



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**T E S I S**

**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA MIO INOSITOL 1-  
FOSFATO SINTASA DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EJES  
EMBRIONARIOS DE MAÍZ Y SU EFECTO ANTE EL ESTRÉS HÍDRICO”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JESSICA XOLALPA VILLANUEVA**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



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.

## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** IRMA OFELIA BERNAL LUGO  
**VOCAL:** LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN  
**SECRETARIO:** FRANCISCO RUÍZ TERÁN  
**1ER. SUPLENTE:** PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ  
**2° SUPLENTE:** TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

### SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

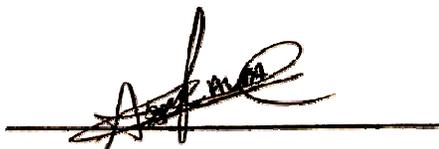
LABORATORIO 104 CONJUNTO "E", PASEO DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA, CIRCUITO INSTITUTOS. CIUDAD UNIVERSITARIA 04510, MÉXICO, D. F.

### ASESOR DEL TEMA:



*Irma Ofelia Bernal Lugo*  
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

### SUSTENTANTE:



*Jessica Xolalpa Villanueva*  
Jessica Xolalpa Villanueva

# *Dedicatorias*

*A mí amado Dios por proporcionarme la oportunidad de llegar hasta este día de mi vida y permitirme concluir mis estudios profesionales*

*A mis queridos papás Antonio Xolalpa Jiménez y Silvia Villanueva González por el inmenso amor incondicional que me han brindado durante toda la vida y por que me enseñaron a ser una buena estudiante ¡Los amo y los amaré siempre!*

*A mis hermanos Wendy y José Antonio que me apoyaron con sus palabras de aliento en aquellos momentos difíciles de la carrera*

*A Daniel Mojica por que siempre creíste y confiaste en mí a pesar de las circunstancias y nunca dejaste de apoyarme. Te amo... aα+↔*

---

# *Agradecimientos*

-A Dios porque siempre me ha guiado y me ha proporcionado a las personas más bellas que cualquier persona desearía tener en su camino. Y porque gracias a ti soy la persona que soy ahora.

Deseo expresar un profundo y sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones

-A mi asesora de tesis, la Dra. Irma Bernal, a quien admiro y respeto por su gran humildad y paciencia, por aceptarme como su alumna y compartirme sus conocimientos, por brindarme su apoyo y confianza para creer en mí cuando no me conocía. ¡Gracias Dra. y que Dios la bendiga siempre! ☺

-A la Q. Laurel Fabila Ibarra con cuya colaboración y apoyo técnico conté en todo momento.

-A mi jurado de tesis: M. Luz del Carmen Castellanos, Dr. Francisco Ruíz, Perla Maldonado y Tzvetanka Dimitrova, por su tiempo y dedicación para la revisión de esta tesis.

-A mis amigos del laboratorio: Karla Vázquez por su asesoramiento técnico, Yazmín, Lorena, Rodrigo Natalia Claudia y Ailed; por su grata compañía que hacían más placentera mi estancia y de quien he recibido su ayuda, comprensión e invaluable amistad. También a todas las personas que integran el departamento de bioquímica del edificio E de la facultad de Química, quienes me asesoraron y proporcionaron las herramientas técnicas necesarias para la realización de esta investigación.

-A cada uno de mis familiares y amigos de generación por que siempre me alentaron a seguir adelante.

-A mis profesores de la carrera que han dejado huella en mi formación académica

-A la Facultad de Química, por poner a mi disposición las instalaciones, recursos y medios necesarios para la obtención de esta tesis

-A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por abrirme sus puertas y brindarme lo necesario para mi formación como Química de Alimentos.

-A mis padres, que a sus posibilidades, me dieron estudios para ser una mejor persona y tener un mejor futuro. A mis hermanos gracias por su amor genuino y apoyo incondicional, porque se que siempre puedo contar con ustedes.

-Y especialmente a Daniel, que me ha tenido la paciencia y el amor para animarme y apoyarme en todas las formas posibles que se puede ayudar a una persona, gracias por que este logro también es tuyo

---



## Índice general

Abreviaturas .....	10
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>11</b>
Resumen.....	11
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>15</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>15</b>
∞ <i>La semilla .....</i>	<i>15</i>
∞ <i>Estructura de las semillas.....</i>	<i>15</i>
∞ <i>Germinación .....</i>	<i>17</i>
∞ <i>¿Qué es el mio-inositol? .....</i>	<i>18</i>
∞ <i>¿Cuál es la importancia del mio-inositol en las plantas? .....</i>	<i>18</i>
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>21</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>22</b>
∞ <i>Objetivo General.....</i>	<i>22</i>
∞ <i>Objetivos Específicos .....</i>	<i>22</i>
∞ <i>Diagrama experimental .....</i>	<i>23</i>
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>24</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>24</b>





---

⇒	<i>Análisis de la expresión del gen codificante de la mio inositol 1-fosfato sintasa en ejes embrionarios de maíz</i> .....	24
	Germinación de ejes embrionarios.....	24
⇒	<i>Aislamiento de RNA<sub>total</sub></i> .....	25
⇒	<i>Cuantificación del RNA<sub>total</sub> por espectrofotometría</i> .....	26
⇒	<i>Determinación de la integridad del RNA<sub>total</sub> por electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes</i> .....	26
	Preparación del gel.....	26
	Preparación de la muestra.....	27
⇒	<i>Para el aislamiento del RNA<sub>m</sub></i> .....	27
⇒	<i>RT-PCR (Síntesis de la primera cadena de cDNA, mediante la transcriptasa reversa y de la reacción en cadena de la DNA-polimerasa)</i> .....	28
	Síntesis de la primera cadena de cDNA.....	28
	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	28
⇒	<i>Hibridación tipo Northern Blot</i> .....	30
	Generación de la sonda.....	30
	Hibridación:.....	34
⇒	<i>Curva de imbibición</i> .....	36
	Acondicionamiento del material biológico.....	36
<b>Capítulo 6</b> .....		<b>38</b>
<b>Resultados</b> .....		<b>38</b>
⇒	<i>Hibridación tipo Northern Blot</i> .....	39
	Aislamiento, purificación y digestión del plásmido recombinante.....	39
	Secuenciación e identificación in silico del inserto de MIPS.....	40
	Eficiencia del marcado de la sonda.....	43
	Detección inmunológica.....	43
⇒	<i>PCR por transcripción reversa</i> .....	44
	Determinación de la integridad del RNA <sub>total</sub> para las extracciones a los diferentes tiempos de la germinación.....	44
	Determinación de la pureza del RNA <sub>total</sub> por espectrofotometría de absorción ultravioleta.....	45

---





---

Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR) .....	46
⇒ Optimización de las condiciones de extracción de RNA <sub>total</sub> de ejes sin germinar .....	49
⇒ Curva de imbibición .....	51
Germinación de semillas .....	51
⇒ Expresión de MIPS durante la germinación en estrés hídrico. ....	55
<b>Capítulo 7 .....</b>	<b>58</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 8 .....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo 9 .....</b>	<b>63</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 10 .....</b>	<b>64</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo 11 .....</b>	<b>68</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>68</b>
⇒ <i>Apéndice 1 Disoluciones y Amortiguadores.....</i>	<i>68</i>
Aislamiento de RNA <sub>total</sub> .....	68
Determinación de la integridad del RNA <sub>total</sub> por electroforesis. ....	69
Determinación de DNA en gel de agarosa al 1% por electroforesis. ....	69
Hibridación Northern Blot.....	70
⇒ <i>Apéndice 2 Gráfico de calidad.....</i>	<i>72</i>
⇒ <i>Apéndice 3 Análisis filogenético.....</i>	<i>76</i>





*Índice de ecuaciones*

Ecuación 1. Cálculo para la concentración de RNA<sub>total</sub>..... 26  
Ecuación 2. Determinación de agua absorbida. .... 36  
Ecuación 3. Determinación de humedad..... 37

*Índice de figuras*

Figura 3-1. Estructuras principales de la semilla de maíz. .... 16  
Figura 3-2. Estructuras del embrión. .... 16  
Figura 3-3. Estructuras del grano de maíz ..... 17  
Figura 3-4. Curva de imbibición de las semillas según Bewley J. D. .... 18  
Figura 3-5. Rutas biosintéticas del ácido fítico en células eucarióticas. .... 19  
Figura 3-6. Síntesis del mio inositol. .... 20  
Figura 3-7. Reacción catalizada por la mio inositol 1-fosfato sintasa. .... 20  
Figura 5-1. Transferencia tipo Northern Blot..... 33  
Figura 6-1. Análisis electroforético del plásmido recombinante. .... 39  
Figura 6-2. Determinación del peso molecular del posible transcrito de MIPS..... 39  
Figura 6-3. Características y secuencia del DNA obtenido..... 40  
Figura 6-4. Alineamiento entre el fragmento de 829 pb y la secuencia del supuesto gen de mips2..... 42  
Figura 6-5. Amplificación del transcrito de MIPS..... 42  
Figura 6-6. Eficiencia del marcado de la sonda..... 43  
Figura 6-7. Optimización de las condiciones para detectar el transcrito por Northern Blot.. .... 43  
Figura 6-8. Efecto de diversos niveles de astringencia en la detección de la señal del transcrito ..... 44  
Figura 6-9. Detección de la integridad del RNA<sub>total</sub> extraído de ejes embrionarios germinados por diferentes periodos. .... 45  
Figura 6-10. Análisis de la expresión del gen de MIPS por RT-PCR..... 46  
Figura 6-11. Exploración del número de ciclos de PCR en la detección del gen. .... 47  
Figura 6-12. Comprobación de las condiciones de PCR en la expresión de los genes: MIPS y ubiquitina. .... 47  
Figura 6-13. Condiciones modificadas para la PCR y Análisis de la expresión del gen de MIPS ..... 48  
Figura 6-14. Integridad del RNA<sub>total</sub> de ejes sin germinar. .... 49  
Figura 6-16. Expresión del gen MIPS en tres muestras independientes de ejes embrionarios sin germinar. .. 50  
Figura 6-15. Análisis de la expresión del gen MIPS en ejes sin germinar. .... 50  
Figura 6-17. Germinación de semillas en estrés a diferentes tiempos de imbibición. .... 54  
Figura 6-18. Expresión del gen MIPS durante la germinación en estrés hídrico y durante su recuperación, empleando 15 ciclos en la reacción. .... 56





---

<b>Figura 6-19. Expresión del gen MIPS durante la germinación en estrés hídrico y durante su recuperación, empleando 30 ciclos en la reacción. ....</b>	<b>57</b>
<i>Índice de gráficos</i>	
<b>Gráfica 6-1. Curva de imbibición de semillas de maíz variedad Chalqueña .....</b>	<b>51</b>
<b>Gráfica 6-2. Curvas de imbibición de las principales estructuras que constituyen a la semilla (embrión y endospermo).....</b>	<b>52</b>
<b>Gráfica 6-3. Germinación de semillas en estrés por sequía.....</b>	<b>53</b>
<b>Gráfica 6-4. Viabilidad de las semillas .....</b>	<b>55</b>
<i>Índice de tablas</i>	
<b>Tabla 2-1. Destinos de la producción de maíz en México.....</b>	<b>14</b>
<b>Tabla 5-1. Condiciones para la reacción de PCR para MIPS.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 5-2. Componentes para la reacción de PCR para MIPS.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5-3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR del fragmento de MIPS. ....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5-4. Condiciones para la reacción de PCR para ubiquitina.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5-5. Componentes para la reacción de PCR para ubiquitina.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5-6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del fragmento de ubiquitina.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 5-7. Determinación de la eficiencia de marcado.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5-8. Concentraciones de PEG para generar el estrés por sequía a diferentes presiones osmóticas.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 6-1. Resultados de la alineación múltiple del fragmento secuenciado con las secuencias de genes heterólogos de plantas. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 6-2. Pureza y concentración de los extractos de RNAtotal a diferentes tiempos de imbibición. ....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 6-3. Pureza y concentración de los extractos de RNAtotal de ejes embrionarios sin germinar obtenido por dos métodos .....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 6-4. Pureza y concentración de los extractos de RNAtotal de ejes embrionarios en condiciones de estrés hídrico.....</b>	<b>55</b>





---

*ABREVIATURAS*

cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
D.O.:	densidad óptica
DEPC:	dietilpirocarbonato
DNA:	ácido desoxirribonucleico
dNTP's:	mezcla de desoxinucleotidos fosfato
EDTA:	ácido etilén diamino tetracético
Ins:	inositol
MAE:	MOPS, ácido acético, EDTA
MIP:	mio inositol 1-fosfato
MIPS:	mio inositol 1-fosfato sintasa
MOPS:	ácido 3-morfolinopropanosulfónico
MPa:	Megapascales
N <sub>2</sub> :	Nitrógeno
NaCl:	cloruro de sodio
NaOH:	hidróxido de sodio
O/N:	toda la noche (overnight)
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la DNA polimerasa
PEG:	polietilén glicol
pH:	potencial de hidrógeno
PtdIns:	fosfatidilinositol
RNA:	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub> :	ácido ribonucleico mensajero
RNA <sub>sa</sub> :	ribonucleasa
RNA <sub>total</sub> :	ácido ribonucleico total
RT-PCR:	reacción en cadena de la DNA polimerasa por transcripción reversa
SA-PMP's:	partículas paramagnéticas de estreptavidin
SDS:	duodecilsulfato de sodio
SSC:	solución de citrato de sodio, cloruro de sodio
TA:	temperatura ambiente
TAE:	Tris-HCl, ácido acético, EDTA





# Capítulo 1

## Resumen

**E**n México, el 85% de la producción de maíz, se obtiene bajo condiciones de temporal. El establecimiento del cultivo, germinación y emergencia de la plántula, suele ser en ambientes ligeramente estresantes debido a la versatilidad del clima que hay a lo largo y ancho del país. Por lo que sería deseable, generar nuevos genotipos de maíz en los que se logre preservar y potencializar aquellas características que le permiten a la semilla germinar con rapidez y eficiencia aún en condiciones ligeramente adversas. Para lograr lo anterior se requiere de conocer los genes involucrados y su participación dentro del proceso de la germinación. En estudios previos en el laboratorio se encontraron indicios de que el gen que codifica para la enzima mio-inositol-1-fosfato sintasa (MIPS) es uno de los genes que se expresa durante la germinación. La MIPS es la enzima que regula la síntesis del inositol (Ins), este producto y sus compuestos derivados son esenciales en el metabolismo de la planta porque participa en numerosos procesos y estructuras (vías de señalización, síntesis de ácido fítico, almacenamiento y transporte de auxinas, síntesis de membrana y pared celular, producción de moléculas relacionadas con el estrés) que ayudan en el crecimiento y desarrollo del eje embrionario durante la germinación. En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis de la





expresión del gen MIPS en ejes embrionarios de maíz durante la germinación en condiciones ideales y durante su exposición al estrés hídrico.

Usando técnicas de biología molecular, análisis *in silico* y de *PCR*, el gen codificante de MIPS se identificó como uno de los genes expresados en el embrión, durante la germinación de semillas maíz. Los niveles del transcrito durante la germinación en agar de ejes embrionarios de maíz, o aislados de semillas germinadas en condiciones de estrés, fueron obtenidos por *RT-PCR*. En los primeros, la expresión del gen MIPS fue constante durante las primeras 24 h de germinación mientras que en estrés hídrico, independientemente de la intensidad del estímulo (-0.3MPa o -0.6 MPa), el nivel de expresión de este gen fue similar al de los ejes germinados en agar, para luego declinar en las siguientes 24 h; sin embargo, después de 24 h de recuperación del estrés (semillas transferidas a agua), el nivel del transcrito aumentó. Los resultados indican que la enzima en estudio es una isoenzima de MIPS, muy probablemente la “mips2”. Además sugieren que durante la germinación, MIPS es constitutivo en el eje embrionario de maíz, la abundancia de la expresión decrece 24 h después de iniciada la germinación en estrés y se incrementa cuando la planta se recupera del estrés.





## Capítulo 2

# Introducción

**D**e todos los cereales existentes, el maíz es el más importante del mundo, debido a que actualmente existe una tendencia creciente por la diversificación en el uso del maíz; ya que se puede usar para consumo humano y pecuario (especialmente para producir pollo y cerdo); también en la industria se utiliza para producir almidón, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol etc. Así como para la elaboración de bebidas alcohólicas y otros productos utilizados de materia prima en la industria minera, textil, electrónica, farmacéutica y alimentaria entre otros (FIRA, 1998).

El maíz, es uno de los cultivos más domesticados y dependientes del hombre para su existencia, debido a que no existe un mecanismo intrínseco para su dispersión y los granos son fácilmente consumidos por los animales; evidencias arqueológicas de mazorcas jóvenes indican que fue domesticado hace 5,000 o 10,000 años en la cuenca del río Balsas en el sur de México; sin embargo recientes investigaciones genéticas sugieren que fue hace aproximadamente 9,000 años cuando inició la domesticación moderna del maíz como hoy la conocemos, y fue derivada del *Zea mays spp. parviglumis* un modesto pasto silvestre comúnmente llamado Teocintle localizado entre la sierra de Oaxaca y Jalisco (Matsuoka, 2002). El teocintle, derivado del náhuatl “teocintli”

---





que significa “semilla de los dioses”, es un cultivo del grupo de especies del género *Zea* que se cosecha de manera anual o perenne y es originario de México y América central. (Vollbrecht & Sigmon, 2005).

