta este momento, que podría haber alguna sustancia en el ADN eluido de los lisados de bacteriófagos o en el ADN aislado con el sistema de purificación de ADN, que afectara la reacción de polimerización.

Al no poder aislar un solo fragmento de los ensayos de restricción y especulando posibles errores metodológicos causantes de este múltiple bandeo, pero que producían hibridación, se optó por utilizar toda la mezcla de fragmentos para una reacción de ligación en un vector plasmídico, suponiendo que el plásmido no aceptaría al ADN completo del bacteriófago como inserto, ni otro tipo de inserto que no fuera el que tuviera los sitios flanqueantes para *Eco* RI.

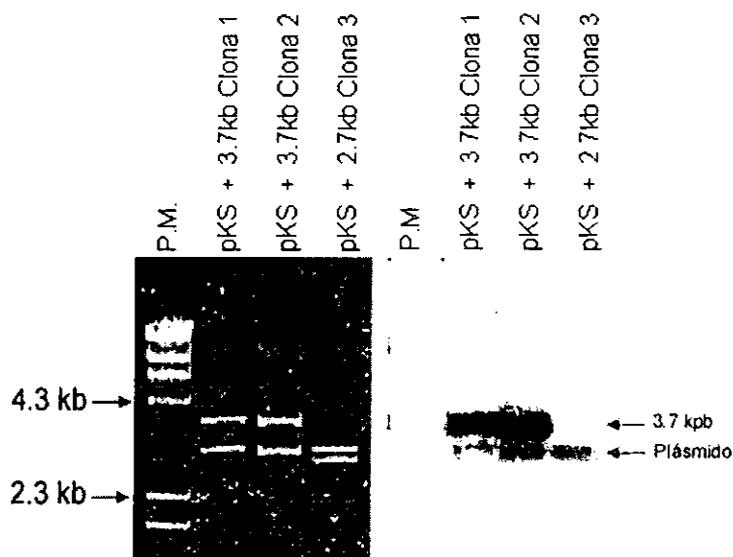


Figura 7. Gel de agarosa y Southern blot de ADN de plásmido pBluescript KS + digerido con *Eco* RI de las clonas 1, 2 y 3.

Como se aprecia en la Figura 7, se obtuvieron 3 clonas al realizar esta reacción de ligación: 2 con un fragmento de ADN clonado de aproximadamente 3.7 kb, que produjo alta hibridación con la sonda marcada y una tercera que posee inserto pero no presenta hibridación apreciable. El plásmido en el cual se clonaron los fragmentos (pBluescript KS +, 2.961 kb) presentó una hibridación bastante marcada en las tres clonas, pero este comportamiento se había observado previamente (Cruz-García, 1997) en la hibridación de la sonda, AA9, con el plásmido. Como una posible explicación de esta hibridación con el vector se plantea que al momento de purificar la sonda para ser marcada, se pueden incluir fragmentos plasmídicos del vector donde está incluida la sonda, los cuales formarán una mezcla junto con la sonda AA9. Es de apreciarse que no produce hibridación alguna a estas condiciones con los polinucleótidos incluidos como marcadores de tamaño molecular, que son los fragmentos de restricción del ADN del bacteriófago lambda.

Con estos resultados, se trabajó directamente con la subclonación 1, por ser la de mayor hibridación apreciable con la sonda y menor con el vector, secuenciando desde los extremos del plásmido para intentar conocer la ubicación de la secuencia de la sonda utilizada (AA9) en la secuencia obtenida.

Se realizó una corrida de secuenciación desde cada extremo del sitio de clonación, con cebadores universales para M13 (M13 (-40) FORWARD y M13 REVERSE), cuya secuencia esta incluida en los extremos del sitio de ligación del inserto del vector λ_{gt11} .

Por el extremo del cebador M13 (-40) FORWARD no se obtuvo similitud alguna con la sonda utilizada (ADNc AA9 de 682 pb) en la primera corrida de secuenciación (> 400 pb); sin embargo, al comparar la secuencia con los bancos de datos se determinó la presencia de una secuencia conservada en varias especies, que codifica para la secuencia de ARN pequeño nuclear, snU2, de maduración de ARNm.

Por el otro extremo, utilizando el cebador M13 REVERSE, la secuencia obtenida de 410 pb si presentó alta similitud, pero solamente desde la mitad de la sonda AA9 (Figura 8). Se pensó que posiblemente alguna o algunas sitios de corte de la enzima *Eco* RI se perdían como consecuencia de las amplificaciones de PCR propias del ensayo de "mRNA-Differential-Display", por lo que el ADNc obtenido, en este caso AA9, no tenía esas secuencias. Con base en que cualquier ADNc obtenido del

banco de ADNc es la secuencia de doble cadena de perfecta complementariedad al transcrito al que pertenece, las secuencias de corte se deberían encontrar en este ADNc, explicando de esta forma el corte múltiple de la enzima *Eco* RI (Figura 5 y Figura 6). Este razonamiento puede ser viable, ya que la forma de creación del banco de ADNc no impide la presentación de secuencias internas de corte en el inserto de ADNc incluido en el vector, al incluir los sitios de corte para *Eco* RI y *Not* I adyacentes sin necesidad de emplear la enzima de restricción, llamados.

Con este razonamiento, se secuenció directamente del ADN del bacteriófago para obtener el fragmento faltante, diseñando y sintetizando un cebador llamado JV02 cercano al inicio de la secuencia obtenida a partir del cebador M13 REVERSE, pero en sentido contrario para conocer la secuencia hacia 5' del cebador, obteniendo con una corrida de secuenciación 177 bases; y otro llamado JV01, que continúa la secuencia obtenida a partir del cebador M13 (-40) FORWARD, completando 410 bases en la corrida de secuenciación. Los resultados se muestran en la Figura 8, donde se concatenan las secuencias obtenidas desde un extremo del vector en la clona plasmídica y la extensión hacia 5' de esa misma secuencia. Se indica la similitud encontrada con la sonda utilizada (segmentos 1, 2 y 3), la secuencia de corte para *Eco* RI y los sitios de alineamiento de los cebadores JV01 y JV02. Es de resaltar que las identidades con la sonda AA9 son muy altas, en especial la del segmento 2, que presenta un error esperado mínimo y que, además, los segmentos que alinean con secuencias intermedias en la secuencia obtenida, son adyacentes en la secuencia de la sonda AA9, como se indica en la misma figura.

Esto hizo pensar que se trataba de una clona genómica, lo cual se analiza con detalle en la discusión. Como resultado complementario se comparó la restricción producida por este fragmento con una clona genómica previamente aislada (Jaimes, 1999) y se observó prácticamente el mismo patrón de restricción (no se muestra).

```

AATTTCTTGTAGAAGATCATCTGTGGATTTTAATGTTAATAATGACACAAATTGTGAATGCCACACATGCTCATGTGGTCCGAAACCAAGTGGTCAACTGTGGAAGT
[-----SEGMENTO 1-----]
GAGTTGATCTGCCCTTTTCTCTTAATTCATGTCCTATTAGGGTCTTATTTTATCTAAAGTTTTTAATAATGAAATTCATTTGCAATTTGCAAGGATTCACCTAATCTAC
EcoRI [-----]
AAGCTGCAATGTGATGGTCCCTGGCAAATGGACTGGTCACCCCTTGTTACAATGCACCTTCCCACATGTGCCCGAATGAAATCCACTGGCATGTPAAGCTCAACTACAAGGATT
-----SEGMENTO 2-----
ACTGGAGAGTAAATCACTATCAAACTTCAACTCCGCATGAATTACAGCAGTAGGAACTTAGACTGAGCATGCCAAACTTTGATAATATCACTCAGTTGTTCCAGC
-----]
TTCAACTACAACCACCTTACTCCATATGGTGGTGCCATAAGTAACTTGGCCATTCCTTATAGAAAAGAACAAAATAAAGCAAACCTTACCCTCGATGTAATTTGTT
TGTCCCCATTTTCAGATGATACGGCAATGTTCTGGG3TGTAAAA
[---SEGMENTO 3---]

```

Segmentos entre Corchetes: Identidad alta con la sonda utilizada (AA9) del nucleótido 228 al 611, 43% de la secuencia total.

SEGMENTO 1. 228-303 de AA9 de 682 pb, 73 nts idénticos de 76 nts comparados (96% de Identidad), Error esperado = 1×10^{-21} .

SEGMENTO 2. 304-582 de AA9 de 682 pb, 276 nts idénticos de 281 nts comparados (98% de Identidad), Error esperado = 1×10^{-134} .

SEGMENTO 3. 583-611 de AA9 de 682 pb, 29 nts idénticos de 29 nts comparados (100% de Identidad), Error esperado = 4×10^{-6} .

Error esperado e identidad se calcularon con BLASTN el cual se explica en el texto de análisis de resultados.

Secuencia en *Itálica*: ADN secuenciado directamente del ADN de la clona del bacteriófago λ_{gr11} . (177 pb)

Secuencia en Letras Normales: ADN secuenciado de la Clona 1. (410 pb)

Secuencia Subrayada, complementaria al oligonucleótido, JV02.