En México, el maíz es el cultivo más importante porque ocupa el 51% de la superficie sembrada y cosechada anualmente [promedio del periodo 1996-2006; (SIAP, 2007)]. La producción de maíz blanco permite cubrir la demanda interna ya que en el año agrícola 2007 se produjeron 23.5 millones de toneladas (SIAP, 2007) sin embargo, en cuanto a maíz amarillo se refiere, se requieren de importar siete millones de toneladas por año para abastecer la demanda, ya que los principales destinos de la producción global de maíz son los mencionados por la Tabla 2-1, siendo el consumo pecuario y la industria de derivados químicos los que requieren de la importación del maíz amarillo.

**Tabla 2-1. Destinos de la producción de maíz en México.(SAGARPA, 2008).**

Destino	%
Consumo humano	59.0
Consumo pecuario	23.3
Industria de derivados químicos	10.4
Industria cerealera	2.4
Semillas	1.1

Y aunque el maíz se siembra en toda la república mexicana son solo 10 los estados en los que se concentra su producción: Sinaloa, Jalisco, México, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Veracruz, Guanajuato, Puebla y Oaxaca; en donde el 85% de la producción se obtienen bajo condiciones de temporal, con una alta dependencia de las condiciones climáticas. Con la finalidad de impulsar la productividad y la producción; así como para fortalecer el abasto de maíz y atender la demanda del sector pecuario y de la industria, se requiere de impulsar la adopción de materiales mejorados genéticamente, incluidos aquellos que son desarrollados a través de la biotecnología, para que contribuyan a mejorar la fitosanidad, productividad y competitividad de los productores de maíz de México.





## Capítulo 3

# Antecedentes

### ∞ *La semilla*

**L**a semilla es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares superiores, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la fertilización (Vázquez, 1997). Se encuentra en las plantas con flores (angiospermas, como el naranjo) y en las gimnospermas. En las angiospermas los óvulos se desarrollan dentro de un ovario; en tanto que en las gimnospermas (como los pinos), plantas que tienen las semillas al descubierto o por lo menos sin la protección de un verdadero fruto, la estructura que los contiene es muy diferente; sin embargo, la estructura de las semillas de estas plantas es básicamente similar a la de las plantas con flores (Escamilla-Martínez, 2006).

### ∞ *Estructura de las semillas*

Todas las semillas están rodeadas por una cubierta llamada testa, que posee distintas texturas y apariencias. Generalmente es dura y está formada por una capa interna y una externa





de cutícula y, una o más capas de tejido grueso que sirve de protección. Estas características le confieren a la testa cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases. Ello le permite ejercer una influencia reguladora sobre el metabolismo y crecimiento de la semilla (Figura 3-1).

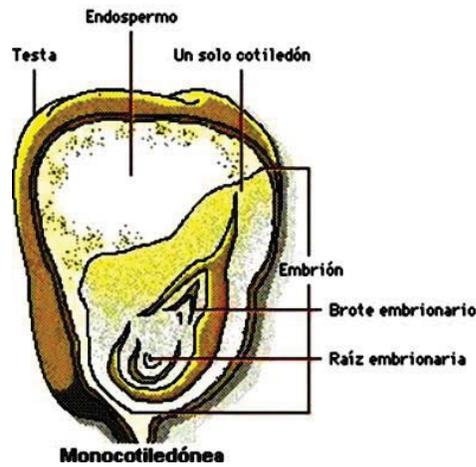


Figura 3-1. Estructuras principales de la semilla de maíz.

Las plantas angiospermas, se dividen en monocotiledóneas (que tienen un solo cotiledón, como las gramíneas) y en dicotiledóneas (que tienen dos cotiledones, como las leguminosas). Los cotiledones de la mayoría de las plantas dicotiledóneas, como el frijol, contienen las sustancias de reserva de las semillas; mientras que en algunas dicotiledóneas y en la mayoría de las monocotiledóneas (como el maíz), las sustancias de reserva están almacenadas en el endospermo. Los cotiledones en estos casos son delgados y muy delicados, funcionan como estructuras de absorción (Moreno, 1996).

El endospermo de las gramíneas y de otras especies se caracteriza por presentar una capa externa o aleurona. Tienen paredes gruesas y en su interior se desarrollan los llamados granos de aleurona. El embrión es el origen de la raíz, hojas y tallo de la nueva planta, por lo que resulta de interés entender con más detalle su funcionamiento. El embrión maduro de las plantas que tienen flores consiste en un eje parecido a un tallo (eje embrionario) en cuyo extremo están uno o dos cotiledones. Estos cotiledones frecuentemente se conocen como las hojas de las semillas o las hojas cotiledonarias, debido a que son las primeras hojas en aparecer,

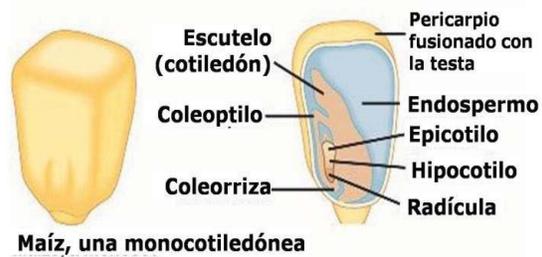


Figura 3-2. Estructuras del embrión.





aunque tienen forma y función diferentes de las hojas que aparecerán subsecuentemente durante la vida de la planta. En ambos extremos del eje embrionario hay meristemos formados por células con gran capacidad de reproducción, responsables del crecimiento (Figura 3-2).

En el embrión, el meristemo apical del tallo se localiza en la parte superior del eje embrionario, justo arriba de los cotiledones, y por eso se le conoce como epicotilo —arriba de los cotiledones—. En algunos embriones el epicotilo consta solamente del meristemo apical, mientras que en otros, presenta una o más hojas jóvenes. En este último caso, el epicotilo, junto con las hojas jóvenes, se denomina plúmula. La parte del eje embrionario entre el epicotilo y el ápice de la raíz se llama hipocotilo, por encontrarse inmediatamente abajo de los cotiledones. Finalmente, en el extremo se encuentra el ápice de la raíz o radícula (estructuras más fáciles de identificar en dicotiledóneas). En las monocotiledóneas el cotiledón único se llama escutelo. La envoltura basal del cotiledón se ha elongado para formar el coleoptilo y en algunas especies el hipocotilo se ha modificado parcialmente. La coleoriza puede considerarse como la base del hipocotilo que envuelve la radícula (Figura 3-3).

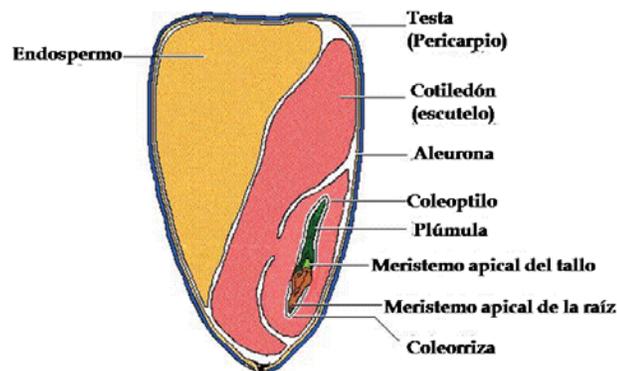


Figura 3-3. Estructuras del grano de maíz

## ∞ Germinación

La germinación comprende aquellos eventos fisiológicos (como la hidratación de la semilla, protrusión radicular y crecimiento del eje embrionario), bioquímicos (la respiración, reactivación del metabolismo, desarrollo mitocondrial y generación de energía) y finalmente eventos moleculares (síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, cambio en la expresión de genes específicos) que comienzan con el inicio de la hidratación de la semilla quiescente (semillas vivas que no presentan metabolismo debido a que las condiciones del medio no lo permiten) y termina





con la protrusión de la radícula y la elongación del eje embrionario a través de las estructuras que rodean el embrión (Martínez-Silva, 2006). Figura 3-4

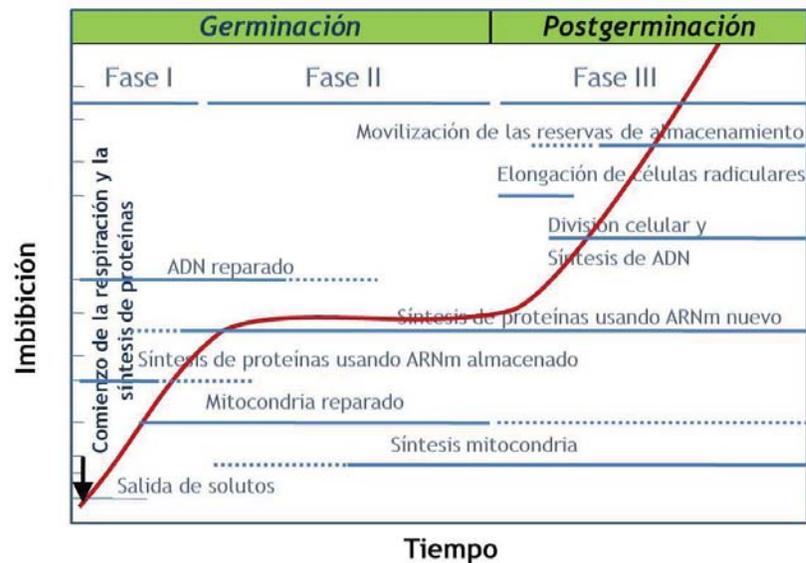


Figura 3-4. Curso del tiempo de los principales eventos asociados con la germinación y el subsecuente crecimiento postgerminativo. (Bewley J. D., 1997)

### ¿Qué es el mio-inositol?

El mio-inositol, también conocido como inositol (Ins), es un poliol (Figura 3-5) que en el caso de las semillas de maíz, se encuentra como ácido fítico (mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexacisfosfato o  $\text{InsP}_6$ ) y es el compuesto con fósforo más abundante en las semillas maduras; representa del 60 al 80% del fósforo total de la semillas. En semillas maduras de maíz (*Zea mays*), la mayoría del fósforo inorgánico (>80%) se encuentra almacenado como ácido fítico y se encuentra comúnmente en el embrión y un poco en la delgada capa de la aleurona (Raboy, 2000).

### ¿Cuál es la importancia del mio-inositol en las plantas?

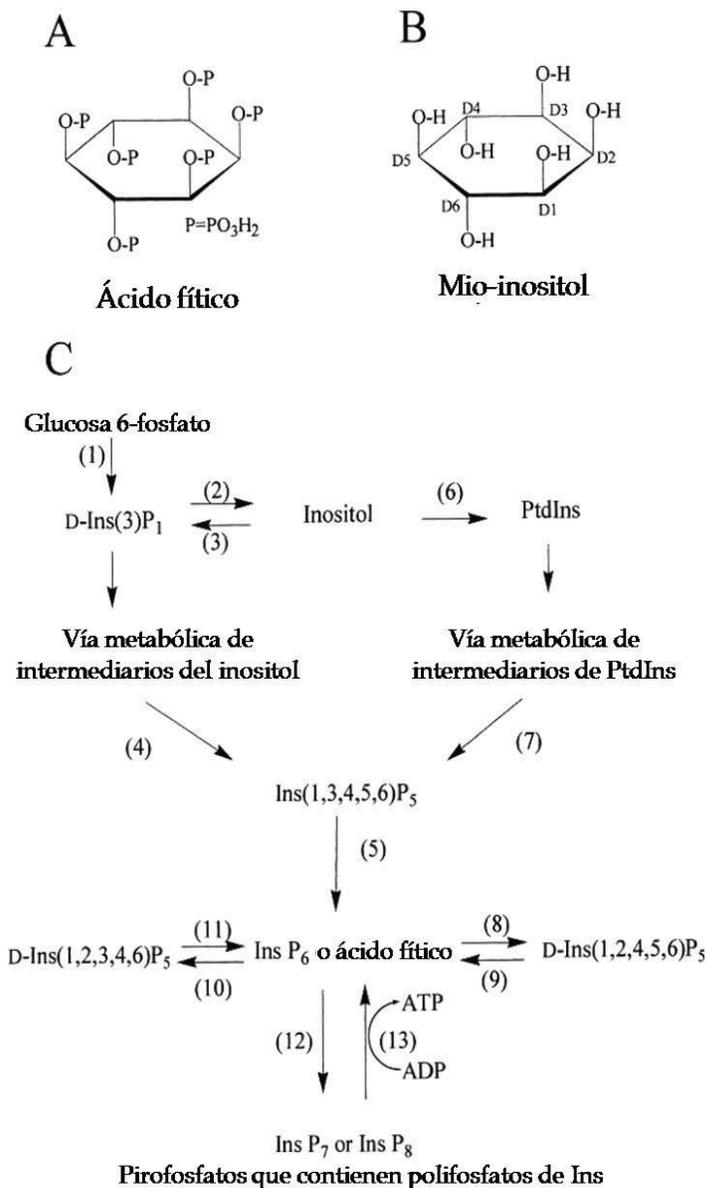
De acuerdo con Loewus & Murthy (Loewus & Murthy, 2000), el inositol desarrolla un papel importante en el metabolismo de plantas y semillas porque:

1. Participa en la biosíntesis de biopolímeros que forman la pared celular debido a la oxidación del inositol a ácido glucurónico, el cual en conjunto con las pentosas constituyen las unidades, utilizadas en la síntesis de pectina y hemicelulosa.





2. La esterificación del inositol para formar ésteres de auxinas (hormonas) y sus glicosilados que posteriormente serán almacenados y/o transportados.
3. En la biosíntesis de ácido fítico y pirofosfatos del ácido fítico (como reservas de fósforo inorgánico).
4. En el metabolismo y reciclización de los productos de la hidrólisis del ácido fítico, durante la defosforilación mediada por fitasas.
5. En la biosíntesis del fosfatidilinositol y polifosfatos, entre otros.



**Figura 3-5. Rutas biosintéticas del ácido fítico (mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexacisfosfato o Ins P<sub>6</sub>) en células eucarióticas.**

**A**, Estructura del ácido fítico. **B**, Estructura del inositol (Ins), enumerando los átomos de carbono por “D-convención” (Loewus, 2000). **C**, Rutas bioquímicas. (1) *D*-Ins3-P<sub>1</sub> (o *L*-Ins1-P<sub>1</sub>) sintasa; (2) *D*-Ins3-fosfatasa (o *L*-Ins1-fosfatasa); (3) *D*-Ins3-cinasa (o *L*-Ins1-cinasa); (4) Ins P-cinasa o poly P-cinasa; (5) Ins (1,3,4,5,6) P<sub>5</sub> -2-cinasa o ácido fítico-ADP fosfotransferasa; (6) PtdIns sintasa; (7) PtdIns y PtdIns P-cinasa, seguido de PtdIns P-fosfolipasa C específica, y Ins P-cinasa; (8) *D*-Ins (1,2,3,4,5,6) P<sub>6</sub> -3-cinasa; (10) *D*-Ins (1,2,3,4,5,6) P<sub>6</sub> -5-fosfatasa; (11) *D*-Ins (1,2,3,4,6) P<sub>5</sub> -5-cinasa; (12) pirofosfato-formando Ins P<sub>6</sub> cinasa; (13) pirofosfato-conteniendo Ins polyP-ADP fosfotransferasa (Raboy, V. 2000).





Para que el inositol sea empleado en estas múltiples funciones del metabolismo se requiere de su síntesis de novo para lo cual la célula emplea una serie de tres pasos enzimáticos como se observa en la siguiente figura, siendo el segundo de ellos, el paso limitante de la vía (Loewus & Murthy, 2000).

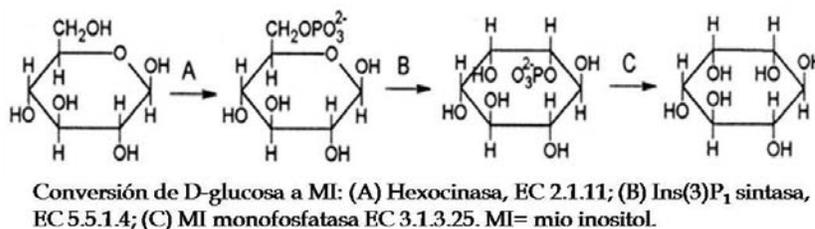


Figura 3-6. Síntesis del mio inositol.

En este paso se lleva acabo la ciclización de la D-glucosa 6-fosfato para formar 1D-myo-inositol 3-fosfato, reacción catalizada por la mio-inositol-1-fosfato sintasa (MIPS), mejor conocida como inositol-3-fosfato sintasa, nombre recomendado por la base de datos de enzimas BRENDA (BRENDA, 2007).

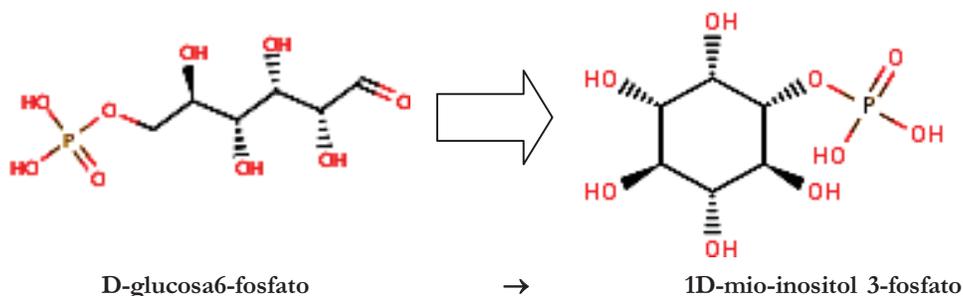


Figura 3-7. Reacción catalizada por la mio inositol 1-fosfato sintasa.

La importancia de este paso enzimático se debe a que es una reacción irreversible que proporciona una configuración específica al metabolito, es decir, que la D-glucosa 6-fosfato después de formar el ciclo, ésta poseerá una estructura con configuración dextrógira y dará lugar a la formación del 1D-mio-inositol 3-fosfato. Este metabolito participará en una serie de reacciones vitales para la planta y/o la semilla según sea el caso (Loewus & Murthy, 2000).



## *Capítulo 4*

# Justificación

**E**n estudios previos, en el laboratorio, se encontró que los niveles de expresión de MIPS en embriones de maíz disminuyeron a medida que la germinación progresaba. Tomando en cuenta que el escutelo, un órgano de reserva terminal, es el tejido mayoritario en el embrión, y el eje representa solo el 10% del peso embrionario, el resultado antes mencionado podría ser el reflejo de la expresión diferencial de este gen en los tejidos que constituyen el embrión. Por esta razón, en el presente proyecto se decidió trabajar con ejes embrionarios de maíz.





# Hipótesis

**S**i la mio-inositol 1-fosfato sintasa es una enzima de gran importancia en el desarrollo y crecimiento del eje embrionario, entonces la inducción de su transcrito se observará durante la germinación. Además, su expresión se modificará al modificar las condiciones de crecimiento y de desarrollo del eje embrionario.

# Objetivos

## *∞ Objetivo General*

**E**studiar la cinética de expresión del gen codificante de la enzima mio-inositol 1-fosfato sintasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz bajo condiciones ideales y de estrés.

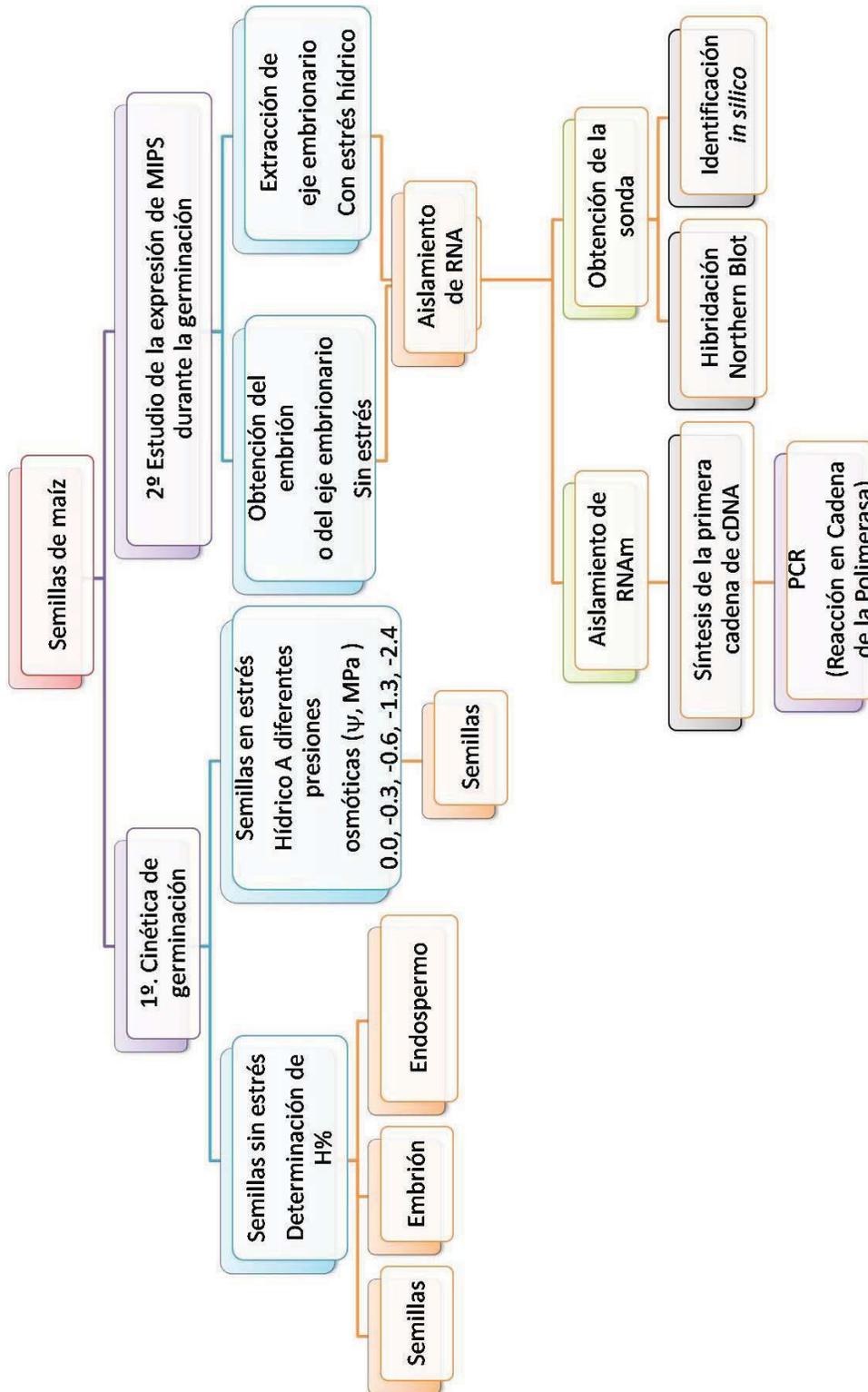
## *∞ Objetivos Específicos*

1. Caracterizar e identificar la sonda utilizada para el estudio de MIPS.
2. Determinar la cinética de imbibición de las semillas y de sus diferentes estructuras (embrión y endospermo) durante la germinación.
3. Evaluar la abundancia del transcrito codificante de MIPS durante la germinación en condiciones ideales, en estrés y después de la recuperación del estrés.





∞ *Diagrama experimental*





## Capítulo 5

# Materiales y Métodos

### *∞ Análisis de la expresión del gen codificante de la mio inositol 1-fosfato sintasa en ejes embrionarios de maíz*

#### *GERMINACIÓN DE EJES EMBRIONARIOS*

Los ejes embrionarios fueron extraídos de semillas de maíz chalqueño cosecha 2004, por la remoción física de las capas que lo cubren con una navaja nueva de un filo y se utilizaron 50 ejes embrionarios por lote de estudio. Posteriormente fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos en una solución de cloro activo al 1.2% (v/v) durante 15 min. Pasado este tiempo, los ejes se enjuagaron con agua estéril hasta que se eliminó el olor a cloro (generalmente de 5 a 6 veces). En condiciones estériles (campana de flujo laminar) los ejes fueron colocados en cajas petri de 9 cm de diámetro con 30 mL de agar (Bacto-agar, Difco) al 1% y enseguida se incubaron en condiciones de obscuridad a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 6, 8, 16, 24 y 72h.





---

### ∞ *Aislamiento de RNA<sub>total</sub>*

La extracción de RNA<sub>total</sub> se realizó de ejes sin germinar y germinados en agar a los diferentes tiempos de estudio. Además también se utilizaron ejes aislados de semillas germinadas en condiciones de estrés y recuperadas (ver detalle en la sección de germinación de semillas). Las condiciones de estrés utilizadas fueron de -0.3 y -0.6 MPa.

La extracción de RNA<sub>total</sub> se realizó utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (agente desnaturante de proteínas e inhibidor de RNAsas) a pH 4.5. Los ejes de cada tratamiento fueron pulverizados en un mortero previamente esterilizado y enfriado a -20 °C, el tejido se pulverizó adicionando N<sub>2</sub> líquido. El polvo de eje embrionario congelado se vertió en un tubo de microfuga estéril (2 mL) y a esta cantidad de tejido (100 mg aprox.) se le adicionaron 1 mL de TRIzol®. Se dejó incubar (3-5 min) a temperatura ambiente (TA) para descongelar y posteriormente se agitó por inversión vigorosamente y se incubó a TA por 5 min, en posición horizontal, para mejorar la interacción tejido-solvente. Transcurrido el tiempo se agregó 1 mL de cloroformo, se agitó por inversión durante 15 s y se incubó a TA por 3 min. Enseguida se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C (Micro centrífuga Eppendorf 5415 C) y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microfuga nuevo y estéril adicionando 1 mL de cloroformo y nuevamente se agitó por 15 s; se incubó a TA por 3 min, se centrifugó a 12 000 rpm 15 min a 4 °C y el sobrenadante o fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo de microfuga nuevo, para después adicionar isopropanol (previamente enfriado a -20 °C) en un volumen igual al de la fase acuosa obtenida. Se agitó por inversión suave y se incubó durante 10 min a TA; posterior a este tiempo se centrifugó a 12 000 rpm, por 15 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se eliminó, mientras que la pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol al 75%. La pastilla se dispersó con ayuda del vortex y se centrifugó a 9500 rpm, por 5 min a 4 °C. Finalmente la pastilla se resuspendió en 200 µL de agua- DEPC. Y cuando se observó turbidez, la solución de RNA<sub>total</sub> se centrifugó (9500 rpm, por 5 min a 4 °C) y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de microfuga nuevo y limpio. Para cada tiempo se corrieron dos muestras en paralelo.





### ∞ *Cuantificación del RNA<sub>total</sub> por espectrofotometría*

Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 mL y se colocaron 5 µL del concentrado de RNA<sub>total</sub> y 995 µL de agua-DEPC. A esta disolución se le determinó su densidad óptica a diferentes longitudes de onda λ=260 y 280 nm utilizando como blanco 1000 µL de agua-DEPC.

Debido a que las proteínas poseen estructuras aromáticas (triptófano, fenilalanina y tirosina) que absorben a 280 nm se le determina su absorción a esta longitud de onda para eliminar la posible interferencia inducida por proteínas; de manera que al realizar el cálculo de la relación  $D.O.\lambda=260/D.O.\lambda=280$  se obtiene una forma de expresar la pureza del ácido nucleico, por lo que un valor entre 1.65 y 2.0 de esta relación indica una muestra pura o con muy poca contaminación debida a proteínas (Luque & Herráez, 2001). Y para calcular la concentración del ácido nucleico se utilizó la Ecuación 1.

$$D.O. \times \frac{40 \frac{\mu g}{mL}}{1 D.O.} \times \frac{\mu L_{vol.final}}{\mu L_{aliquota}} \times \frac{1 mL}{1000 \mu L} = \frac{\mu g_{RNA\ total}}{\mu L}$$

Ecuación 1. Cálculo para la concentración de RNA<sub>total</sub>.

### ∞ *Determinación de la integridad del RNA<sub>total</sub> por electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes*

#### PREPARACIÓN DEL GEL

En un matraz estéril de 125 mL, se depositaron 0.45 g de agarosa (Ultra Pure™ Agarose. Invitrogen®), con una probeta, estéril y libre de RNAsa, se adicionaron 26.1 mL de agua-DEPC y se calentó hasta que se disolvió completamente la agarosa. Posteriormente, después de haber enfriado el matraz a ~60 °C, se adicionaron 3 mL de amortiguador MAE 10X (ver apéndice 1) lentamente resbalándolo por la pared del matraz y se llevó a la campana para que salieran los vapores tóxicos, se agitó perfectamente. Se agregaron 900 µL de formaldehído al 37% y 7 µL de bromuro de etidio al 0.05% y se depositó en la cámara de electroforesis (GIBCO BRL Horizontal gel electrophoresis apparatus Horizon®58). Se colocó el peine y se dejó enfriar el gel, una vez enfriado (hasta obtener un color blanquecino) se adicionó una disolución de MAE 1X como amortiguador de corrida (200 mL).





### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{RNA}_{\text{total}}$  se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga (4x, ver apéndice 1) y se incubó la muestra a 65 °C durante 15 min e inmediatamente después se enfrió en hielo por 5 min. La muestra desnaturalizada se cargó, y el gel se corrió a 110 V durante 20 min aproximadamente, o hasta que el azul de bromofenol haya migrado por lo menos de 2 a 3 cm.

### ∞ *Para el aislamiento del $\text{RNA}_m$*

Se siguió con el protocolo provisto por el fabricante del kit Promega, PolyAtrack® mRNA Isolation Systems, diseñado para usarse con muestras mayores a 1 mg de  $\text{RNA}_{\text{total}}$ . En un tubo de microfuga estéril de 1.5 mL se colocó 1.0 mg de  $\text{RNA}_{\text{total}}$  y se ajustó a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  en agua libre de RNAsa. Se incubó a 65 °C por 10 min para posteriormente adicionar 3  $\mu\text{L}$  del Oligo (dt) biotinilado y 13  $\mu\text{L}$  de SSC 20X (proporcionado por el fabricante) al RNA. Se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente hasta que la disolución estuvo completamente fría y clara (esto debe requerir alrededor de 10 min o menos). Por otra parte se prepararon los tubos que contenían a las partículas paramagnéticas de Streptavidin (SA-PMPs); éstas se resuspendieron con golpes suaves en el fondo del tubo hasta que quedaron completamente dispersas. Las SA-PMPs fueron capturadas colocando el tubo en una base magnética. El sobrenadante se removió cuidadosamente y las SA-PMPs se lavaron tres veces con SSC 0.5X y SSC 0.1X (300  $\mu\text{L}$ , por lavado). Después de cada lavado se capturaron las partículas y se retiró el sobrenadante cuidadosamente evitando tocar las SA-PMPs. Al terminar los lavados se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de SSC 0.5X a las SA-PMPs. A estos tubos se les adicionó la reacción de RNA y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, mezclando por inversión cada 2 min. Usando la base magnética, se capturaron las partículas y se removió el sobrenadante (el cual se desecha porque corresponde al RNA ribosomal). Las partículas fueron lavadas cuatro veces con 300  $\mu\text{L}$  de SSC 0.1X cada vez, agitando suavemente hasta que todas las partículas se resuspendieron por completo; después de cada lavado se capturaron las partículas y se eliminaron los sobrenadantes. La pastilla final de SA-PMPs se resuspendió cuidadosamente en 100  $\mu\text{L}$  de agua-DEPC para liberar la fracción de  $\text{RNA}_m$ . Éste se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se capturaron magnéticamente las partículas, el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril. Se realizó una segunda elusión con 150  $\mu\text{L}$  de agua-DEPC. El volumen final de  $\text{RNA}_m$  obtenido fue





de 250  $\mu\text{L}$ . El  $\text{RNA}_m$  se precipitó con 3  $\mu\text{L}$  de glucógeno, 1/3 de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó por un tiempo de mínimo de 6 h a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  o toda la noche. Una vez precipitado el  $\text{RNA}_m$ , se centrifugó a 14,000 rpm /30 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y la pastilla resultante se resuspendió en 25  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas.

### *∞ RT-PCR (Síntesis de la primera cadena de cDNA, mediante la transcriptasa reversa y de la reacción en cadena de la DNA-polimerasa)*

#### *SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE CDNA*

En un tubo de microfuga estéril de 0.6 mL se adicionaron 20  $\mu\text{L}$ , de  $\text{RNA}_m$ , 1  $\mu\text{L}$  de Oligo (dt)12-18 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM cada uno, Invitrogen) y agua-DEPC hasta obtener volumen final de 12  $\mu\text{L}$ , la reacción se calentó a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 min y se colocó en hielo inmediatamente y el contenido se colectó dando un pulso en la microcentrífuga y se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador First Strand 5X (Invitrogen, de primera cadena), 2  $\mu\text{L}$  de ditriotretitol (0.1 M, Invitrogen) y 1  $\mu\text{L}$  de agua-DEPC, esta reacción se incubó a  $42\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 min y se le añadieron 1  $\mu\text{L}$  (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa (SuperScript<sup>TM</sup>II, Invitrogen). Se mezcló por pipeteo suavemente y se incubó a  $42\text{ }^\circ\text{C}$  por espacio de 50 min. Transcurrido los 50 min, para inactivar a la transcriptasa reversa se incubó 15 min a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . Como paso adicional, para evitar que el  $\text{RNA}_m$  residual interfiera en los pasos subsecuentes, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  (2 unidades) de RNAsa H (Invitrogen) y se incubó 20 min a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### *PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)*

Las condiciones de la técnica para la amplificación de MIPS son las siguientes:

**Tabla 5-1. Condiciones para la reacción de PCR para MIPS.**

<b>Etapa</b>	<b>T <math>^\circ\text{C}</math></b>	<b>t (min)</b>
Previa	94	5
Desnaturalización	94	2
Alineamiento	68	1
Elongación	72	2
Final	72	5
Almacenamiento	4	$\alpha$
30 ciclos del conjunto de etapas desnaturalización, alineamiento, elongación		





Tabla 5-2. Componentes para la reacción de PCR para MIPS.

Reactivo	Para 1 reacción (μL)
Amortiguador de PCR (10x)	1.0
dNTPs mix (10mM)	0.2
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.3
Oligo MIPS (Fwd) 10mM	0.2
Oligo MIPS (Rvs) 10mM	0.2
cDNA	2.0
Taq Polimerasa platinum (5U/μL)	0.1
H <sub>2</sub> O-estéril c.b.p 10 μL	6.0

Tabla 5-3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR del fragmento de MIPS.

Nombre	Secuencia	Pb	%GC
Forward	GGG TGG GGA GGC AAC AAC GGG	21	51
Reverse	GCC ATC GTT GTT TCC CAA GTG GTT GTA GCT	30	70

Las condiciones de la técnica para la amplificación de ubiquitina son las siguientes:

Tabla 5-4. Condiciones para la reacción de PCR para ubiquitina.