Secuencia Doblesubrayada, oligonucleótido, JV01.

Figura 8. Secuencia parcial del ADNc AA9 3,7 kb tomado de escrutinios previos del banco de ADNcs (Cruz-García, 1997) e identidad con el ADNc AA9 de 682 pb.

Aislamiento de clonas de ADNc para AA9

Debido a la incertidumbre de los resultados anteriores, se optó por la realización de un nuevo escrutinio del banco original de ADNc, utilizando una alta astringencia en las hibridaciones y llevando el escrutinio hasta un cuarto paso, como se muestra en la Figura 9 con una de las 8 clonas obtenidas del cuarto escrutinio de bacteriófagos del banco de ADNc, que dieron hibridación para la sonda AA9.

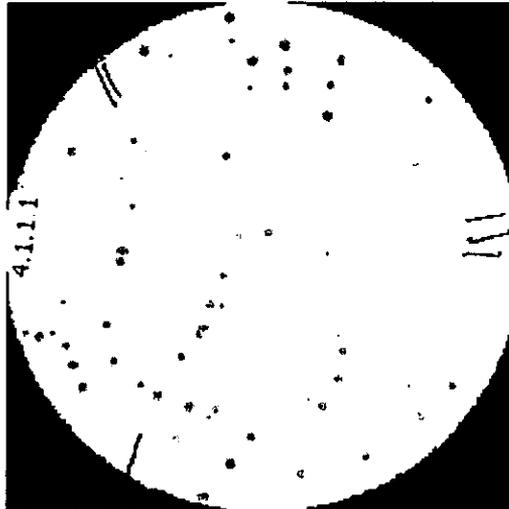


Figura 9. Hibridación en placa del cuarto escrutinio a la biblioteca de ADNc, utilizando como sonda el ADNc AA9 de 682pb.

Como se aprecia, las placas de lisis que muestran hibridación son fuertes y bastante bien definidas, además se presentó la hibridación de todas las placas de lisis observadas en la caja petri, lo cual indica que la clona esta prácticamente aislada en su totalidad de las otras clonas de bacteriófago.

Para asegurar que fuese el vector correcto del banco de ADNc (λ_{gt11}), se realizaron ensayos de PCR para amplificar el inserto contenido en las clonas aisladas, utilizando los cebadores para los sitios adyacentes al sitio de clonación de λ_{gt11} (λ_{gt11} FORWARD y λ_{gt11} REVERSE), con las mismas condiciones que se habían trabajado previamente. Como se observa en la Figura 10, la amplificación del ADN de cuatro de las clonas aisladas, partiendo de la elución de las cajas, es específica ya que no se amplifican múltiples fragmentos de ADN, utilizando condiciones de baja astringencia (indicadas en materiales y métodos) y en algunas solo se amplifica un fragmento de ADN.

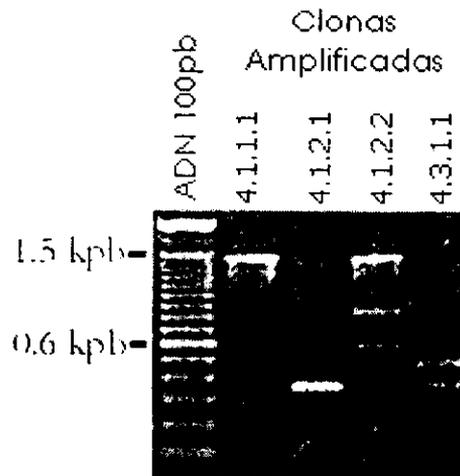


Figura 10. Gel de agarosa de los productos de PCR con ADN de las clonas de bacteriófago λ 4.1.1.1, 4.1.2.1, 4.1.2.2 y 4.3.1.1 del banco de ADNc, utilizando los cebadores específicos de los extremos del ADN del bacteriófago λ_{gr11} .

Los insertos de las clonas 4.1.1.1 y 4.1.2.2 de aproximadamente 1.4 kpb, fueron sometidos a reacciones de ligación en un vector plasmídico para su secuenciación, ya que son los fragmentos de mayor tamaño. Para este fin, se utilizaron los sitios de restricción para *Eco* RI adyacentes a la secuencia y un vector plasmídico (pCRII, 4.3 kb) que contiene un sitio de restricción para esta enzima. Una vez que se obtuvieron clonas, se determinó una hibridación positiva con la sonda AA9 de 682 pb de casi todos los insertos clonados en el plásmido, de los cuales se eligió el que ofrece la mayor hibridación (Figura 11, Carril 5).

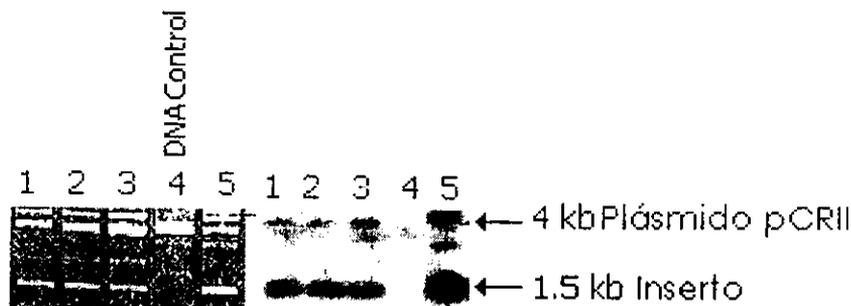


Figura 11. Gel de agarosa e hibridación en Southern blot de la clonación del fragmento de 1.5 kpb en pCR II.

Una vez confirmada la hibridación positiva de dicho inserto se procedió a su secuenciación, que fue realizada en un principio manualmente hasta una tercera parte (500 pb de cada lado), partiendo de los extremos del vector que también tiene las secuencias de los cebadores universales para M13. Para terminar de secuenciar el inserto, se diseñaron oligonucleótidos correspondientes a los extremos 5' y 3' respectivamente de cada una de las secuencias obtenidas anteriormente y se envió al Instituto de Biotecnología en Cuernavaca, Mor. para su secuenciación de modo automático. Con esto se completó la secuencia empatando los extremos que se encuentran al obtener las dos corridas de secuenciación, como se aprecia en el diagrama de la Figura 12.

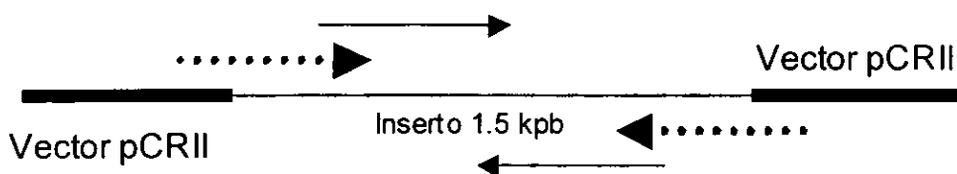


Figura 12. Diagrama de la secuenciación del inserto de 1.5 kpb. (←) Secuencia obtenida manualmente; (→) Secuencia obtenida con secuenciador automático.

En la Figura 13 se observa la secuencia completa de 1407 pb correspondiente al inserto obtenido de la clona confirmada, sin incluir los sitios de ligación para *Eco* RI y los sitios adyacentes para *Not* I, que son los que incluye el banco de ADNc para su construcción en vectores fágicos.

Esta secuencia fue dada de alta en el mes de enero del año 2000, en el banco de datos Genbank y se le asignó el número de acceso AF160475, con el cual se puede tener disposición inmediata de la secuencia vía Internet.

Con el fin de determinar su identidad y/o función, se realizaron nuevas comparaciones contra las bases de datos de secuencias utilizando el programa BLAST, pero solamente produjo identidades con el banco EST en secuencias de ADNc de ARNm de hoja de maíz (Números de acceso: AI622816.1, AI622817.1, AI612209.1, AI622496.1, AI622445.1), de arroz (Números de acceso: C74834, C91883, AU032723, C74014) y algodón (Números de acceso: AI730765.1, AI727702.1), que a la fecha no tienen función asignada.

5'- 1 tggaggttat atggtca**ATG** gttgggctc agaccactga acagggagac tgctcaaaag tcaaagacag cccaccccat tgctgcaaga aagatccaac
101 aattgtcgat ttacttccag gcactccata caacatgcaa attgccaatl gctgcaaggc aggagttgta aataccitla accagagccc agcaaatgct
201 gcttccctcct tccagatcag tgttggtctt gctggaacta ccaataaac tgttaaggtg cccaggaact tcactctta gacttccaggc cctggytaca
301 catgtyggcg tyccattgtt ggcaggccta cgaagttttt cacccggagac ggggcagagg caacccaagc tctaatgaca tggaaatgta cctgcacata
401 ttcccaattt cttgtctaga agactccatc ctgctgtgta tctctabca cgtttataa tgaacacaatl gtgaactgcc caacatgctc atgtgctgc
501 cagaaaccaca gtgggtcaaa ctgtgtagat gaggattcac ctaatctaca agctgcaatl gatggccctg gcaaatggac tggtcagccc ctgttacaat
601 gcacttccca catgtgcccg ataagaatcc actgscatgt gaagctcaac tacaaggat actggagagt gaaaatcact atcaacaact tcaacttccg
701 catgaaattac acgcagtyga acttaagtagc ccagcatacca aactttgata atatacactca gttgttcagc ttcaactaca aaccaacttac ttcatatggt
801 ggtggcattaa atgatacggc aatgttctgg ggtgtlaaat tctacaatga tctgtgatg caagccgggca aacttggyaa tgtgcaatca gagctgcttc
901 tccgcaagga ctccccgact ttcaacttcg aaaaagggatg ggccctccca cgccggagtt acttcaatgg tgataattgt gtcatgccc ctccctgaaaa
1001 ttatccatgg ctggccgaatg caagccctct aacaaaaacca ttggcactcc cattacttgg tatctgggc ctggctgct ctgtttggct atgcatgatt
1101 agtgggatca agagqtltca agttgatgtc agattccatg aggtgcactg caacaagtca ttgtttcatl caatlocatg gttgcacaga aaagatgagc
1201 gatgccaca aaaagtcgat atgtctatgt gtttaa**gTA** Aagggccaana atgtattct tgtttggtat ataaacagccc tacaaacact tggtgaact
1301 agttactgca gattagttaa ttacagttgc accttttgta tttatagca aacccagaat tttcatlgg attctacgac tgcccctctt gtagtaaaaa
1401 aaaaaaa -3'

Negritas Minúsculas: Secuencia de identidad con al ADNc AA9 de 682 pb (98.9%), Identidad = 666/675 (98.6%), Saltos = 2/675 (0.3%), Error Esperado = 0.0.

Figura 13. ADNc AA9 de 1407 pb (No de acceso: AF160475), ATG, TAA = codones de "Inicio" y "Alto", respectivamente, doble subrayado: Señal de Poliadenilación de

11 nucleótidos (Método Hamming-Clustering), subrayado normal: secuencia codificante para la proteína teórica..

Proteína teórica

Considerando el codón de inicio señalado en la Figura 13 (ATG en negritas) como el codón de inicio de la traducción del marco de lectura abierto, la traducción teórica nos da una proteína con un punto isoelectrico de 8.99, un tamaño de 407 aminoácidos y un peso molecular de 45419.1 Da; estos datos fueron obtenidos con el programa ProtParm en la página de hipertexto de Proteomics Tools (Figura 14).

NH₃-

```

1 mvgagtteqg dcskfksspp hcckkdptiv dllpgtpynm qiancckagv vntfnqdpan
61 aassfqisvg lagttnktvk vprnftlktp gpgytegrai vgrptkffta dgrratqalm
121 twnvtctysq flagktpscv vslssfyndt ivncptcscg cqnpsgsncv nedspnlqaa
181 idgpgkwtgq plvqctshmc pirihwhvkl nykdywrvki titnfnfrmn ytgwnlvagh
241 pnfdnitqlf sfnykpltpy gggindtamf wgvkfyndll mqagklgnvq selllrkdsr
301 tftfekgwaf prrvyfngdn cvmpspenyp wlpnaspltk plalpllgil glgcsvglcm
361 isgikrfqvd vrfhevchcnk sfvhsipwlh rkdercqekv dmsmcsls
-COOH
  
```

Figura 14. Traducción teórica de ADNc AA9 de 1407 pb (407 aas; No. de acceso: AAF24189 . 1)

Se calculó la composición de aminoácidos en la proteína conceptual, que se resume en la Tabla 1,

Tabla 1. Composición de aminoácidos de la proteína traducida teórica del ADNc AA9 de 1407 pb

Aminoácido	Cantidad	Porcentaje	Aminoácido	Cantidad	Porcentaje
Ala (A)	20	4.9%	Lys (K)	24	5.9%
Arg (R)	16	3.9%	Met (M)	11	2.7%
Asn (N)	30	7.4%	Phe (F)	22	5.4%
Asp (D)	17	4.2%	Pro (P)	29	7.1%
Cys (C)	22	5.4%	Ser (S)	27	6.6%
Gln (Q)	19	4.7%	Thr (T)	31	7.6%
Glu (E)	8	2.0%	Trp (W)	9	2.2%
Gly (G)	29	7.1%	Tyr (Y)	12	2.9%
His (H)	9	2.2%	Val (V)	26	6.4%
Ile (I)	16	3.9%	Leu (L)	30	7.4%
Leu (L)	30	7.4%	Lys (K)	24	5.9%

De la Tabla anterior se obtiene el numero de aminoácidos cargados positiva y negativamente.

Cargados Negativamente (Asp + Glu): 25

Cargados Positivamente (Arg + Lys): 40

El programa también calculó la vida media estimada, asumiendo que el extremo N terminal es la primera metionina, siguiendo la regla del aminoácido N-terminal, que se basa en la importancia de este extremo en la estabilidad y marcaje para la ubiquitinación de las proteínas, la cual precede a su degradación (Bachmair *et al* 1986). Las vidas medias obtenidas se enlistan en la Tabla 2

Tabla 2 Vida media teórica estimada por el extremo amino terminal.

30 horas en reticulocitos de mamífero	<i>in vitro</i>
> 20 horas en Levadura	<i>in vivo</i> .
> 10 horas en Escherichia coli	<i>in vivo</i> .

También se determinó el índice de inestabilidad por dipéptidos (Guruprasad *et al* 1990), el cual por medio de un análisis estadístico de 12 secuencias de proteínas inestables y 32 de proteínas estables, determina que la presencia de dipéptidos específicos a lo largo de la secuencia hacen significativamente inestable o no a una proteína y con los cuales se puede asignar un índice de inestabilidad probable. Los autores asignaron un valor de inestabilidad a cada uno de los 400 dipéptidos existentes, con los cuales se puede calcular el índice de inestabilidad para una proteína. Valores menores a 40, la proteína es considerada como estable y mayores como inestable. El valor del índice de inestabilidad para esta proteína conceptual es de: 31.57, lo cual clasifica a la proteína como estable (Guruprasad *et al* 1990).

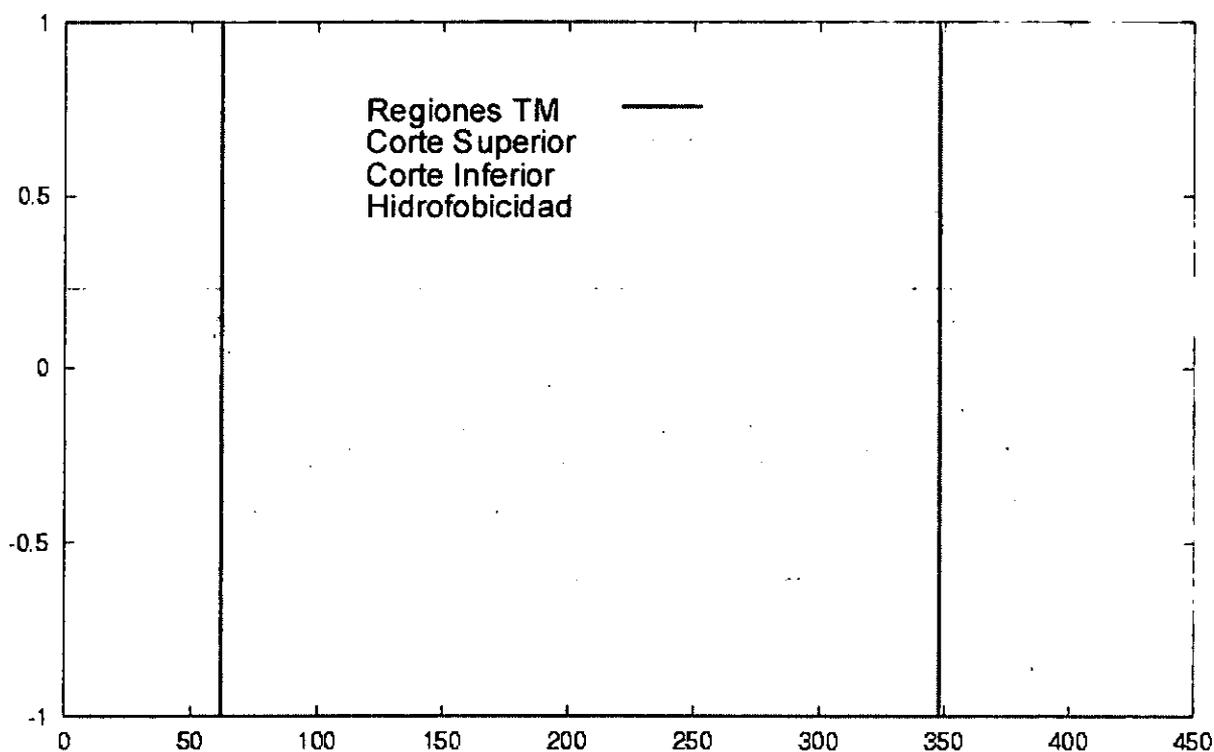
Se realizó un análisis de hidrofobicidad utilizando el programa de predicción de segmentos transmembranales TopPred 2, de la Universidad de Estocolmo. Este programa dio como resultado la existencia de 2 segmentos transmembranales putativos en la proteína predicha, como se muestra en la

Tabla 3, en la cual se indican las 2 secuencias como hélices, con el aminoácido de inicio y de fin de dicha secuencia, la puntuación asignada por el programa y la certeza de esta aseveración.