Etapas	T °C	t (min)
Previa	94	5
Desnaturalización	94	2
Alineamiento	68	1
Elongación	72	2
Final	72	5
Almacenamiento	4	α
24 ciclos del conjunto de etapas desnaturalización, alineamiento, elongación		

Tabla 5-5. Componentes para la reacción de PCR para ubiquitina.

Reactivo	Para 1 reacción (μL)
Amortiguador de PCR (10x)	1.0
dNTPs mix (10mM)	0.2
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.4
Oligo MIPS (Fwd) 10mM	0.376
Oligo MIPS (Rvs) 10mM	0.376
cDNA	1.0
Taq Polimerasa platinum (5U/μL)	0.08
H <sub>2</sub> O-estéril c.b.p 10 μL	6.72





Tabla 5-6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del fragmento de ubiquitina.

Nombre	Secuencia	Pb	%GC
Forward	CAC TTG GTG TTG CGT CTC AG (Secuencia 5' a 3')	21	51
Reverse	CAC CTC AAG GGT GAT CGT CT (Secuencia 5' a 3')	30	70

## ∞ *Hibridación tipo Northern Blot*

### GENERACIÓN DE LA SONDA

#### AISLAMIENTO DEL PLÁSMIDO

A partir de un cultivo de células transformadas con el inserto de MIPS, en condiciones estériles, se inoculó por estriado la clona 7 en cajas petri con medio selectivo LB/ ampicilina (100 µg/mL) y se dejaron incubando a 37 °C durante 16 h (O/N). Al día siguiente se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron en medio LB/ampicilina líquido (6 mL), se incubaron a 37 °C durante 16 h en agitación (250 rpm).

#### PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

El plásmido se obtuvo utilizando el protocolo provisto por el Kit Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen Bioscience). En un tubo de microfuga se colectó un pellet de células a partir de un cultivo de 5 mL (centrifugando alícuotas de 1 mL, en el mismo tubo) cada alícuota fue centrifugada por 2 min a 13000 rpm a TA. Posteriormente las células se resuspendieron en 250 µL de amortiguador G1 (proporcionado por el fabricante) hasta obtener una suspensión de células homogénea. Enseguida se adicionó 250 µL de solución de lisis (G2) y se mezcló cuidadosamente por inversión (5 veces) y se dejó incubando 5 min a TA. Transcurrido el periodo de incubación se añadieron 350 µL de amortiguador de neutralización (M3) y se mezcló inmediatamente por inversión (5 veces), después el tubo fue centrifugado a 12000 rpm/10min. En un cartucho de filtración fue colocado el sobrenadante del paso anterior y éste a su vez en un tubo colector limpio de 2 mL. Después se centrifugó a 12000 rpm /1 min y el filtrado obtenido nuevamente se descartó y se adicionaron 700 µL de amortiguador de lavado (G4) al interior del cartucho, enseguida se centrifugó a 12000 rpm /1 min y el filtrado obtenido se retiró; de nuevo se centrifugó a 12000 rpm /1 min para remover el amortiguador de lavado residual. Finalmente el cartucho de filtración fue colocado en un tubo de microfuga de 1.5 mL (nuevo y limpio) y se agregaron 75 µL de amortiguador TE (que previamente se calentó a 65 °C) directamente al





centro del interior del cartucho de filtración y se incubó durante 2 min a TA. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min a TA.

### DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO

Una vez aislado el plásmido se digirió con la enzima de restricción *Eco*R1, debido a que el plásmido contiene un sitio de restricción cercano al sitio de clonación en donde se insertó el DNA de MIPS.

En un tubo de microfuga limpio se colocaron 45  $\mu$ L del plásmido purificado, 1.5  $\mu$ L de *Eco*R1 (Invitrogen®), 3  $\mu$ L de agua estéril y 5.5  $\mu$ L de amortiguador 10x (proporcionado por el fabricante). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 16 h (toda la noche) para asegurar la eficiencia de la digestión. Enseguida se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para DNA con la finalidad de observar la banda correspondiente al inserto de MIPS de acuerdo a su peso molecular de aproximadamente 829 pb. El plásmido aislado se mandó a secuenciar a la empresa Macrogen.

### PURIFICACIÓN DEL INSERTO

Una vez aislado el inserto de MIPS del plásmido, éste se purificó utilizando el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification. La banda de MIPS del gel anteriormente hecho se cortó con ayuda del transiluminador y una navaja de un filo, nueva. El fragmento de agarosa con el DNA de interés fue depositado en un tubo de microfuga limpio previamente tarado y se adicionó 10  $\mu$ L de amortiguador de captura por cada 10 mg de gel, la mezcla se incubó a 65 °C y agitación por inversión cada 3 min hasta disolver completamente el gel. La mezcla de reacción fue colocada en una columna GFX y ésta a su vez en un tubo colector (provistos por el proveedor). Se incubó a TA durante 1 min y se centrifugó a 13 000 rpm/30 s. El filtrado se descartó y la columna se colocó nuevamente en el tubo colector. Sobre la columna se adicionaron 500  $\mu$ L de amortiguador de lavado y se centrifugó a 13 000 rpm/1 min. El tubo colector se cambió por un tubo de microfuga limpio de 1.5 mL y se aplicaron de 10 a 50  $\mu$ L de amortiguador de elusión directamente sobre la superficie de la membrana de la columna GFX, la muestra se incubó durante 2 min a TA y se centrifugó a 13 000 rpm/2 min.



**MARCADO DE LA SONDA**

El marcado de la sonda se realizó utilizando el protocolo DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II. Se utilizó 1 µg de DNA de MIPS (sonda) y se llevó a un volumen final de 16 µL con agua bidestilada estéril. El DNA se desnaturalizó por calentamiento en un baño de agua a ebullición durante 10 min. Posteriormente se enfrió en un baño de hielo durante 5 min, el vial 1 se agitó cuidadosamente y se adicionaron 4 µL del vial 1 a la muestra de DNA desnaturalizada y se incubó a 37 °C durante 16 h (toda la noche), porque largos periodos de incubación favorecen el incremento en los rendimientos del marcado. Al día siguiente la reacción se terminó adicionando 2 µL de EDTA 0.2 M (pH 8.0) y por calentamiento a temperatura de ebullición (93 °C) por 10 min.

**DETERMINACIÓN DEL LA EFICIENCIA DE MARCADO**

Se preparó una serie de diluciones de la sonda marcada y del DNA control (vial 2, proporcionado por el fabricante) como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 5-7. Determinación de la eficiencia de marcado.

Tubo	DNA (µL)	Del tubo #	Amortiguador de dilución de DNA (vial 3, µL)	Dilución	Concentración Final
1		dilución original			1 ng/µL
2	5	1	495	1:100	10 pg/µL
3	15	2	35	1:3.3	3 pg/µL
4	5	2	45	1:10	1 pg/µL
5	5	3	45	1:10	0.3 pg/µL
6	5	4	45	1:10	0.1 pg/µL
7	5	5	45	1:10	0.03 pg/µL
8	5	6	45	1:10	0.01 pg/µL
9	0	-	50	-	-

El procedimiento se realizó como lo describe el protocolo del kit (Apéndice 1).

**TRANSFERENCIA POR CAPILARIDAD**

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes para RNA y se corrió durante 45 min y la transferencia por capilaridad se realizó como se muestra en la siguiente figura.



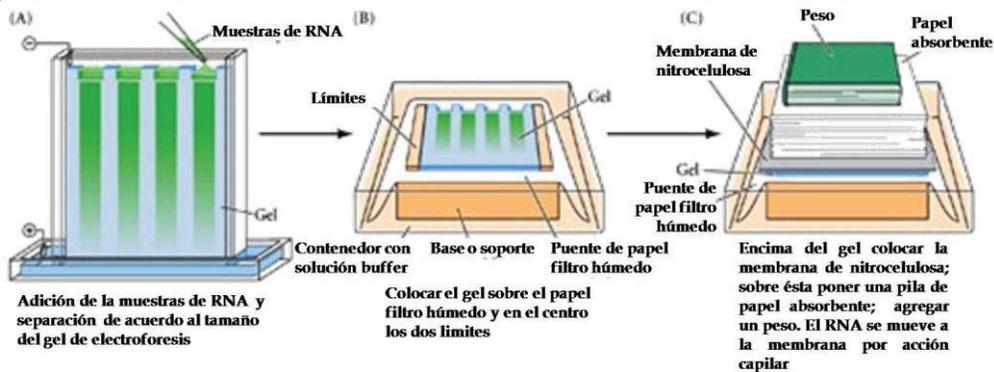


Figura 5-1. Transferencia tipo Northern Blot.

En un refractario de vidrio (Pyrex®) de 18.5 x 13.5 x 4.5 cm previamente lavado y enjuagado con agua desionizada se colocó una base de plástico, encima una base de vidrio aproximadamente del tamaño del gel. Sobre éste se colocaron 2 papeles filtro (papel puente) del ancho del gel y de 25 cm de longitud (para que los extremos estuviesen en contacto directo con el líquido de transferencia, SSC 10X) y se humedeció toda la cámara con 250 mL de amortiguador SSC 10X. Por otro lado en una caja petri grande se agregó SSC 10X para humedecer más papel filtro cortado al tamaño del gel (6 piezas). En otra caja petri se preparó la membrana de Nylon Millipore® cortada al tamaño del gel, y se humedeció con agua desionizada dejando caer la membrana lentamente sobre la superficie del amortiguador para evitar la formación de burbujas y permitir que se humedezca homogéneamente (en ésta solución permaneció durante 5 min y se volteó). Se enjuagó y una vez húmeda se pasó a la caja petri con SSC 10X y se dejó reposar 5 min más.

Una vez preparada la cámara con las condiciones antes descritas, el papel filtro (3 piezas) de la caja de petri se colocó en el centro sobre el papel puente de la cámara y se hizo rodar un tubo de ensayo, por la superficie de los papeles para eliminar las burbujas. El gel de electroforesis se colocó sobre los últimos papeles colocados y se cortó el extremo superior izquierdo, para identificar la secuencia de las muestras colocadas. Encima del gel se colocó la membrana húmeda y con un tubo de ensayo pequeño se rodó en un solo sentido sobre la membrana y también se le cortó el extremo superior izquierdo. Posteriormente fue colocada una capa de papel filtro humedecido en SSC 20X (3 piezas), y finalmente una capa de papel periódico seco (cortado al tamaño del gel) de aproximadamente 7 cm de espesor. Por último, una placa de vidrio (como soporte) y se cubrió completamente con plástico autoadherible (para proteger del polvo) y sobre





ésta se colocó un peso de 500 g (un libro) aproximadamente extendido sobre toda la superficie del ensamble y se dejó transfiriendo toda la noche o de 8 a 16 h a temperatura ambiente.

Una vez transferido el RNA a la membrana, ésta se secó a 65 °C/15 min (en estufa de vacío) y se realizó el entrecruzamiento (crosslinking) en un horno de radiación UV durante 30 s. Posteriormente la membrana se lavó con amortiguador SSC 2X durante 15 min con agitación y al finalizar se lavó con agua desionizada 15 min más.

### *HIBRIDACIÓN:*

La hibridación, los lavados de astringencia y la detección inmunológica se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter.

#### **PREHIBRIDACIÓN**

Se calentó 10 mL de DIG Easy Hyb a la temperatura de hibridación (37 °C). Para la prehibridación, la membrana se colocó en un contenedor de vidrio para hibridar y se adicionó el amortiguador de hibridación caliente e incubó en agitación suave en horno de hibridación a 37 °C durante 30 min.

#### **HIBRIDACIÓN**

Por otro lado en un tubo de microfuga limpio de 1.5 mL, se adicionó aproximadamente 190 ng de la sonda marcada (2.6 µL) y se desnaturizó durante 5 min en un baño de agua hirviendo, enseguida se enfrió en hielo 5 min. Transcurrido el tiempo de prehibridación, el amortiguador fue retirado del tubo conteniendo la membrana de nylon y cambiado por uno nuevo (3.5 mL), conteniendo la zonda desnaturizada e incubado en las condiciones anteriores. Se agitó suavemente para evitar la formación de burbujas y permaneció en incubación durante 16h (o toda la noche) con agitación a  $65 \pm 3$  °C.

#### **LAVADOS DE ASTRINGENCIA**

Cumplido el tiempo se realizaron 2 lavados con 25mL de solución de SSC 2X, SDS 0.1% a TA con agitación y por un tiempo de 5 min. Posteriormente se realizaron dos lavados más de 15 min cada uno con 15mL de solución de SSC 0.5X, SDS 0.1% (previamente calentado a 65 °C).





---

#### DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

Todas las incubaciones fueron a temperatura ambiente y con agitación suave. Después de la hibridación y los lavados, la membrana fue enjuagada con amortiguador de lavado (Apéndice 1) durante 5 min y en seguida se incubó durante 30 min en 100 mL de solución de bloqueo (Apéndice 1), el amortiguador se decantó y se incubó en 20 mL de solución de anticuerpo (Apéndice 1) durante 30 min. La solución se retiró y se lavó dos veces con 100 mL de amortiguador de lavado durante 15 min (c/u). Posteriormente se incubó en 20 mL de amortiguador de detección (Apéndice 1) por 5 min. El amortiguador se decantó y la membrana se transfirió a una hoja de acetato limpia (con el lado que tiene el RNA hacia arriba) y se adicionó 1 mL de CSPD ready to use (botella 5, suministrada por el proveedor) e inmediatamente se cubrió con otra hoja de acetato, evitando la formación de burbujas y cuidadosamente se hizo rodar un tubo de ensayo para retirar el excedente de sustrato y eliminar las burbujas restantes, a continuación se cubrieron las cuatro orillas de las hojas de acetato con Parafilm®, para evitar que la membrana se seque durante los siguientes pasos, y se incubó durante 5 min. La placa de acetato con la membrana se incubó durante 10 min a 37 °C, para favorecer la reacción de quimioluminiscencia. Finalmente la membrana fue expuesta en una placa de rayos X (Kodak Photo Film) por 25 min a temperatura ambiente.

#### REVELADO POR AUTORADIOGRAFÍA

Transcurrido el tiempo de exposición, la placa fue revelada en condiciones totalmente oscuras (para evitar el velado de la placa). Ésta fue colocada en la charola 1 con solución reveladora durante 1 min, en seguida se dejó en una segunda charola con agua 1 min, para enjuagar y retirar el excedente de solución reveladora, después se pasó a una tercera charola con solución fijadora durante 1 min y por último se pasó a la segunda charola para retirar el excedente de solución fijadora y se dejó secar a TA.





---

## ∞ *Curva de imbibición*

### ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se pesaron 7 lotes de 10 semillas de maíz cada uno, cada lote fue tratado para su desinfección superficial, con soluciones de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) a una concentración final del 1.2% (v/v), en agitación constante durante 10 min. Posteriormente se enjuagaron los lotes con agua bidestilada hasta eliminar el olor a cloro.

### GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas desinfectadas se acomodaron en toallas absorbentes humedecidas en agua bidestilada y se envolvieron en forma de taco. Posteriormente los tacos se colocaron en charolas con agua (2 cm de altura) y rejillas en el fondo, estas últimas con la finalidad de que el agua no estuviera en contacto directo con las semillas. Las charolas fueron cerradas herméticamente e incubadas a una temperatura de  $28\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  en obscuridad por diferentes tiempos, 4, 8, 12, 15, 18, 22 y 48 h. Una vez alcanzado el tiempo de germinación, se les determinó el grado de imbibición (como g de agua absorbida/100 g de semillas) por gravimetría utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{g_{\text{H}_2\text{O}_{\text{absorbida}}}}{100g_{\text{semillas}}} = \frac{[(g_{\text{semilla húmeda}}^t) - (g_{\text{semilla húmeda}}^{t_0})] \times 100}{g_{\text{semilla húmeda}}^{t_0}}$$

**Ecuación 2. Determinación de agua absorbida.**

Donde:

$g_{\text{semilla húmeda}}^t$ : Son los gramos de semillas al tiempo x h de germinación

$g_{\text{semilla húmeda}}^{t_0}$ : Son los gramos de semillas al tiempo 0 h de germinación

Y la determinación se hizo por quintuplicado para cada lote.

### DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Las semillas fueron seccionadas en embriones y endospermo, a estas estructuras se les determinó el % de humedad por gravimetría usando estufa de vacío. Los embriones y endospermos fueron introducidos dentro de charolas de aluminio (previamente pesadas y a peso constante), se pesaron y se colocaron en la estufa de vacío a  $60\text{ °C}$ . Las muestras permanecieron





en estas condiciones hasta alcanzar el peso seco constante. El % de Humedad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \frac{[(P_{\text{charola} + \text{mtra seca}} - P_{\text{cte}}^{\text{charola}}) \times 100]}{(P_{\text{charola} + \text{mtra Húmeda}} - P_{\text{cte}}^{\text{charola}})}$$

**Ecuación 3. Determinación de humedad.**

Donde:

$P_{\text{charola} + \text{mtra seca}}$ : Es el peso (g) de la charola con muestra seca a peso cte.

$P_{\text{charola} + \text{mtra Húmeda}}$ : Es el peso (g) de la charola con muestra húmeda.

$P_{\text{cte}}^{\text{charola}}$ : Es el peso (g) de la charola vacía a peso cte.