Tabla 3 Predicción de segmentos transmembranales

Hélice	Inicio	Fin	Puntuación	Certeza
1	63	83	0.667	Putativa
2	349	369	2.016	Cierta

Como complemento a estos datos, en la Figura 15 se presenta el perfil de hidrofobicidad obtenido del programa DAS, para predicción de segmentos transmembranales, el cual da idea de la hidrofobicidad de la proteína.



Wed Jan 26 20:11:31 2000

Figura 15. Diagrama de hidrofobicidad. hidrofobicidad vs aminoácidos. Regiones TM: regiones de transmembranales putativas hidrofobicidad, corte inferior: región con baja certeza de ser segmento transmembranal, corte superior: región con alta certeza de ser segmento transmembranal..

El diagrama nos indica que existen dos segmentos de alta hidrofobicidad, uno del aminoácido 63 al 83, con una probabilidad baja según el programa de ser segmento transmembranal y otro del aminoácido 349 al 369 con una alta probabilidad, según el programa, de ser un segmento transmembranal, que son asignados con las zonas de corte inferior y superior (Figura 15). En general, se aprecia que la proteína es en su mayoría hidrofílica, es decir, que probablemente sea una proteína soluble, ya que los segmentos putativamente transmembranales forman un porcentaje relativamente bajo de la proteína total y que por lo estos segmentos predichos no son significativos.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína conceptual del ADNc AA9 con otras 4 que se obtienen de una comparación con bases de datos utilizando el programa BLASTP se presenta en la Figura 16, en donde se aprecia la identidad y similitud entre las secuencias con menor error esperado (de 1×10^{-161} a 2×10^{-24}) y al final la línea de consenso entre las secuencias.

Es de recalcar que no se cuenta realmente con todas las proteínas; es decir, solamente se han predicho de genes putativos (gi | 2160169, error esperado = 1×10^{-106} , gi | 4490707, error esperado = 4×10^{-24} y gi | 2244970, error esperado = 2×10^{-27}), salvo la primera (emb | CAA07251.1, error esperado = 1×10^{-161}), que es una proteína obtenida de un ADNc de *Arabidopsis thaliana*, cuya expresión rescata por complementación a una mutante de *Schizosaccharomyces pombe* deficiente en producción de fitoquelatinas, produciendo estos péptidos *de novo* (Leuchter *et al* 1998).

EXPRESIÓN DE AA9 DURANTE LA GERMINACIÓN NORMAL Y LA GPO

Se determinó la expresión de AA9 mediante ensayos de Northern blot, utilizando para esto ARN total extraído de ejes embrionarios de semillas control sin germinar, germinadas por 6, 10, 15 y 24 horas y de ejes embrionarios de semillas OSMA, germinadas por los mismos tiempos. Para la hibridación se utilizó como sonda el ADNc completo de 1407 pb, marcado radiactivamente.

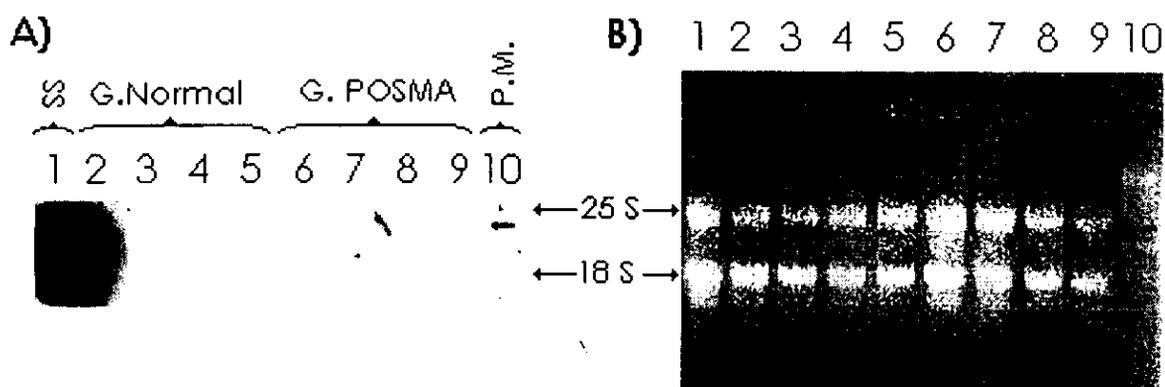


Figura 17. Ensayo de Expresión del ARNm del ADNc AA9. A) Northern blot con ARN de semilla seca (SS), de eje embrionario en germinación normal (G.Normal) de 6, 10, 15 y 24 horas (Carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente) y ARN de eje embrionario en germinación subsecuente al OSMA (G. POSMA) de 6, 10, 15 y 24 horas (Carriles 6, 7, 8 y 9 respectivamente). P.M., pesos moleculares; B) Gel de agarosa del ARN de la membrana teñido con EtBr.

La Figura 17 muestra el ensayo realizado, en donde solamente se aprecian los tiempos 10, 15 y 24 horas de los dos tratamientos debido a que existió un fuerte fondo de hibridación inespecífica en los primeros dos carriles (semilla seca y 6 horas de germinación normal). Se observa un adelanto en el aumento en la expresión del mensaje a tiempos tempranos, desde las 10 horas en germinación subsecuente al OSMA, en comparación con la germinación normal, en la que sucede hasta las 24 horas. Con esto se reafirma el comportamiento del mensaje correspondiente a este ADNc, previamente analizado (Cruz-García, 1998), en donde se determinó este adelanto en germinación acelerada por el tratamiento de OSMA, aunque hasta las 15 horas de germinación y utilizando el ADNc de 682 pb. Además, se aprecia una ligera disminución de la expresión a partir de las 15 horas que se mantiene al menos hasta las 24 horas.

DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE EPSILON Y DE AA9.

Epsilon(ϵ)

Los resultados presentados de las comparaciones de la secuencia del ADNc epsilon con un EST de maíz del banco de datos, dan indicios para suponer que el ARNm del ADNc sí proviene efectivamente de los ARNm presentes durante la embriogénesis, en semilla seca y que se ve disminuido en cantidad o en su expresión durante la germinación. La secuencia de expresión EST AI734351.1 fue identificada en tejido de mazorca, lo cual puede ser congruente con la presencia del ADNc en etapas iniciales de la germinación; en estas etapas, las proteínas de embriogénesis tardía, como son las LEA o las Rab, desaparecen rápidamente al igual que sus transcritos correspondientes (Torres-Espinosa, 1999).

Resultados previos utilizando RT-PCR (mRNA-Differential Display; Gómez-Gutiérrez, 1997), mostraron la amplificación de un segmento de 500 pb al corroborar la expresión de este ADNc; por lo que se espera que el ARNm correspondiente tenga al menos esa longitud, la que es típica de algunas proteínas de embriogénesis tardía (Torres-Espinosa, 1999).

Las dos comparaciones obtenidas fueron contra proteínas que provienen de traducciones teóricas, es decir, que solamente se dispone del ADNc para el análisis, por lo que la proteína presentada corresponde al marco de lectura más probable para la traducción y además, tal vez la secuencia de ADNc no esté completa. Es de resaltar que ambas comparaciones pertenecen al marco de lectura de -3 (ver Materiales y Métodos); es decir, que asumiendo que el ADNc provenga del ARNm de una proteína relacionada estructuralmente a las descritas, la secuencia de ADNc que se presenta aquí, 5'-3', es realmente la complementaria a la secuencia codificante que sería la secuencia del ADNc de 3'-5'. Esto se ve reforzado con la comparación del ADNc contra el ADNc de un banco de EST, en el cual se aprecia que el programa comparó la secuencia complementaria al ADNc contra la que se presenta de 5'-3'.

La búsqueda de un ADNc completo y un análisis mayor de ϵ , fueron descartados porque no se esperaba que cumpliera los objetivos grupales del aislamiento de ADNcs que pudiesen afectar positivamente el establecimiento de la germinación en maíz, además de que el banco de ADNc que se tiene es de tejidos en proliferación, principalmente, y no es de esperarse el aislamiento de ADNcs correspondientes a proteínas cuyos mensajes desaparezcan con este proceso.

AA9

La secuenciación y análisis del ADNc AA9 de 682 pb fue realizada previamente (Cruz-García, 1997) pero no se pudo determinar su marco de lectura, debido a la presencia de varios codones de alto de la traducción en todos los marcos de lectura posibles. Con la resecuenciación se pudieron corregir pocos nucleótidos, sin lograr encontrar el marco de lectura más probable del ADNc AA9. Posiblemente lo que sucedió es que con las múltiples amplificaciones inherentes a los ensayos de PCR, propias del "Differential Display", se hayan incluido u omitido nucleótidos en el amplificado final, lo cual posiblemente modificó el marco de lectura correcto.