La determinación se hizo por quintuplicado para cada lote

#### GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS EN ESTRÉS POR SEQUÍA

Se utilizaron 5 lotes con 25 semillas, cada uno. Se les desinfectó superficialmente y se colocaron sobre papel filtro estéril, para absorber el excedente de agua. En condiciones estériles y en cajas petri de 14 cm de diámetro con papel filtro en el fondo. Se adicionaron 50 mL de soluciones de polietilén glicol (PEG, Av. Mol. Wt.:8000, Sigma) como agente estresante. Debido al alto contenido de grupos hidroxilos que posee el PEG, éstos forman puentes de hidrógeno con el agua produciendo así la retención del líquido y disminuyendo su disponibilidad generando también la sequía in vitro.

**Tabla 5-8. Concentraciones de PEG para generar el estrés por sequía a diferentes presiones osmóticas.**

$\Psi$ = Presión Osmótica (MPa)	[PEG] g/kg <sub>agua</sub>
0.0	0.0
-0.3	151.3988
-0.6	223.6586
-1.2	326.2527
-2.4	471.163

La prueba se hizo por duplicado. Para conocer si las semillas conservaban viabilidad después de 72 h en condiciones de estrés, las semillas no germinadas en este tiempo fueron enjuagadas en condiciones estériles con agua bidestilada, para retirar el exceso de PEG, para después ser colocadas en nuevas cajas petri con papel filtro y con 10 mL de agua bidestilada. Transcurridas 24 h de germinación en recuperación se observaron los resultados





## *Capítulo 6*

# Resultados

**E**n estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se encontró que los niveles de expresión de MIPS, en embriones de maíz, disminuyó a medida que la germinación progresaba (Xolalpa, 2007). Este comportamiento resulta contradictorio considerando que durante la germinación el mio inositol, producto de la vía metabólica en la que MIPS participa, es de gran importancia por ser precursor de fosfolípidos y ácido glucurónico, moléculas involucradas en la señalización celular, la biosíntesis de membranas y de la pared celular. Estos fenómenos bioquímicos y fisiológicos son inducidos durante la germinación (Loewus & Murthy, 2000).

Por lo anterior y tomando en cuenta que el eje representa solo el 10% del peso del embrión, y el escutelo constituye el tejido mayoritario en este órgano, el resultado antes mencionado podría ser el reflejo de la expresión diferencial de este gen en los tejidos que constituyen el embrión. Por esta razón, en el presente proyecto se decidió trabajar con ejes embrionarios de maíz. A continuación se describe el comportamiento de la expresión de MIPS en ejes embrionarios germinados.





Debido a que la expresión de un gen se puede estudiar por diversos métodos y cada uno de ellos requiere la generación de ciertas herramientas moleculares, los resultados de esta tesis están descritos en dos secciones: en la primera, se detallan los experimentos realizados para generar las herramientas moleculares necesarias, para detectar la expresión del gen de interés a través de la hibridación tipo Northern blot; y en la segunda, el estudio de la expresión del gen a través de PCR por transcripción reversa.

### ∞ *Hibridación tipo Northern Blot*

#### *AI SLAMI ENTO, PURIFICACIÓN Y DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE*

El laboratorio de la Dra. Bernal cuenta con una serie de clonas que portan un fragmento de 800 pb del gen MIPS, pero que no habían sido caracterizadas (Escamilla-Martínez, 2006). De este conjunto se utilizó la clona 7 para aislar y purificar el plásmido que contiene el inserto de MIPS. El vector de clonación utilizado fue el pGem T-Easy vector de 3015 pb que incrementa su peso al adicionarle, mediante una ligasa, el inserto de MIPS por lo que se obtiene un plásmido de peso superior a los 3800 pb. Para determinar la presencia del plásmido recombinante en la bacteria, éste fue aislado y purificado y se le determinó su peso molecular a través de un análisis electroforético. Efectivamente, las bacterias de la clona 7 portaban un plásmido de más de 3000 pb. (Figura 6-1).

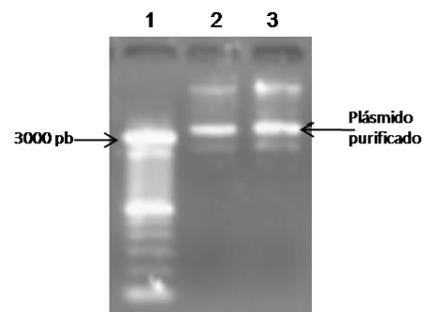


Figura 6-1. Análisis electroforético del plásmido recombinante. Pozo 1, marcador de pesos moleculares; Pozo 2 y 3, plásmido purificado de la clona 7.

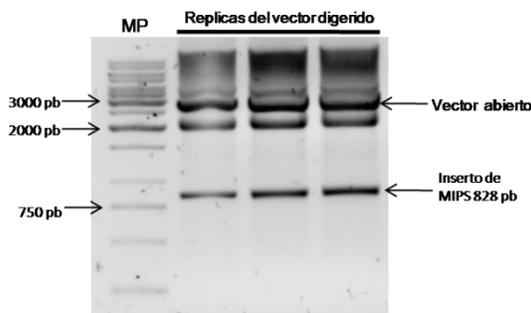


Figura 6-2. Determinación del peso molecular del posible transcrito de MIPS. Se muestra plásmido digerido (vector abierto) y el fragmento liberado de 828 pb correspondiente al gen de MIPS. MP, marcador de pesos moleculares.

Para ratificar la presencia del fragmento de MIPS se realizó la digestión del plásmido con la enzima *Eco*R1 y enseguida se hizo un gel de electroforesis en el que se observan dos fragmentos, uno de aproximadamente 800 pb y otro de alrededor de 3000 pb (Figura 6-2).

Resultado que corrobora la presencia del inserto de MIPS de 829 pb y el del plásmido de 3000 pb.





SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN IN SILICO DEL INSERTO DE MIPS

Una vez demostrado que el plásmido presente en la clona 7 era un plásmido recombinante, éste se purificó del gel y se mandó secuenciar (Macrogen Advancing through Genomics) utilizando los promotores universales SP6 (para iniciar la síntesis de la secuencia en el sentido 5'→3') y el T7 (para el sentido 3'→5'). Al obtener ambas secuencias (Apéndice 3) y con ayuda del gráfico de calidad o histograma se analizó cuales pares de bases eran las que se debían utilizar para ensamblar la secuencia del inserto. Con el programa CAP3 Sequence Assembly se localizaron los extremos en que las secuencias eran idénticas y enseguida se realizó un ensamble, y por consenso se obtuvo una sola secuencia llamada “contig” (“continuo”).

La figura 6-3 muestra la secuencia de DNA obtenida por el programa, así también se indican las características que presenta como son: la longitud (en pares de bases), peso molecular, % de GC y otros. Con esta secuencia de DNA se trabajó para su posterior identificación.

```

>Contig1
NNNNNATCGATTGGGTGGGGAGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGGGTCATTGCC
AACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAAGGACAAGGTGCAGCAAGCCAACACTACTACGGC
TCCCTCACCCAGGCTTCCACCATCAGAGTAGGCAGCTACAACGGGGAGGAGATATATGCG
CCGTTCAAGAGCCTCCTACCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTTGGAGGCTGGGAC
ATCAGCAGCATGAACCTGGCAGATGCCATGACCAGGGCCAAGGTGCTGGACATTGACCTG
CAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTGCCACTTCCCGGTGTCTATGATCCG
GACTTCATCGCCGCTAACCAGGGCTCTCGTGCCAACAATGTCATCAAGGGCACCAGAAA
GAACAGGTGGAGCAGATCATCAAGAATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGAC
AAGGTAGTCGTGCTGTGGACTGCAAACTGAAAGGTACAGCAATGTATGCGCTGGTCTC
AACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAGAATGAGACGGGAGATCTCACCA
TCAACTACTATATGCCATTGCCTGTGTCACGGAGGGGGTCCCGTTCATCAATGGGAGCCCC
CAGAACACTTTTGTGCCTGGGCTGATTGATCTTGCTATCAAGAACAACACTGCTTGATCGGT
GGTGACGACTTCAAGAGTGGGCAGACCAAGATGAAATCGGTCTGTTGATTTCTTGT
GGTGCTGGAATAAAGCCCACCTCGATTGTGAGCTACAACCACTTGGGAAACAACGATGGC
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACNNNNN

```

**Longitud = 829 pares de base**  
**Peso molecular = 252186.00 Daltons, una cadena**  
**Peso molecular = 504487.00 Daltons, doble cadena**  
**Content G+C = 53.56%**  
**Content A+T = 46.44%**

Nucleótido	Número	% Mol
A	163	19.66
C	239	28.83
G	205	24.73
T	222	26.78

Figura 6-3. Características y secuencia del DNA obtenido por el programa CAP3. Las secuencias de oligonucleótidos sombreadas no forman parte del fragmento de MIPS.





Utilizando la herramienta **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)** del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), se identificó a que tipo de gen era similar la secuencia antes obtenida, y se observó que la mayor identidad la presentó con la secuencia de un supuesto gen de la mio inositol 1-fosfato sintasa llamado “mips2”, proveniente de embriones de *Zea mays* de 12 días de desarrollo.

Este resultado se obtuvo a partir de la alineación del fragmento junto con las secuencias de varias fuentes vegetales y en donde el programa proporciona la puntuación (score, 1482) más alta al alineamiento del fragmento de MIPS con el del supuesto gen de MIPS2 (No. de accesoión NM 001112498.1), también es importante destacar que el alineamiento entre ambas secuencias tiene un valor de espectancia de 0.0 es decir, la probabilidad de que la similitud entre las secuencias sea al azar es nula. Es decir, a menor espectancia es mayor la identidad que en este caso fue del 98 % (Tabla 6-1).

Tabla 6-1. Resultados de la alineación múltiple del fragmento secuenciado con las secuencias de genes heterólogos de plantas. El valor E indica la probabilidad de que las secuencias comparadas no sean similares.

No. de accesoión	Descripción	Puntuación total	% Cobertura	Valor E	Ident. Max.
<a href="#">NM_001112498.1</a>	<i>Zea mays</i> putative inositol-3-phosphate synthase (mips2), mRNA >ei	1482	100%	0.0	98%
<a href="#">EU961709.1</a>	<i>Zea mays</i> clone 237754 unknown mRNA	1327	100%	0.0	95%
<a href="#">NM_001112082.1</a>	<i>Zea mays</i> low phytic acid1 (lpa1), mRNA	1315	100%	0.0	95%
<a href="#">AF056326.1</a>	<i>Zea mays</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA, complete cds	1315	100%	0.0	95%
<a href="#">BT018520.1</a>	<i>Zea mays</i> clone EL01N0431D11.d mRNA sequence	1120	78%	0.0	97%
<a href="#">EU371115.1</a>	<i>Brassica juncea</i> myo-inositol-1-phosphate synthase mRNA, partial cds	1033	100%	0.0	89%
<a href="#">AY323824.1</a>	<i>Xerophyta viscosa</i> myo-inositol-1-phosphate synthase INO1 mRNA, c	1033	100%	0.0	89%
<a href="#">EU267961.1</a>	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group clone KCS142A02 inositol-3-phosphate	1027	100%	0.0	89%
<a href="#">NM_001055777.1</a>	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) Os03g0192700 (Os03g019270	1027	100%	0.0	89%
<a href="#">AK103501.1</a>	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone:J033131B11, full insert seq	1027	100%	0.0	89%
<a href="#">AK058750.1</a>	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone:001-019-H08, full insert sec	1027	100%	0.0	89%
<a href="#">AB012107.1</a>	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group RINO1 mRNA for myo-inositol phosphat	1022	100%	0.0	88%
<a href="#">AY154382.1</a>	<i>Lolium perenne</i> myo-inositol phosphate synthase mRNA, partial cds	963	99%	0.0	87%
<a href="#">AF056325.1</a>	<i>Hordeum vulgare</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA, complet	963	99%	0.0	87%
<a href="#">AK250476.1</a>	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare cDNA clone: FLbf74e03, mRNA sec	957	99%	0.0	87%
<a href="#">BT016742.1</a>	<i>Zea mays</i> clone Contig575 mRNA sequence	924	72%	0.0	94%
<a href="#">AB059557.2</a>	<i>Avena sativa</i> MIP mRNA for myo-inositol-1-phosphate synthase, com	905	100%	0.0	86%
<a href="#">AF412340.1</a>	<i>Porteresia coerctata</i> inositol 1-phosphate synthase (PINO1) gene, cor	784	100%	0.0	83%

Finalmente se analizó con detenimiento y a detalle, cuales son las diferencias que hay entre las secuencias del fragmento de 828pb con la secuencia MIPS2 tanto a nivel de nucleótidos como a nivel de proteínas. En la Fig. 6-4 se observa que el alineamiento del fragmento clonado se inició en la posición 270 de la secuencia del MIPS2 correspondiente al aminoácido No. 68. También se observa que las secuencias de nucleótidos alineadas difieren en 9 pb, aunque al traducir las secuencias, los aminoácidos en los que difieren fueron solo dos. También se confirman los





parámetros antes mencionados (espectancia e identidad) y se indica que no hay presencias de gap's.

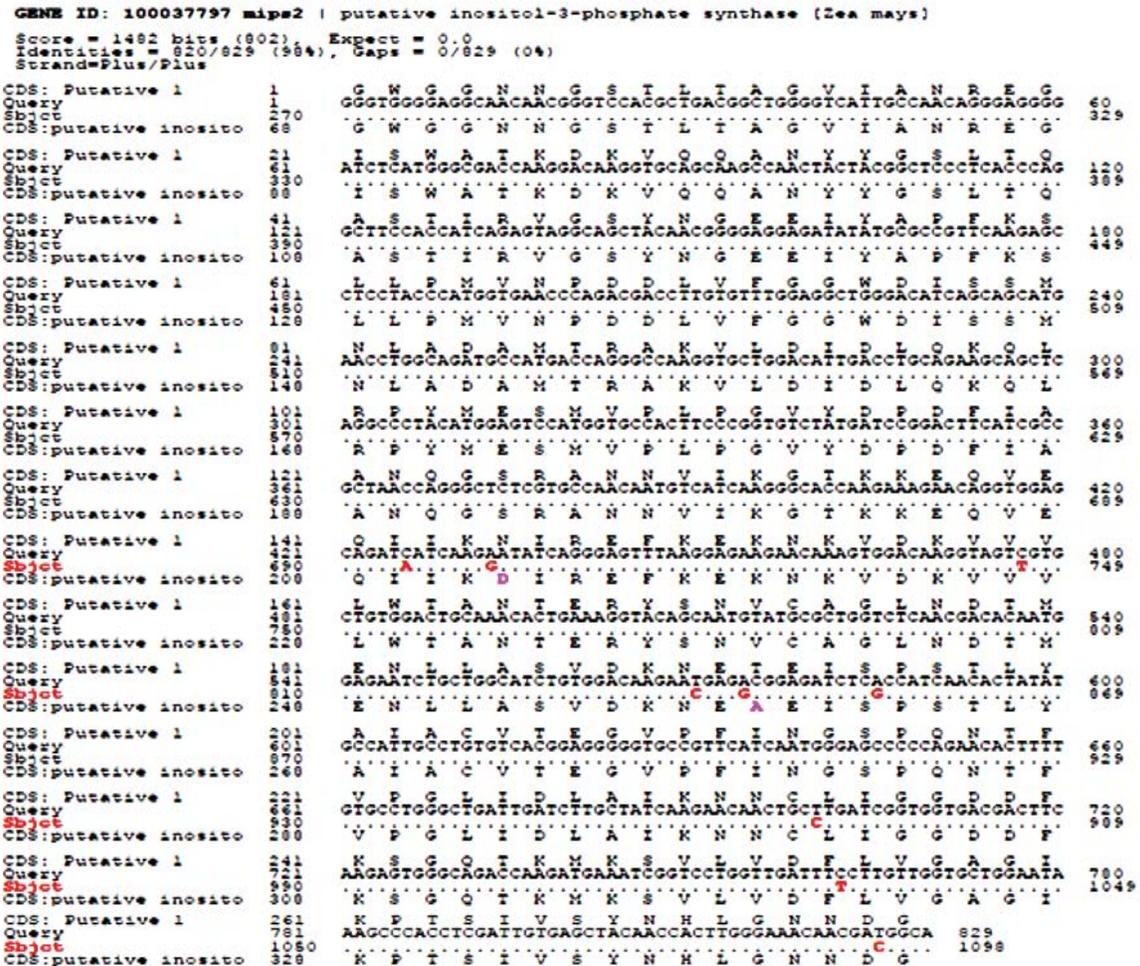


Figura 6-4. Alineamiento entre el fragmento de 829 pb y la secuencia del supuesto gen de mips2 a nivel de nucleótidos.

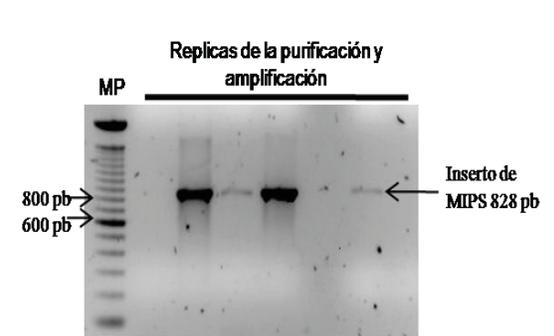


Figura 6-5. Amplificación del transcrito de MIPS. MP, marcador de pesos moleculares.