BÚSQUEDA DEL ADNc COMPLETO DE AA9. ESCLARECIMIENTO Y ANÁLISIS.

Como se puede apreciar, el primer intento de obtener el ADNc completo de AA9 fue infructuoso. El tamaño encontrado del inserto en las clonas iniciales es de 3.7 kpb, lo cual no coincide con resultados previos de Northern blot, en los cuales se determinaba un tamaño probable del ARNm de 1.8-2.0 kb (Cruz-García, 1997, Zúñiga-Aguilar, 1998). Además, al determinar la secuencia del inserto, se encontró que las secuencias que se intercalaban entre las regiones conocidas de AA9 eran muy parecidas a intrones, dada la presencia de polinucleótidos flanqueados por dinucleótidos característicos de intrones (GT-AG; Figura 8).

Los resultados pueden discutirse de dos formas. La primera, especulando la posibilidad de que el ADNc obtenido provenga de un ARNm heteronuclear (ARNh) es decir, un ARNm inmaduro, lo cual explicaría la presencia de estos "intrones" no editados o no eliminados. No obstante es poco probable el aislamiento de ADNc correspondientes a estos ARNh de un banco de ADNc, ya que el tipo de ARN al que pertenecen es exclusivamente nuclear y es rápidamente procesado hacia ARNm maduros.

Dada la existencia de insertos de gran tamaño en las clonas originalmente aisladas, la segunda posibilidad es que, por error, se realizó el escrutinio previo a partir de un banco genómico de maíz, con el cual se cuenta, y no del banco de ADNc. Esto explicaría la ausencia de fragmentos amplificados al someter el ADN del bacteriófago a reacciones de PCR con los oligonucleótidos de λ_{gt11} (FORWARD y REVERSE), ya que el banco de ADN genómico fue hecho en λ FIX II. Además la presencia de regiones snU2 conservadas propias de regiones intrónicas, como parte de las secuencias aisladas, refuerza el hecho de que sea una secuencia genómica.

Clonación y secuenciación del ADNc de AA9

Debido a lo anterior se trabajó con un banco de ADNc, reamplificándolo según el manual (Stratagene) y los resultados de la hibridación del banco de ADNc con el ADNc AA9 se aprecian en la figura 11; en donde se observa la hibridación característica de las placas de lisis, producidas por una hibridación a alta astringencia, asegurando la eliminación de clonas contaminantes que pudieran causar errores de interpretación. De este cuarto escrutinio se aislaron bacteriófagos de placas de lisis de cada uno de los escrutinios. Para asegurar que realmente fuera el bacteriófago λ_{gt11} se amplificaron por ensayos de PCR algunas de las clonas aisladas, utilizando los cebadores específicos para este vector, como se aprecia en la misma figura. En algunas clonas se aprecia la presencia de un fragmento de amplificación de aproximadamente 1.5 kb que parece ser el de mayor tamaño entre los amplificados. Se pueden observar algunas clonas que fueron amplificadas y que no produjeron un solo tamaño de amplificado de ADN, lo que podría deberse a un alineamiento inespecífico de los cebadores, o a que algunos bacteriófagos no fueron separados completamente de otras clonas de hibridación inespecífica.

Con el fin de evitar contaminaciones en la secuenciación y asegurar completamente que se tuviera aislado un solo fragmento del ADNc de mayor tamaño, se procedió a la subclonación en un vector plasmídico, como lo es pCR II[®], verificando nuevamente la hibridación específica con la sonda utilizada a una alta astringencia.

ADNc de 1407pb (AF140275)

Se procedió a secuenciar manualmente el inserto presente en el ADN de la clona del plásmido aislado, utilizando los cebadores universales para M13 y el paquete de secuenciación por

didesoxinucleótidos radiactivos de Termosequenase®. Se utilizó la opción de incluir el didesoxinucleótido dITP en sustitución del dGTP en la mezcla de reacción, el cual permite la correcta lectura de las bandas de secuenciación en el gel, evitando los artefactos llamados BAFL (Bands Across Four Lanes), debidas a compresiones de la secuencia. Para completar la secuencia se utilizaron cebadores sintéticos diseñados para el secuenciador automático, con los cuales se terminó la secuenciación (figura 14).

Partiendo del análisis de los 6 posibles marcos de lectura de la secuencia encontrada, se determinó el marco de lectura con mayor posibilidad de ser el marco de traducción de la proteína codificada. Se aprecia el probable codón de inicio de la traducción y el codón de alto de ese marco de lectura, caracterizado por la presencia de otros codones de alto hacia la región 3'. Complementario a este análisis, se determinó que hacia la región 5' no existían codones de alto en este marco de lectura, al menos en la secuencia obtenida, por lo cual no se puede aseverar que se tiene el inicio de la transcripción del ARNm. Lo anterior concuerda con los resultados de hibridación en Northern blot, en donde se obtiene un tamaño probable del ARNm de 1.8-2.0 kb (Cruz-García, 1997; Zúñiga-Aguilar, 1998). Actualmente, se cuenta con clonas genómicas en las cuales se puede determinar la secuencia faltante, tanto para determinar un probable inicio de la transcripción, como para determinar la región promotora.

Utilizando el método de Hamming-Clustering (Milanesi *et al* 1996) se determinó la presencia de un sitio de poliadenilación consenso de 11 nucleótidos, pero que se encuentra pegado a la región de poli-A, pudiendo formar parte de ésta y no entre 11-30 nucleótidos de distancia hacia 5', como es el consenso (Lewin, 1998). Sin embargo, se puede aceptar como posible sitio de la señal de poliadenilación porque el oligo-dT utilizado para construir el banco de ADNc, pudo haberse unido a la región del sitio de poliadenilación directamente.

Se determinó la homología del ADNc AA9 de 1407 pb con el ADNc AA9 de 682 pb utilizado como sonda, lo cual se observa en la figura 14, determinando una alta identidad de nucleótidos, confirmando que se trata del mismo ADNc. De esta comparación se concluye que el ensayo de "mRNA-Differential-Display" produjo un alineamiento de los cebadores en la mitad de la secuencia del ARNm, por lo cual no se podía determinar ni un solo marco de lectura abierto ni una secuencia indicativa de la posición del ADNc aislado en el ADNc completo.

Con respecto a las comparaciones del ADNc a nivel de nucleótidos, no se puede discutir más que probablemente se encuentra representado en varias especies de plantas (Arroz, Algodón y Arabidopsis), ya que las secuencias EST no dan información sobre la probable función de las proteínas codificadas. Además, no todas estas secuencias dan un marco confiable de lectura, por lo que tampoco sirven para dilucidar el marco de lectura correcto del ADNc AA9.

En cuanto a las propiedades de la proteína teórica que codifica AA9, se puede predecir que es una proteína básica (pI de 8.99), con un tamaño de aproximadamente 40 kDa, citoplasmática por su baja hidrofobicidad y teóricamente estable.

Cabe añadir que además de los análisis presentados, también se buscaron similitudes con proteínas cristalizadas de las que se conoce su estructura terciaria, las cuales resultaron negativas. Se encontraron también sitios putativos de modificación postraducciona, con probabilidad de fosforilación por cinasas dependientes de AMPc y GMPc, por la proteína cinasa C, sitios de miristoilación, de N-glicosilación y de amidación. Pero al no conocer su estructura terciaria, no se sabe si son sitios funcionales o solamente dan el consenso para la modificación, ya que podrían no estar expuestos en la proteína funcional y no llevarse a cabo la modificación referida.

Se encontraron además, un sitio de corte para proteasas de picornavirus (Blom *et al.*, 1996) y una secuencia de un péptido señal de lipoproteínas procarióticas de membrana (Hayashi y Wu, 1990), pero no se puede inferir mucho del significado de estos hallazgos ya que ninguno se relaciona directamente con plantas.

El resultado que más indicios dio de la probable función e identidad de esta proteína, es la comparación con otras secuencias proteicas de bases de datos, ya que nos indica una identidad y similitud alta con una fitoquelatina sintetasa putativa de Arabidopsis. Los autores encuentran que al transformar una cepa de *Schizosacharomices pombe*, mutante en producción de fitoquelatinas, con el ADNc que ellos aíslan, la rescata de un medio con Cd induciendo aparentemente la acumulación de fitoquelatinas, pero sin poder demostrar la actividad enzimática de síntesis de fitoquelatinas y sin tener nuevos reportes de este gen a la fecha (Leuchter *et al.*, 1998).

Como motivo de especulación, en un razonamiento que intenta justificar la función de péptidos de este tipo durante la germinación, se podría ofrecer el siguiente razonamiento: las semillas desde la embriogénesis, como organismos en desarrollo, podrían de alguna forma estar preparados para activar

mecanismos de defensa inespecíficos, para contrarrestar la presencia de metales tóxicos divalentes, como el Cd o Cu en el medio ambiente inmediato como lo es el suelo y, por tanto, se adelantaron a eliminarlos mediante un proceso de quelación, teniendo proteínas sintetizadoras de este tipo de péptidos listas para activarse durante este proceso.

Las fitoquelatinas están clasificadas como metalotioneinas del tipo III (polipéptidos atípicos de origen no-traduccionales; Rauser, 1990) con la estructura genérica: $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-X}$, donde n puede variar de 2-11 monómeros y X puede ser: Gly (fitoquelatina), β -Ala (homofitoquelatina), Ser (hidroximetilfitoquelatina, n = 2-), Glu (iso-fitoquelatina) o ninguno (desglicin-fitoquelatina; Zenk, 1996), esta última encontrada por primera vez en maíz (citado en Zenk, 1996). Se ha determinado que el Cd es el inductor más fuerte de fitoquelatinas en muchas especies de plantas, siguiéndole el Pb y el Zn (Rauser, 1990; id. 1995; Zenk, 1996). Además, se ha visto que en raíz su expresión muchas veces es constitutiva sin depender de la inducción por Cd, aunque este la aumenta significativamente (Schafer *et al.*, 1998; Klapheck *et al.*, 1995), como las metalotioneinas del tipo I (polipéptidos con Cys cercanamente relacionadas en posición con las de la metalotioneina de equino) en raíz de maíz (citado en Robinson *et al.*, 1993).

Estos datos podrían coincidir con los demostrados previamente (Cruz-García, 1997), en donde se demuestra una expresión del ARNm del ADNc AA9 preferente en raíz, mas no en hoja o en tallo de plántula, suponiendo su función como sintetizador de fitoquelatinas; el sistema de aceleración de la germinación (BA u OSMA) induce este mensaje el cual elevaría la cantidad de fitoquelatinas presentes en la semilla.

No obstante, se ha secuenciado ya el gen para la fitoquelatina sintetasa de Arabidopsis (AtPCS1, Vetamaniuk *et al.*, 1999) y se ha visto que no posee identidad ni similitud significativa con la fitoquelatina sintetasa putativa reportada por Leuchter *et al.*, 1998 y por ende tampoco con la producida por el ADNc AA9. Por lo anterior, no se puede especular mucho más sobre este tópico.

EXPRESIÓN DE AA9 DURANTE LA GERMINACIÓN.

En el pasado se utilizó la sonda de 682 pb de AA9 para determinar en que tejidos se expresa el gen y también los tiempos de expresión durante la germinación normal y la GPO. En este experimento, la intención fue la de obtener una cinética de la estimulación de la expresión del ARNm

del ADNc AA9 pero ahora utilizando el ADNc de 1407 pb y algunos tiempos intermedios. A partir de resultados previos (Cruz-García, 1997) se había concluido que desde las 15 horas de germinación subsecuente al osmoacondicionamiento se estimulaba este mensaje, pero no se probaron tiempos intermedios como son las 10 horas. Esta cinética de expresión confirma el hecho del adelanto en la expresión de este gen, alcanzando un pico hacia las 15 horas, expresión que disminuye hacia las 24 horas. Esto último probablemente se deba a que no se necesita más el transcrito, pero lo cual no asegura que no se necesite de la proteína, para lo cual se tendría que hacer el seguimiento de la proteína codificada, mediante análisis por ensayos de Western blot.

CONCLUSIONES

El ADNc epsilon está relacionado probablemente con proteínas de embriogénesis tardía, ya que su mensaje desaparece durante la germinación.

El primer ADN aislado para encontrar el ADNc completo de AA9 realmente es una clona genómica.

El ADNc de 1407 pb es el ADNc completo del ADNc AA9 de 682 pb, con un mensaje de expresión semejante.

Los datos bioinformáticos obtenidos no ofrecen información sobre la función del producto génico al que pertenece AA9.

PERSPECTIVAS

Se cuenta ya con clonas genómicas con las que se intentará determinar tanto la secuencia del promotor como los sitios de inicio de la transcripción y de la traducción. Actualmente, se ha secuenciado una de estas clonas genómicas y se han encontrado posibles sitios promotores de la transcripción, pero no con certeza. Se obtienen 2 putativas metioninas iniciales, las cuales podrían dar el marco completo de la secuencia y las dos son reconocidas por programas de definición de marco de lectura abierto (ORF finder), pero no se puede definir el inicio con certeza.

Debido a esto se ha comenzado a secuenciar el extremo hacia 5' completo del mensaje para determinar en la secuencia genómica el inicio verdadero de la transcripción y por ende las probables secuencias promotoras. Una vez contando con estas secuencias, se puede hacer transformaciones transitorias de construcciones que incluyan la secuencia promotora y algún gen reportero (glucoronidasa, proteína verde fluorescente) y así determinar la secuencia mínima promotora para AA9, así como su expresión en diversos tejidos mediante la inducción de este promotor determinado.

A su vez, la proteína codificada por el ADNc AA9 se encuentra en proceso de sobreexpresión en bacterias, con el fin de poder obtener anticuerpos homólogos y detectar así su expresión a nivel de proteína, intentando correlacionar los datos de inducción por los dos mecanismos de aceleración de la germinación.

Una vez teniendo el anticuerpo se plantea el análisis inmunocitológico de la presencia de esta proteína durante la germinación de maíz ya sea normal o acelerada, así como en algunos otros tejidos como en raíz, determinando su ubicación en la célula y generando nueva información para conocer su probable función dentro de la célula y durante la germinación.

APÉNDICE

Direcciones de internet

Página Consultada	Nombre
http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/	WebGene
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast/blast.cgi	BLAST en NCBI
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/	Entrez, Genbank
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html	ORF finder en NCBI
http://www.unl.edu/stc-95/ResTools/cmshp.html	CMS Molecular Biology Resource
http://www.expasy.ch/tools/dna.html	Expasy Translate Tool, Prosite
http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html	Profile Scan Server
http://dodo.bioc.columbia.edu/pp/	The Predict Protein Server
http://www.williamstone.com/primers/nojavascript/	Primer Design
http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/protparam.html	Protparam

Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Tamaño (bases)	T _m (°C)*	Secuencia
JV01	24	72	5'-CGC AGT GGA ACT TAG TAC TCA GCA-3'
JV02	24	70	5'-GGT GAA TCC TCA CTG CAA AAT GCA-3'
JV03	24	68	5'-GTT TCT CTA TCA TGT TTC TCG CCT-3'
AGGPOR5-3	19	62	5'-GCT GCT TCC TCC CAG A-3'
Secuenciador-1**	20	67.4	5'-GCT GCC AGA ACC CAA GTG GG-3'
Secuenciador-2**	20	67.7	5'-GCC AAC AGA GCA GCC AAG GC-3'

λ_{gt11} FORWARD	24	71	5'-GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC CCG-3'
λ_{gt11} REVERSE	24	59	5'-TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG-3'
M13 (-40) FORWARD	23	55	5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA-3'
M13 REVERSE	17	45	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

*Calculada por el Método de Nearest Neighbor

** No se cuenta con ellos porque solo se diseñaron para el secuenciador automático.

Preparación de Amortiguadores

Amortiguador DNasa I

Se preparan previamente Tris-HCl 1 M pH=8.4, MgCl₂ 0.25 M, KCl 0.25 M y Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0. Se ajusta la concentración de las soluciones con agua destilada estéril a: 0.5 M de Tris, 0.1 M de MgCl₂, 0.5 M de KCl y 0.025 M de Na₄-EDTA, en condiciones estériles.

Amortiguador de Extracción

Se ajustan las concentraciones al volumen deseado a 100mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM Na₄-EDTA, 500mM NaCl, 10mM β -mercaptoetanol y 1.3% SDS.

TAE 50X

Se prepara previamente 0.5 M pH=8.0. Se pesan 242 g de Tris base y se miden 57.1 mL de ácido acético glacial, se agregan 100mL de 0.5 M pH=8.0 y se afora a 1 L con agua desionizada.

TBE 5X

Se prepara previamente Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0. Se pesan 54 g de Tris base y 27.5 g de ácido bórico, se les agrega 20 mL de Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0 y se afora a 1 L. Se esteriliza por autoclave.

SSC 20X

Se prepara agregando 882 g de citrato de sodio y 100 g de NaCl a 800 mL de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 1 L. Se esteriliza por autoclave.

FGRB 10X

Se preparan previamente NaOH 2 N, acetato de sodio 3 M y Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0. Se pesan 53.2 g de MOPS y se miden 26.7 mL de acetato de sodio 3 M, ajustando el pH a 7.0. Posteriormente se agregan 10 mL de Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0 y se afora con agua desionizada a 2 L. Se esteriliza por filtración. La concentración final es de 0.1 M de MOPS, 0.04 M de acetato de sodio y 0.005 M de Na₄-EDTA.

Preparación de Soluciones

Gelatina 2%

Se prepara pesando 2 g de gelatina Q.P. y aforando a 100 mL con agua bidestilada. Se esteriliza por filtración o autoclave.