Una vez asegurada la identidad del fragmento clonado se procedió a su purificación. Sin embargo, la recuperación del DNA fue menor del 60 %, por lo que se reunieron todas las réplicas de la digestión en una sola muestra. La cual se purificó y se empleo como molde para su amplificación por PCR, en la que se utilizaron los oligos específicos del gen, las condiciones y componentes indicados en métodos (Tablas 5-1; 5-2; 5-3), para así volver a purificar (Figura 6-5) y con esto asegurar la eliminación de reactivos y





oligonucleótidos que pudiesen afectar a las etapas subsecuentes de la hibridación. Este fragmento fue utilizado como sonda.

EFICIENCIA DEL MARCADO DE LA SONDA

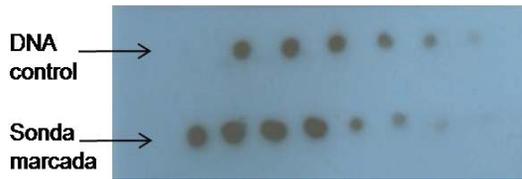


Figura 6-6. Eficiencia del marcado de la sonda.

La eficiencia del marcado de la sonda se realizó mediante la comparación con un DNA estándar marcado, proporcionado por el fabricante. Éste recomienda colocar en una membrana de nylon 1 µl de una serie de diluciones como lo indican las instrucciones del kit, y en paralelo se colocan una serie de diluciones del fragmento MIPS marcado. En la figura 6-6 se observa que la intensidad de las muestras de la sonda marcada, es mayor que las del estándar, lo que indica que hay un excelente rendimiento en el marcado de la sonda.

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

Como se mencionó en el capítulo 3 la hibridación se llevó a cabo por etapas: electroforesis, transferencia por capilaridad, prehibridación, hibridación, lavados a alta astringencia, detección inmunológica y el revelado de la membrana por autorradiografía. Todas las etapas se realizaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor, sin embargo se presentaron problemas en la detección de la hibridación ya que las películas reveladas mostraron bandas y gran cantidad de señal inespecífica. Por lo que se realizaron dos tipos de modificaciones al protocolo descrito por el fabricante. Primero se incremento el tiempo de incubación con el revelador inmunológico manteniéndose las condiciones de lavado (Fig. 6-7).

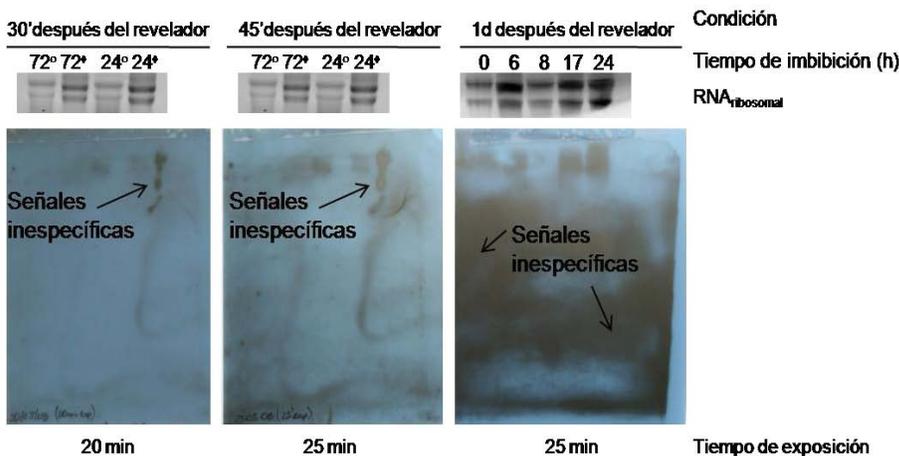


Figura 6-7. Optimización de las condiciones para detectar el transcrito por Northern Blot. ○, -0.3 MPa; ♦, -0.6 MPa.





En el otro caso se incrementó dos veces la cantidad de sonda y se mantuvieron las condiciones del fabricante (datos no mostrados), y en un tercer caso solo se incrementó la astringencia del lavado (Fig. 6-8).

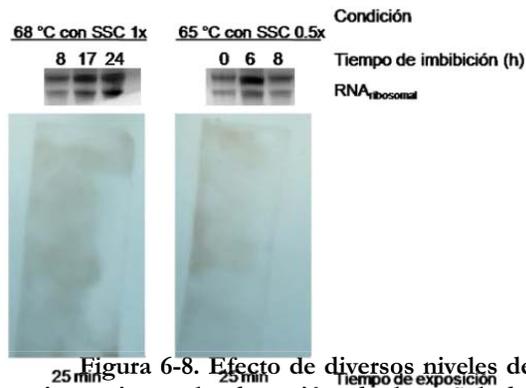


Figura 6-8. Efecto de diversos niveles de astringencia en la detección de la señal del transcrito

Como se observa en la figura 6-7, el incremento en el tiempo de incubación con el revelador inmunológico, así como el del tiempo de exposición a la película no mejoró la detección. Las modificaciones de la astringencia del lavado o de la concentración de la sonda, también arrojaron resultados inadecuados para el logro del objetivo planteado. La hibridación y detección de ácidos nucleicos por este protocolo, requiere de largos

períodos de incubación lo que dificulta la obtención de resultados definitivos. Fue por esta razón que para evitar más demora, se decidió cambiar de técnica y utilizar la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (*RT-PCR*). Y aunque ésta presenta como desventaja resultados semicuantitativos, se obtienen resultados contundentes.

### ∞ *PCR por transcripción reversa*

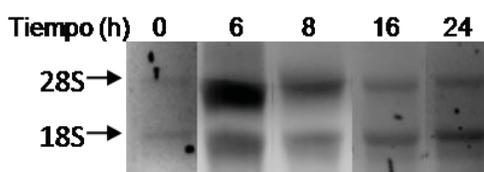
#### *DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA<sub>TOTAL</sub> PARA LAS EXTRACCIONES A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE LA GERMINACIÓN.*

Como se observa en el diagrama de la metodología, es indispensable saber que el RNA<sub>total</sub> está íntegro para poder continuar; ya que de lo contrario, hay que iniciar nuevamente el experimento. Este criterio se basa en la abundancia de los diversos tipos de RNA presentes en el RNA<sub>total</sub>. De éste, el 82% lo constituye el RNA ribosomal, un 14% -15% (aproximadamente) el RNA de transferencia y una proporción muy pequeña el RNA mensajero (2-5%), en donde se encuentra el transcrito de MIPS; es por ello que al demostrar la integridad del RNA<sub>ribosomal</sub> en el extracto de RNA<sub>total</sub>, indica que también están íntegras, las otras fracciones de RNA, ya que en caso de contaminación por RNAsas, el primero en ser degradado sería el RNA<sub>ribosomal</sub> debido a su abundancia. El resultado de la figura 6-9, muestra la integridad de los RNA<sub>ribosomal</sub> 18S y 28S indicando que el RNAm también está íntegro, por lo que se puede continuar con la siguiente fase del proyecto, el aislamiento del RNA<sub>m</sub>.





Figura 6-9. Detección de la integridad del RNA<sub>total</sub> extraído de ejes embrionarios germinados por diferentes periodos. Gel de electroforesis de agarosa al 2% (p/v) en condiciones desnaturalizantes y teñido con bromuro de etidio. Muestras de RNA<sub>total</sub> (~4µg) extraído con TRIzol®, en donde se muestran las bandas del RNAr (28 S y 18S) que revelan la integridad del RNA<sub>total</sub> a los diferentes tiempos de imbibición.



#### DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL RNA<sub>TOTAL</sub> POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA

Debido al carácter aromático de las bases púricas y pirimídicas que constituyen los ácidos nucleicos, éstos presentan un espectro de absorción de la luz ultravioleta a pH=7, exhibiendo un máximo de absorción a 260 nm. Sin embargo debido a que también las proteínas poseen estructuras aromáticas (triptófano, fenilalanina y tirosina.) que absorben a 280 nm, a los extractos de RNA<sub>total</sub> se les determina su absorción a esta longitud de onda para eliminar la posible interferencia debida a proteínas; de manera que al realizar el cálculo de la relación  $D.O.\lambda=260/D.O.\lambda=280$  se obtiene una forma de expresar la pureza del ácido nucleico, ya que un valor entre 1.8 y 2.0 de esta relación indica una muestra pura o con muy poca contaminación debida a proteínas (Luque & Herráez, 2001).

La tabla 6-2 muestra los resultados de pureza y la cantidad en µg/µL de RNA<sub>total</sub> obtenido. En ésta se observa que la pureza de las muestras es adecuada ya que la relación de absorbancia 260/280 fue del orden de 1.9 a 2, indicando una baja contaminación por proteínas. Así mismo se observa que independientemente del tiempo de germinación, la cantidad de RNA<sub>total</sub> obtenido por la técnica con TRIzol® modificada es de 1-5 µg/µL, cantidad suficiente para proseguir con el aislamiento de RNA<sub>m</sub>.

**Tabla 6-2. Pureza y concentración de los extractos de RNA<sub>total</sub> a diferentes tiempos de imbibición.**

Muestra de ejes (h de imbibición)	Pureza $\lambda_{260nm}/\lambda_{280nm}$	Concentración de RNA <sub>total</sub> (µg de RNA <sub>total</sub> /µL)
0	1.95	1.16
6	1.97	2.94
8	1.91	1.53
16	2.11	3.34
24	2.07	3.06
72*	2.08	8.28

\*Extraído con el Plant RNA Purification Reagent® de Invitrogen





### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR)

Como se puede observar en la figura 6-10, las bandas observadas corresponden al gen de ubiquitina. La expresión de este gen no se altera por efecto de la germinación, es por eso que se utilizó como control para detectar la calidad y cantidad de molde utilizado en cada reacción de PCR.

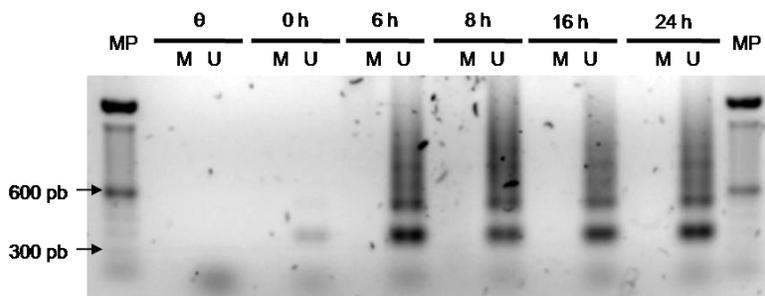


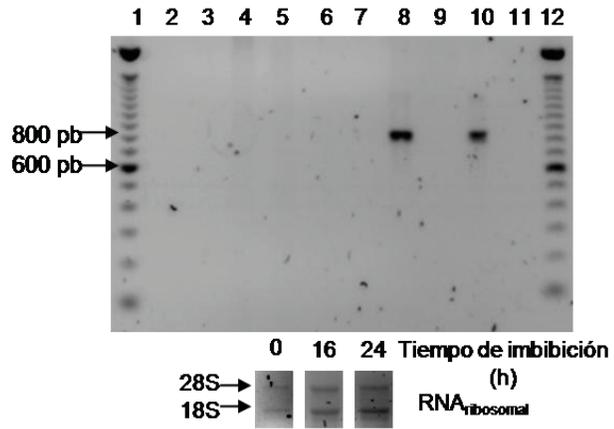
Figura 6-10. Análisis de la expresión del gen de MIPS por RT-PCR. Gel de electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x para determinar la amplificación del gen; teñido con bromuro de etidio. En el gel se cargaron 4  $\mu\text{L}$  de una reacción de PCR de 10  $\mu\text{L}$ . MP, marcador de pesos moleculares;  $\theta$ , control negativo; M, MIPS (2  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado y 15 ciclos); U, Ubiquitina (1  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado y 24 ciclos).

También se observa una menor intensidad en la banda de ubiquitina, proveniente de la muestra de ejes sin germinar indicando que la cantidad de molde utilizado fue menor que el de los otros tratamientos. Lo anterior podría ser reflejo de que la cantidad de  $\text{RNA}_m$  obtenido en este caso, fue menor que la obtenida en los otros tratamientos. Por el contrario, no se detectó ninguna señal en los carriles dónde se cargó el producto de la reacción de PCR para la amplificación del gen MIPS. A pesar de que la calidad del cDNA era adecuada para ser utilizada como molde, y de que las condiciones utilizadas en la reacción de PCR fueron las descritas en la metodología, las cuales en trabajos previos, utilizando un método diferente para el aislamiento del RNA, mostraron ser efectivas (Escamilla-Martínez, 2006). Una primera interpretación de este resultado, fue suponer que la abundancia del gen era baja y en consecuencia se incrementó 3.75 veces la concentración del templado, sin obtener resultados positivos (Fig. 6-11 carril 3-5). Otra consideración que se hizo fue que el número de ciclos de amplificación recomendados en la metodología reportada por Escamilla (2006) era insuficiente para obtener una señal, por lo que se decidió correr una segunda PCR, utilizando 2  $\mu\text{L}$  de templado y dos series de 15 ciclos cada uno. La reacción se almacenó por un periodo de 12h a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  entre uno y otro ciclo. Con estas condiciones se obtuvo la banda del fragmento de MIPS (Figura 6-11).





Figura 6-11. Exploración del número de ciclos de PCR en la detección del gen. Gel de electroforesis de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 3  $\mu\text{L}$  de una reacción de PCR de 10  $\mu\text{L}$ . Los carriles 1 y 12 son marcadores de peso molecular; carril 2 y 6 controles negativos, el primero con 15 ciclos y el último con 30 ciclos. Del carril 3-5 se utilizaron 7.5  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado para cada tiempo de imbibición y 15 ciclos. En los carriles del 6-8 y el 10, se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado para cada tiempo y dos series de 15 ciclos cada uno. Separados por un período de 12 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre uno y otro ciclo.



Para corroborar el resultado anterior se prepararon nuevas muestras de  $\text{RNA}_{\text{total}}$  y se siguió el protocolo hasta la obtención del cDNA. En esta ocasión se utilizó la Taq polimerasa platinum caracterizada por estar ligada a un anticuerpo, que mantiene inactiva a la enzima durante el ensamble de la reacción, de tal manera que se obtiene una mayor especificidad durante el alineamiento logrando una eficiencia superior a la de la enzima normal. Después de la primera serie de PCR se tomó una alícuota de la reacción y se analizó por electroforesis. Nuevamente, no se observó señal. El resto de la reacción se sometió a una segunda serie de PCR. De nuevo se analizó el producto y los resultados se muestran en la Fig. 6-12a. Con excepción de la muestra control ( $t = 0$ ) en los demás tiempos de germinación se observa el fragmento de 828 pb correspondiente a MIPS.

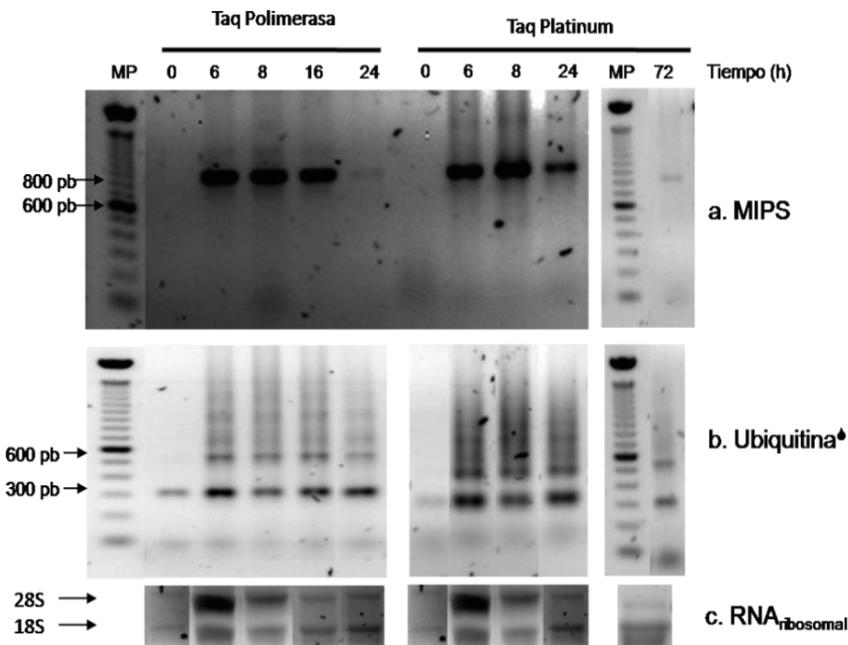


Figura 6-12. Comprobación de las condiciones de PCR en la expresión de los genes: MIPS y ubiquitina. Gel de electroforesis de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. a) 2  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado y 2X 15 ciclos. b) 1  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado y 24 ciclos. En el gel se cargaron 4  $\mu\text{L}$  del producto de la reacción de PCR. MP, Marcadores de peso molecular





Además en la figura 6-12b se muestran los resultados para el gen de ubiquitina alrededor de 300 pb y se distinguen bandas superiores a los 300 pb lo que probablemente represente un excedente en el número de ciclos. Y finalmente se nota que tanto para la amplificación de MIPS como para la de ubiquitina, se detecta una banda alrededor de los 100 pb, que posiblemente indique un exceso de los oligos en la PCR.

En la figura 6-12a se observa que la abundancia del gen se mantiene de las 6 a las 16 h de germinación. Sin embargo, aún no es posible concluir si el gen fue inducido durante la germinación, porque la intensidad de la señal de ubiquitina es menor en el tiempo cero que en el resto de los tiempos; sugiriendo que la cantidad de molde podría no ser la adecuada.

Por otra parte se realizó un experimento más en el que se duplicó el número de ciclos en un solo periodo; es decir, se realizaron 30 ciclos con las condiciones descritas en la figura 6-13 y también se muestra que los 30 ciclos en un solo periodo genera el amplificado de MIPS.

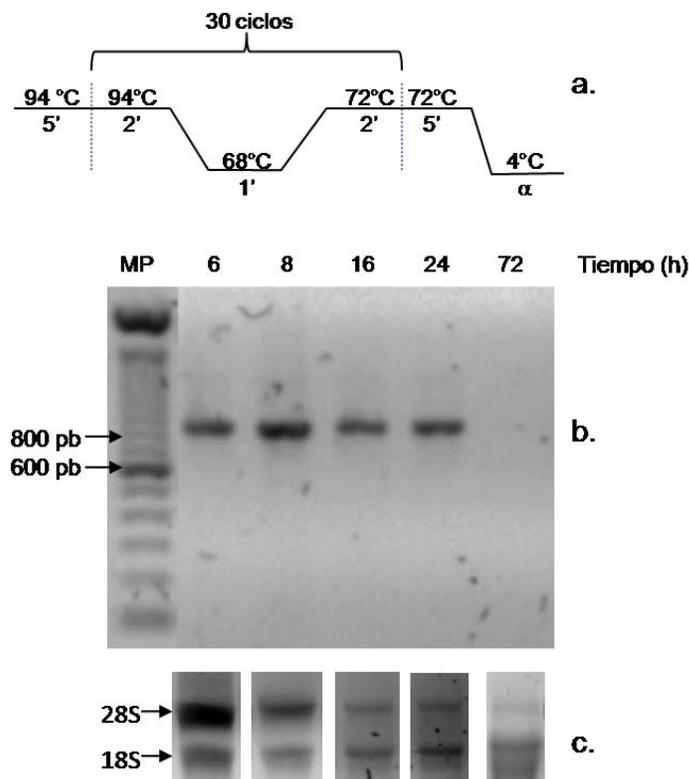


Figura 6-13. a) Condiciones modificadas para la PCR, b) Análisis de la expresión del gen de MIPS y c) RNA ribosomal

El caso de semillas sin germinar presentaron problemas en la extracción del ácido nucleico, y los resultados del análisis de la expresión fueron variables; una de las muestras presentó señal y una de las réplicas no (datos no mostrados). Para asegurar que el gen se indujo durante la germinación, fue necesario trabajar la muestra por separado. El aislamiento del RNA de los ejes tiempo cero, se realizó con un reactivo diferente al utilizado en los otros tiempos de germinación, con el que se obtuvo un rendimiento y calidad excelente; en consecuencia los resultados del RT-PCR fueron de mayor claridad.



### ∞ Optimización de las condiciones de extracción de RNA<sub>total</sub> de ejes sin germinar

Debido a que los ejes embrionarios sin germinar poseen un mayor número de macromoléculas de reserva (carbohidratos y lípidos) en comparación con las demás muestras, el RNA<sub>total</sub> para este tiempo se obtuvo utilizando otro reactivo, el Plant RNA Purification Reagent® de Invitrogen® utilizando cerca de 100 mg de tejido y 500 µL de reactivo para después proceder con la extracción, según las recomendaciones del fabricante. En la figura 6-3 se aprecia notablemente que el extracto de RNA<sub>total</sub> del tiempo cero proveniente del Plant RNA Purification Reagent® produce un aislado de RNA<sub>total</sub> de mejor calidad en todos los aspectos, con una mayor concentración que la obtenida utilizando TRIzol® (comparar fig. 6-9 vs 6-14), con integridad perfectamente definida y con una menor proporción de impurezas (Tabla 6-3).

**Figura 6-14. Integridad del RNA<sub>total</sub> de ejes sin germinar.** Gel de electroforesis de agarosa al 2% (p/v) en condiciones desnaturalizantes y teñido con bromuro de etidio. Muestras de RNA<sub>total</sub> (4µg). Obtenido con Plant RNA Purification Reagent® que muestran las bandas 28S y 18S del rRNA.



**Tabla 6-3. Pureza y concentración de los extractos de RNA<sub>total</sub> de ejes embrionarios sin germinar obtenido por dos métodos.**

Muestra de ejes (h de imbibición)	Pureza $\lambda_{260\text{nm}} / \lambda_{280\text{nm}}$	Concentración de RNA <sub>total</sub> (µg de RNA <sub>total</sub> /µL)
0 <sup>♦</sup>	1.95	1.16
0 <sup>*</sup>	2.05	7.51

Extraído con: <sup>♦</sup>TRIzol®, <sup>\*</sup>Plant RNA Purification Reagent® de Invitrogen.

En la figura 6-15 se muestran los resultados de PCR utilizando como templado cDNA proveniente de RNA<sub>m</sub> purificado del RNA<sub>total</sub> mostrado en la fig. 6-14, aislado de ejes embrionarios control. En la misma figura también se muestra el producto de la reacción con cDNA obtenido de RNA total diluido. En ninguno de los carriles en los que se analizó el producto de la reacción, ya sea que se corrió por 15 ciclos o por dos veces 15 ciclos se observó señal. Ni aún cuando la amplificación de MIPS se realizó con dos concentraciones de templado; Aunque el resultado no fue del todo contundente, pues parecería haber una ligera señal correspondiente a MIPS después de la corrida de 2X 15 ciclos en la reacción (Fig. 6-15).



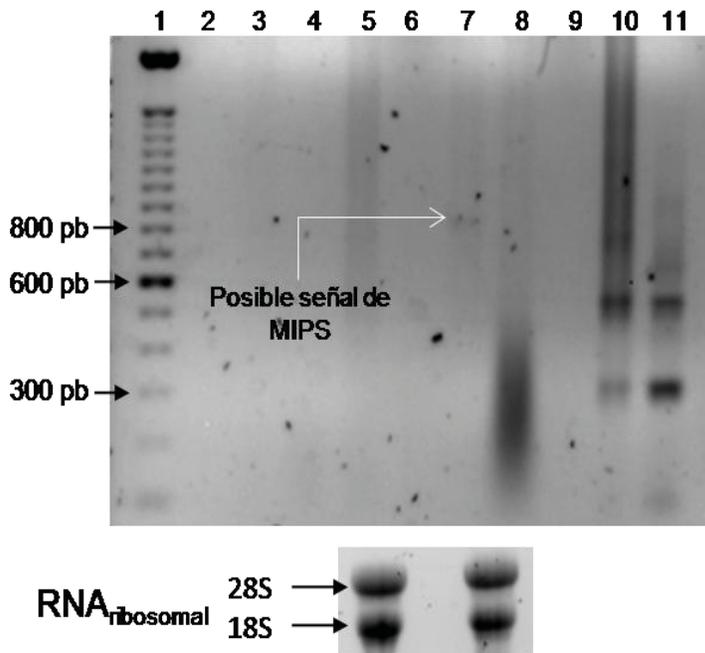


Figura 6-15. Análisis de la expresión del gen MIPS en ejes sin germinar. Gel de electroforesis de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Muestras de 4  $\mu$ L que revelan los amplificadores de MIPS y Ubiquitina para las muestras de semillas sin germinar. Carril 2, control negativo; carril 3 y 5, 2  $\mu$ L y 8  $\mu$ L de cDNA obtenido de RNAm; carril 4, 2  $\mu$ L de cDNA obtenido de RNAtotal diluido 5:50; Las reacciones anteriores se realizaron con 15 ciclos. Carril 7, 2  $\mu$ L de cDNA obtenido de RNAm, corrida 2 X 15 ciclos; carril 8, partiendo de RNAtotal diluido 5:50, 2 X 15 ciclos. Carril 10, ubiquitina utilizando 1  $\mu$ L de cDNA obtenido de RNAtotal diluido 5:50; carril 11, ubiquitina utilizando 1  $\mu$ L de cDNA obtenido de RNAm. En los experimentos de ubiquitina el PCR se corrió por 24 ciclos.

Al obtener una vez más un resultado de dudosa validez, se realizó un nuevo experimento para confirmar si la posible señal corresponde a MIPS o no. Obteniéndose los resultados mostrados en la figura 6-16; que indican la presencia de MIPS en dos de tres muestras amplificadas con 30 ciclos continuos. Pero al observar las bandas de los RNA ribosomales, se distingue que la cantidad en las primeras dos muestras es de tres a cuatro veces mayor que la de la última (carril 3, fig 6-16 b). Lo que sugiere que la cantidad de RNA<sub>m</sub> de MIPS, en este carril, es nula o tan poco perceptible que aún cuando se realizan los 30 ciclos de amplificación no se obtiene señal.

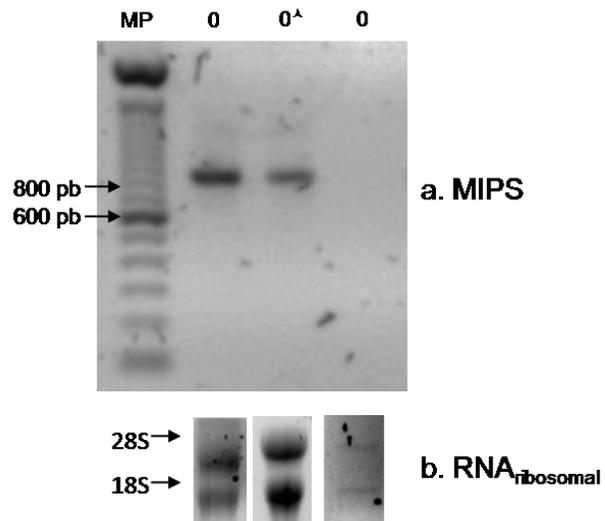


Figura 6-16. Expresión del gen MIPS en tres muestras independientes de ejes embrionarios sin germinar. Gel de electroforesis de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Muestras de 4 $\mu$ L que revelan los amplificadores de MIPS de tres muestras de ejes sin germinar diferentes. 0 $\blacktriangle$ , RNAtotal obtenido con Plant RNA Purification Reagent®.



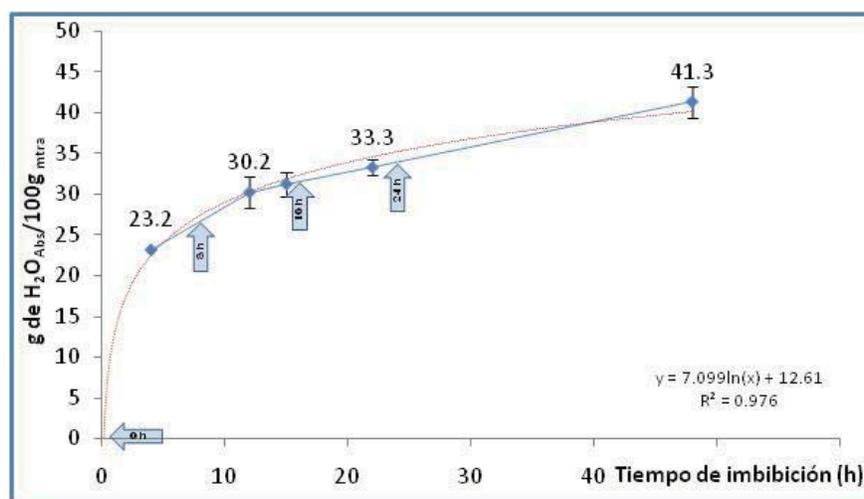


En conjunto, los resultados anteriores indican que MIPS es un gen que no se induce en el eje embrionario durante la germinación de la semilla de maíz, pero su abundancia es casi la mitad que la del gen de ubiquitina. Y mantiene el mismo nivel de expresión por lo menos las primeras 24 h.

### ∞ *Curva de imbibición*

#### GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Se ha demostrado que el nivel de hidratación de la semilla es crítico en la inducción de eventos metabólicos, por lo que en este trabajo se determinaron los niveles de hidratación a los cuales se realizó la inducción de la expresión del gen MIPS. Para lo anterior se determinó el contenido de agua de la semilla de maíz y de sus componentes: embrión y endospermo a los distintos tiempos de germinación



Gráfica 6-1. Curva de imbibición de semillas de maíz variedad Chalqueña, utilizando agua bidestilada como medio de imbibición. Las flechas indican los tiempos de germinación empleados para el análisis de la expresión del gen.

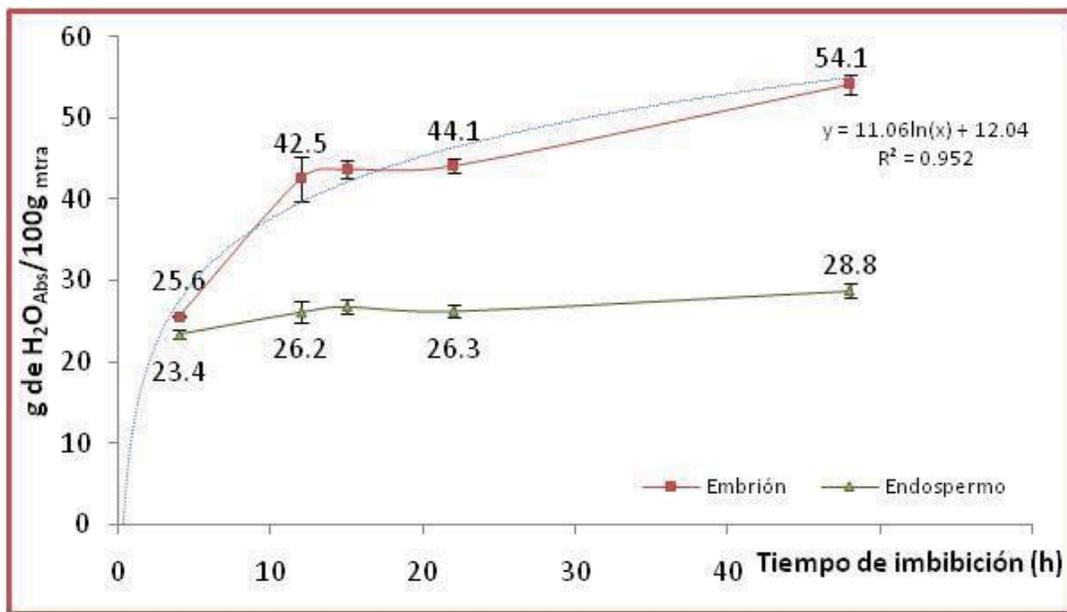
Como se observa en la gráfica 6-1, las semillas de maíz absorbieron la mayor cantidad de agua durante las primeras 12 h alcanzando más de 30 g de H<sub>2</sub>O absorbida/100 g<sub>mtra</sub>; mientras que en las siguientes 12 h la absorción de agua se mantuvo casi constante. En este periodo solo se absorbieron de 1 a 2 g. Posterior a las 24 h, de nuevo la velocidad de hidratación de la semilla se incrementó, aunque a menor velocidad que en las primeras 12 h de imbibición, hasta alcanzar los 41.3 g de H<sub>2</sub>O absorbida/100 g<sub>mtra</sub>. a las 48h. A este tiempo la germinación ha terminado pues





ya protruyó la radícula. La distribución del agua absorbida por la semilla, entre el endospermo y el embrión se muestra en la gráfica 6-2.

Se observa que en ambas regiones de la semillas, nuevamente la mayor absorción de agua se da en las primeras 12 h; sin embargo en la curva de imbibición del endospermo se aprecia que por las siguientes 24 h, este tejido ha alcanzado la máxima hidratación, debido a que el incremento en la absorción de agua en este periodo fue de tan solo un 2%.



Gráfica 6-2. Curvas de imbibición de las principales estructuras que constituyen a la semilla (embrión y endospermo). Utilizando agua bidestilada como medio de imbibición.

Para la curva de imbibición del embrión se distingue claramente que la humedad alcanzada en las primeras 12 h es un poco menos (42.5%) del doble de la obtenida para el endospermo (26.2%) y por las siguientes 12 h la hidratación se mantiene casi estable con un ligero aumento (~2%) que posteriormente se incrementa en mayor proporción al pasar las 24 h, obteniendo así una humedad del 54%.

Tomando en cuenta los resultados de la figura 6-16 y los del gráfico 6-2, se concluye que el gen MIPS se expresa en contenidos de humedad de entre 25-42 % de contenido de agua.

Germinación de semillas en estrés.