Agua Libre de RNasa

Se agrega 1 mL de DEPC por cada 1 L de agua bidestilada y desionizada, se agita por toda la noche y se esteriliza 15 min a 20 p.s.i. en autoclave.

Solución de BA 1×10^{-3} M

Se disuelven 5.6 mg de BA (P.M. 225.3 g/mol) con 1 mL de NaOH 0.1 N en 5 mL de agua bidestilada y desionizada, con aforo final de 25 mL.

Solución Control para BA

Se prepara de la misma forma que la BA 10^{-3} M pero sin agregar BA.

SDS 20 %

Se pesan 20 g de SDS y se afora a 100 mL con agua desionizada calentando ligeramente. No es necesario esterilizar.

Solución Amortiguadora de Imbibición (SAI)

Se preparan previamente soluciones de cloramfenicol 10 mg/mL, sacarosa 20 %, KCl 0.25 M, MgCl₂ 0.25 mM, y Tris-HCl 1 M pH=7.5. Se prepara ajustando la concentración de las soluciones a: 0.05 M de Tris, 0.05 M de KCl, 0.01 M de MgCl₂ y 2 % de sacarosa. Se esteriliza en autoclave y una vez fría se agregan 10 µg/mL de cloramfenicol en condiciones estériles.

Acrilamida para Secuenciación (40%)

Se prepara pesando 380 g de acrilamida grado secuenciación y 20 g de N,N'-metileno-bisacrilamida, en 800 mL de agua bidestilada, se disuelven a 37 °C y se afora a 1 L con agua bidestilada. Se procede a la eliminación de impurezas a través un filtro de nitrocelulosa de 0.2-0.4 μm , no se necesita esterilidad pero es aconsejable.

Solución Amortiguadora de Lisis (SAL)

Se preparan soluciones de NaCl 3 M, Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0 y SDS 20%. Se prepara ajustando la concentración final a 0.15 M de NaCl, 0.01 M de Na₄-EDTA y 0.5% de SDS con un pH=8.0. Se prepara en el momento.

Solución de Hibridación

Se prepara en el momento. Previamente se preparan soluciones de SDS 20%, Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0, K₂HPO₄ 1 M y KH₂PO₄ 1 M. Se miden 10.5 mL de KH₂PO₄ 1 M, 10.5 mL de K₂HPO₄ 1 M, 24.5 mL de SDS 20 % y 140 μL de Na₄-EDTA 0.5 M pH=8.0, ajustando el volumen con agua bidestilada a 70 mL.

Solución I

Glucosa 50mM, 25 mM Tris-HCl y 10 mM Na₄-EDTA pH=8.0. Se prepara en el momento y se refrigera.

Solución II

0.2 N NaOH y 1 % de SDS. Se prepara en el momento y se deja a T.A..

Solución III

60 % acetato de potasio 5 M, 11.5 % de ácido acético glacial y 28.5 % de agua bidestilada/desionizada. Se prepara en el momento y se refrigera.

Preparación de Medios

Medio SM (Bacteriófagos)

Se prepara previamente solución de gelatina 2% y Tris-HCl 1 M pH=7.5. Se pesan 5.8 g de NaCl, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, y se agregan 50 mL de Tris-HCl 1 M pH=7.5 y 5 mL de gelatina 2%, en condiciones estériles, aforando a 1 L con agua desionizada. Se esteriliza por autoclave.

Medio SOB

Se prepara disolviendo 20 g de triptona o peptona de levadura, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl en 950 mL de agua desionizada, se agregan 10 mL de KCl 0.25 M y se esteriliza por autoclave. Después se adicionan en condiciones estériles 10 mL de $MgCl_2$ 1 M y 10 mL de $MgSO_4$ 1 M, esterilizados por autoclave.

Medio SOC

Se prepara disolviendo 20 g de triptona o peptona de levadura, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl en 950 mL de agua desionizada, se agregan 10 mL de KCl 0.25 M y se esteriliza por autoclave. Después se adicionan en condiciones estériles, 10 mL de glucosa 2 M y 10 mL de $MgCl_2$ 1 M, esterilizados por filtración.

Medio LB

Se disuelven 10g de triptona o peptona de levadura, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 950 mL de agua desionizada, si es medio sólido se agregan 15 g/L de agar, se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 2 N y se afora a 1 L. Se esteriliza por autoclave. Las concentraciones finales son 1.0 % de triptona o peptona, 0.5 % de extracto de levadura y 1.0 % de NaCl.

Medio de Crecimiento para Lisis (Cepa E. coli Y1090)

Se prepara de la misma forma que el medio LB, pero después de la esterilización se ajusta la concentración de soluciones para obtener concentración de 0.01 M $MgSO_4$ y maltosa a 0.2 % estériles.

Medio TB

Pipes 10 mM, $MnCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM. Se ajusta el pH a 6.7 con KOH 5 N antes de adicionar el $MnCl_2$.

Medio Agar Suave (NZYDT)

Se prepara disolviendo 10 g de triptona o peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 7 g de agarosa (B.M.) en 950 mL de agua desionizada y se afora a 1 L. Se esteriliza por autoclave.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acid Res.*, 25:3389-3402.
- Ashraf, M., Bray, C.M., (1993), DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrium* L.) seeds and evidence of repair and replication, *Seed Sci. Res.*, 3:15-23.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M., & Sánchez de Jiménez, E., (1989), DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination, *J. Plant Physiol.*, 135:461-421.
- Benchmair, A., Finley, D., Varshvsky, A., (1986), In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue, *Science*, 234:197-186.
- Bewley, J.D., (1997), Seed germination and dormancy, *Plant Cell*, 9:1055-1066.
- Bewley, J.D., Black, M., SEEDS. Physiology of development and germination, 2nd ed., Plenum Pub. Corp., New York, U.S.A., 1991.
- Bidwell, R.G.S., Fisiología Vegetal, A.G.T. Editor, México, 1979.
- Binns, A.N., (1994), Cytokinin accumulation and action: Biochemical, genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43:173-196.
- Bino, R.J., De Vries, J.N., Kraak, H.L., Van Pijlen, J.G., (1992), Flow citometric determinations of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination, *Ann. Bot.*, 69:231-236.
-

-
- Blom, N., Hansen, J., Blaas, D., Brundak, S., (1996), Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: Discovering cellular targets by neural networks, *Protein Science*, 5:2203-2216.
- Brandstatter, I., Kieber, J.J., (1998), Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in Arabidopsis, *Plant Cell*, 10:1009-1019.
- Carpin, S., Laffer, S., Schoentgen, F., Valenta, R., Chénieux, J-C., Rideau, M., Hamdi, S., (1998), Molecular characterization of a cytokinin-inducible periwinkle protein showing sequence homology with pathogenesis-related proteins and the Bet v 1 allergen family, *Plant Mol. Biol.*, 36:791-798.
- Chang, C., Stewart, R.C., (1998), The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes, *Plant Physiol.*, 117:723-731.
- Ching, T.M., Metabolism of germinating seeds, in V.2, Germination control, metabolism, and physiology. Serie Seed biology: physiological ecology series, Academic Press, Inc., U.S.A., 1972.
- Coenen C., Lomax, T.L., (1998), The diageotropica gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development of tomato, *Plant Physiol.*, 117:63-72.
- Cruz-García, F., Cambios bioquímicos y moleculares en los estados pregerminativo y germinativo en semillas de maíz, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, U.N.A.M., 1997.
- Cruz-García, F., Jiménez, L.F., Vázquez-Ramos, J.M., (1995), Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds, *Seed Sci. Res.*, 5:15-23.
-

-
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J.J., Vázquez-Ramos, J.M., (1998), Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins, *Physiol. Plant.*, 102:573-581.
- Downes, B.P., Crowell, D.N., (1998), Cytokinin regulates the expression of a soybean α -expansin gen by a post-transcriptional mechanism, *Plant Mol. Biol.*, 37:437-444.
- Estelle, M., (1998), Cytokinin action: two receptors better than one?, *Curr. Biol.*, 8:R539-R541.
- Fang, Y., Hirsch, A.M., (1998), Studying early nodulin gen ENOD40 expression and induction by nodulation factor an cytokinin in transgenic alfalfa, *Plant Physiol.*, 116:53-68.
- Gan, S., Amasino, R.M., (1996), Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play, *Bioessays*, 18:557-565.
- Gibco-BRL, Catálogo de Productos 1998-1999, México, 1998.
- Gómez-Gutiérrez, A., Modificación de la expresión génica por bencil-adenina en ejes embrionarios de maíz, determinada por Differential Display, Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, U.N.A.M., 1997.
- Gómez-Roig, E., Activación de DNA polimerasas 1 y 2 de maíz por benciladenina durante la germinación, Tesis de Licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga, Facultad de Química, U.N.A.M., 1999.
- Gonneau, M., Mornet, R., Laloue, M., (1998), A Nicotiana plumbaginifolia protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione-S-transferase, *Physiol. Plant.*, 103:114-124.
-

-
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., (1989), Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidil transpeptidase (phytochelatin synthase), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **86**:6838-6842.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., (1985), Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants, *Science*, **230**:674-676.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., (1987), Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**:439-443.
- Guex, N., Peitsch, M. C., (1997), SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling, *Electrophoresis*, **18**:2714-2723.
- Guruprasad, K., Ready, B.V.B., Pandit, M.W., (1990), Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence, *Protein Engineering*, **4**:155-161.
- Hayashi, S., Wu, H.C., (1990), Lipoproteins in bacteria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**(3):451-71.
- Houssa, C., Jacquard, A., Bernier, G., (1990), Activation of replicons origins as a possible target in shoot meristems of *Sinapis*, *Planta*, **181**:324-326.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., (1990), High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gen*, **96**:23-28
- Invitrogen, Catálogo de Productos 1995, Invitrogen Corp.
-

-
- Iwahara, M., Saito, T., Ishida, S., Takahashi, Y., Nagata, T., (1998), Isolation and characterization of a cytokinin up-regulated gen from tobacco mesophyll protoplasts, *Plant Cell Physiol.*, 39:859-864.
- Jaimes Miranda, F., Identificación de una clona genómica correspondiente a un gen germinación específico de maíz, Tesis de Licenciatura, Q.A., Facultad de Química, U.N.A.M., 1999.
- Jugenheimer, R.W., Corn. Improvement, seed production and uses, Jhon Wiley & Sons, U.S.A. 1976.
- Kakimoto, T., (1996), CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction, *Science*, 274:982-985.
- Kakimoto, T., (1998a), Genes involved in cytokinin signal transduction, *J. Plant Res.*, 111:261-265.
- Kakimoto, T., (1998b), Cytokinin signaling, *Curr. Biol.*, 1:399-403.
- Kaminek, M., (1992), Progress in cytokinin research, *TIBTech*, 10:159-164.
- Karlin, S., Altschul, S.F., (1990), Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2264-2268.
- Karlin, S., Altschul, S.F., (1993), Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877.
- Klapheck, S., Schlunz, S., Bergmann, L., (1995), Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L., *Plant Physiol.*, 107:515-521.
- Kulaeva, O.N., Zagranichnaya, T.K., Brovko, F.A., Karavaiko, N.N., Selivankina, S.Yu., Zemylachenko, Yu.V., Hall, M., Lipkin, V.M., Boziev, Kh.M., (1998), A
-

-
- new family of cytokinin receptors from cereales, *FEBS Lett.*, 423:239-242.
- Lantieri, S., Kraak, H.L., De Vos, R.H., Bino, R.J., (1993), Deffects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annuum*), *Physiol. Plant.*, 89:4336-4440.
- Leuchter, R., Wolf, K., Zimmermann, M., (1998), Isolation of an Arabidopsis thaliana cDNA complementing a Schizosaccharomices pombe mutant which is deficient in phytochelatin synthesis (Accession No. AJ006787), (PGR98-147), *Plant Physiol.*, 117:1526.
- Liang, P., Pardee, A., (1992), Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polimerase chain reaction, *Science*, 257:967-970.
- Mayer, A.M., Poljakoff-Mayber, A., The germination of seeds, 4th ed., Pergamon Press, Inglaterra, 1984.
- Milanesi, L., Muselli, M., Arrigo, P., (1996) Hamming Clustering method for signals prediction in 5' and 3' regions of eukaryotic genes. *Comput. Applic. Biosci.*, 12:399-404.
- Moore, T.C., Biochemistry and physiology of plant hormones, 2nd ed., Springer-Verlag, U.S.A., 1989.
- Nasri, M., Thomas, D., (1986), Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease Hind III, *Nucleic Acid Res.*, 14:811-821.
- Nasri, M., Thomas, D., (1987), Alteration of the specificity of Pvu II restriction endonuclease, *Nucleic Acid Res.*, 15:7677-7687.
- Osborne, D.J., (1983), Biochemical control operating in the early hours of germination, *Can. J. Bot.*, 61:3568-3577.
-

-
- Osborne, D.J., Sharon, R., Ben-Ishai, R., (1980), Studies on DNA and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*), *Isr. J. Bot.*, 29:259-279.
- Peitsch, M. C., (1995), Protein modeling by E-mail, *Bio/Technology*, 13:658-660.
- Peitsch, M. C., (1996), ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling, *Biochem Soc. Trans.*, 24:274-279.
- Pla, M., Gomez, J., Goday, A., Pages, M., (1991), Regulation of abscisic acid-responsive gen *rab28* in maize viviparous mutants, *Mol. Gen. Genet.*, 230:394-400.
- Plakidou-Dymock, S., Dymock, D., Hooley, R., (1998), A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins, *Curr. Biol.*, 8:315-324.
- Rausser, W.E., (1990), Phytochelatin, *Annu. Rev. Biochem.*, 59:61-86.
- Rausser, W.E., (1995), Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis and function, *Plant Physiol.*, 109:1141-1149.
- Reyes, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A., Vázquez-Ramos, J.M., (1991), Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize, *Seed Sci. Res.*, 1: 113-117.
- Robinson, N.J.; Tommey, A.M., Kuske, C., Jackson, P.J., (1993), Review article. Plant metallothioneins, *Biochem J.*, 295:1-10.
- Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M., Sugiyama, T., (1998), A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize, *Plant J.*, 14:337-344.
-

LIBRARY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LOS ANGELES

-
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Vols. 1, 2 y 3; 2nd ed., CSH Laboratory Press, U.S.A., 1989.
- Sano, H., Youssefian, S., (1994), Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:2582-2586.
- Schäfer, H.J., Haag-Kerwer, A., Rausch, T., (1998), cDNA cloning and expression of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator Brassica juncea L.:evidence for Cd induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform, *Plant Mol. Biol.*, 37:8797.
- Schmülling, T., Schäfer, S., Romanov, G., (1997), Cytokinins as regulators of gen expression, *Physiol. Plant.*, 100:505-519.
- Sembdner, G., Atzorn, R., Schneider, G., (1994), Plant hormone conjugation, *Plant Mol. Biol.*, 26:1459-1481.
- Sen, S., Payne, P.J., Osborne, D.J., (1975), Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis, *Biochem. J.*, 148:381-387.
- Steeves, T.A., (1993), The evolution and biological significance of seeds, *Can. J. Bot.* 61:3550-3560.
- Subramaniam, K., Ranie, J., Srinivasa, B.R., Sinha, A.M., Mahadevan, S., (1994), Cloning and sequence of a cDNA encoding a novel hybrid proline-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*, *Gen*, 141:207-210.
-

-
- Sujatha, M., Reddy, T.P., (1998), Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.), *Plant Cell Rep.*, 17:561-566.
- Teramoto, H., Momotani, E., Takeba, G., Tsuji, H., (1994), Isolation of a cDNA clone for a cytokinin-repressed gen in excised cucumber cotyledons, *Planta*, 193:573-579.
- Teramoto, H., Momotani, E., Takeba, G., Tsuji, H., (1996), Isolation and characterization of cDNAs for cytokinin-repressed genes, *Plant Growth Reg.*, 18:59-70.
- Torres-Espinosa, A.E., Expresión de genes inducidos por cambios hídricos durante el osmoacondicionamiento de maíz, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M., 1999.
- Vázquez-Ramos, J.M., Reyes, J., (1990), Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination of maize axes, *Can J. Bot.*, 68: 2590-2594.
- Vetamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P.A., (1999), AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 96: 7110-7115.
- Vogel, J.P., Schuerman, P., Woeste, K., Brandstatter, I., Kieber, J.J., (1998a), Isolation and characterization of Arabidopsis mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin, *Genetics*, 149:417-4257.
- Vogel, J.P., Woeste, K., Theologis, A., Kieber, J.J., (1998b), Recessive and dominant mutations in the etylene biosynthetic gen ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:4766-4771.
-

-
- Walbot, V., (2000), Maize ESTs from various cDNA libraries sequenced at Stanford University, (no publicado).
- Wingler, A., Von Schaewen, A., Leegood, E.C., Lea, P.J., Quick, W.P., (1998), Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase, *Plant Physiol.*, 116:239-335.
- Yu, X., Sukumaran, S., Márton, L., (1998), Differential expression of the arabidopsis Nia1 and Nia2 genes. Cytokinin-induced nitrate reductase is correlated with increased Nia1 transcription and mRNA levels, *Plant Physiol.*, 116:1091-1096.
- Zaraín, M.H., Bernal-Lugo, I.O., Vázquez-Ramos, J.M., (1987), Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes, *Mut. Res.*, 181:103-110.
- Zenk, M.H., (1996), Heavy metal detoxification in higher plants - a review, *Gen.*, 179:21-30.
- Zúñiga-Aguilar, J.J., Efecto de citocininas a niveles transcripcional y traduccional en semillas de maíz, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, U.N.A.M., 1998.
- Zúñiga-Aguilar, J.J., López, I., Gómez, A., Vázquez-Ramos, J.M., (1995), Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination?, *Seed Sci. Res.*, 5:219-226.
-