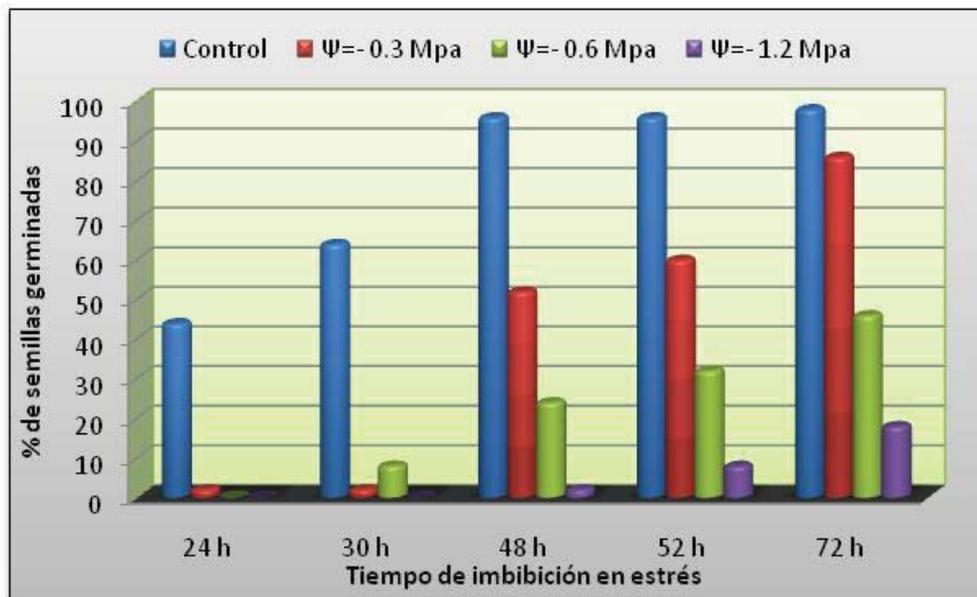
Como se mencionó anteriormente el inositol se encuentra involucrado en varias rutas metabólicas de gran importancia para el desarrollo y crecimiento de la planta, sin embargo las





condiciones de germinación de las semillas de maíz suelen ser muy variables y drásticas a lo largo del planeta, lo que nos llevó a investigar el comportamiento del gen en condiciones de estrés hídrico. Por lo que otra estrategia para evaluar la importancia del gen MIPS fue la de conocer si su expresión se modifica o no al variar las condiciones de germinación como en este caso, bajo condiciones de estrés hídrico. Es por ello que se realizaron experimentos previos que permitieron elegir las condiciones y el tiempo de imbibición en el cual se evaluara la expresión del gen.

Como se mencionó anteriormente en el capítulo 3 de la metodología, se utilizaron tres condiciones de estrés, en donde la disponibilidad de agua disminuyó a medida que el potencial osmótico se incrementó.



Gráfica 6-3. Germinación de semillas en estrés por sequía.

El gráfico 6-3 muestra de manera cuantitativa el retraso de la germinación al aumentar la intensidad del estrés; ya que a las 30 h del lote control (“agua”) el 60% de la población ha germinado y a las 48 h el 98% de la población ya ha germinado. Mientras que para los lotes de semillas en estrés con -0.3, -0.6 y -1.2 MPa el 50% de la población germinada se alcanza a las 48, 52 y >72 h, respectivamente.

La figura 6-17 muestra de manera cualitativa el resultado del progreso de la germinación durante la imbibición en condiciones de estrés. Así también, se distingue como se retrasa la germinación a medida que se intensifican las condiciones de estrés. A mayor potencial hídrico el número de semillas germinadas es menor que en el control.



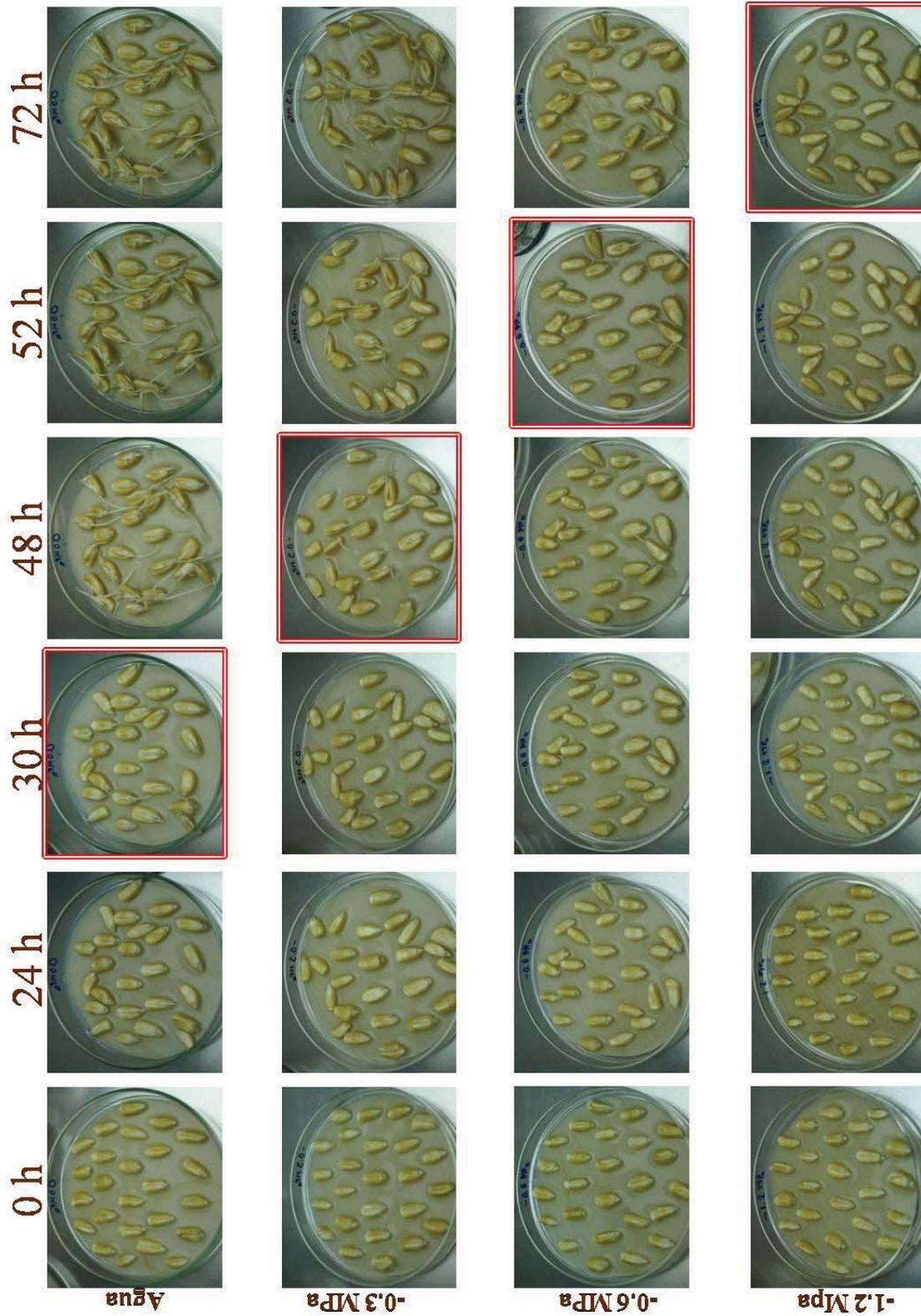
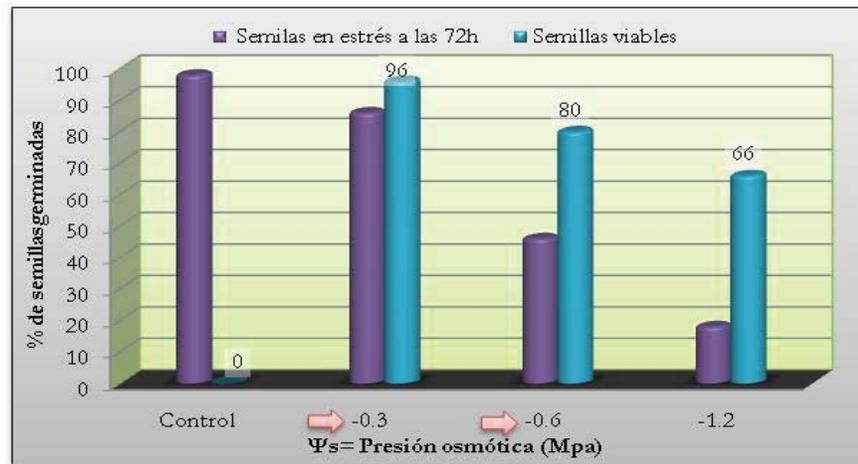


Figura 6-17. Germinación de semillas en estrés a diferentes tiempos de imbibición, empleando PEG 6000 como agente estresante y generador de las diferentes presiones osmóticas ( $\Psi_s$ , MPa). Las imágenes marcadas muestran el retraso de la germinación durante el estrés.



Una vez que transcurrieron las 72 h de imbibición en estrés, las semillas se enjuagaron y se transfirieron a una caja con agua, para observar si las semillas no germinadas en estrés aún eran viables. Las semillas del lote tratado a una  $\Psi_s$  de -0.3 MPa lograron recuperarse y germinó un 10% más de la población, indicando que el 96% del lote era viable. Para las dos condiciones restantes (-0.6 y -1.2 MPa) se obtuvo un 80 y 66% de viabilidad en los lotes. Debido a que en los lotes tratados a -0.3 y -0.6 MPa aún conservan un elevado porcentaje de viabilidad, fue que se decidió trabajar en estas condiciones el análisis de la expresión del gen.

**Gráfica 6-4.** La primera serie representa el % de semillas germinadas a las 72 h de la imbibición en estrés para las diferentes condiciones osmóticas. La segunda serie muestra el % de semillas germinadas después de tener 72 h en estrés y 24 en agua. Las flechas indican las condiciones usadas para el análisis de la expresión del gen.



### Expresión de MIPS durante la germinación en estrés hídrico.

La extracción de RNA<sub>total</sub> se realizó con TRIzol® y Plant RNA Purification Reagent® de Invitrogen, con lo que se obtuvieron concentraciones y purezas adecuadas (Tabla 6-4) que permitieron continuar con la técnica.

**Tabla 6-4.** Pureza y concentración de los extractos de RNA<sub>total</sub> de ejes embrionarios en condiciones de estrés hídrico.

Muestra de ejes embrionarios en estrés (h de imbibición)	Pureza $\lambda_{260nm} / \lambda_{280nm}$	Concentración de RNA <sub>total</sub> ( $\mu\text{g de RNA}_{total} / \mu\text{L}$ )
24 h a -0.3 MPa <sup>♦</sup>	2.00	3.69
48 h a -0.3 MPa <sup>*</sup>	2.09	13.25
48 h(-0.3 MPa) / 24 h (H <sub>2</sub> O) <sup>♦</sup>	1.79	5.09
24 h a -0.6 MPa <sup>♦</sup>	1.95	2.86
48 h a -0.6 MPa <sup>*</sup>	2.06	14.28
48 h(-0.6 MPa) / 24 h (H <sub>2</sub> O) <sup>♦</sup>	1.88	3.72

Extraído con: <sup>♦</sup>TRIzol®, <sup>\*</sup>Plant RNA Purification Reagent® de Invitrogen.





Se realizó el RT-PCR de las muestras tratadas bajo condiciones de estrés. En ellas se observó que con los primeros 15 ciclos de amplificación, el gen en estudio no presentó expresión durante la exposición al estrés, independientemente del tiempo expuesto (24 o 48 h); pero se aprecia que, una vez que los ejes estresados se incuban bajo condiciones óptimas de germinación la expresión se incrementó, ya que con el simple hecho de amplificar por 15 ciclos se observan bandas de MIPS (Fig.6-18a, 48 h/24 h). En la figura 6-18b correspondiente a la expresión del gen ubiquitina se observa que la cantidad trabajada de cDNA fue constante, por lo que no se tiene duda del resultado obtenido. Por otro lado, nuevamente se vuelven a ver bandas superiores a los 300 pb así como un exceso de oligonucleótidos para ambas reacciones (MIPS y Ubiquitina), estas últimas observándose como manchas de intensidad variable alrededor de los 100 pb.

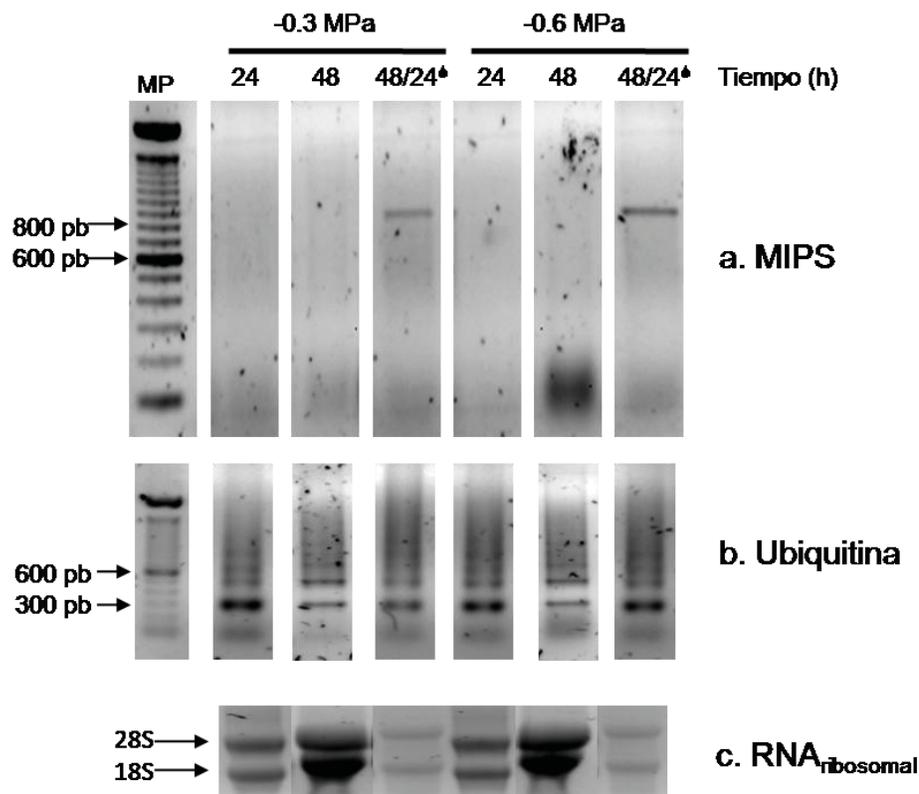


Figura 6-18. Expresión del gen MIPS durante la germinación en estrés hídrico y durante su recuperación, empleando 15 ciclos en la reacción. Gel de electroforesis de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. 4  $\mu$ L del producto de la reacción se aplicaron por carril. La cantidad de templado utilizado fue 2  $\mu$ L para la reacción de MIPS y 1  $\mu$ L para la reacción de ubiquitina. Carril 4 y 7 muestran bandas de MIPS después de la recuperación.



Sin embargo, se realizó un segundo experimento con 30 ciclos continuos de amplificación (al igual que las muestras germinadas sin estrés) para que nos permitiera diferenciar si había poca abundancia o en realidad había ausencia del gen. Este último experimento reveló señal de MIPS para todas las muestras tratadas bajo estrés (Fig. 6-19); Sin embargo, la intensidad de la banda a las 48 h respecto con la de las 24 h en estrés es mucho menor, aún cuando la concentración del RNAtotal fue mayor que para los otros tratamientos. Transcurridas 24 h de recuperación de la semilla del estrés, en el eje se detectó un incremento de señal de casi el doble respecto a las 48 en estrés y ligeramente mayor si se le compara con las de 24 h en estrés. La expresión del gen MIPS durante la recuperación del estrés, también fue ligeramente mayor que la detectada a las 24 h de germinación.

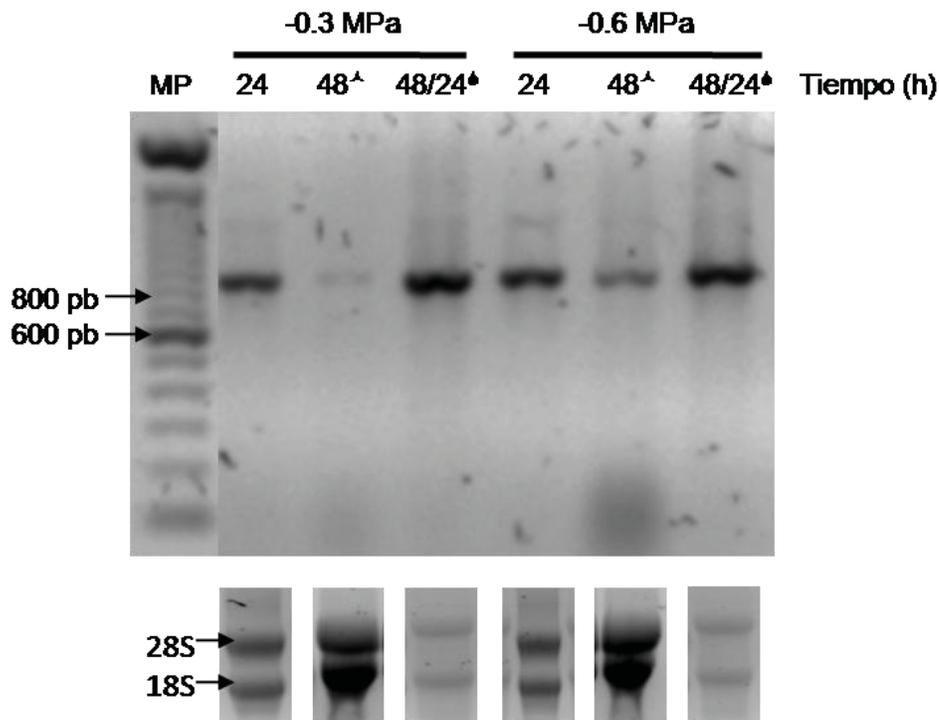


Figura 6-19. Expresión del gen MIPS durante la germinación en estrés hídrico y durante su recuperación, empleando 30 ciclos en la reacción. Gel de electroforesis de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Muestras de 4 $\mu$ L que revelan los amplificadores de MIPS para los diferentes tiempos de imbibición en condiciones de estrés hídrico. <sup>^</sup>Indica que el RNAtotal fue obtenido con Plant RNA Purification Reagent®. <sup>^</sup>Indica que estuvo 24 h en imbibición con agua.



## Capítulo 7

# Discusión

**L**a germinación de las semillas involucra numerosos procesos celulares, incluyendo transducción de señales, biosíntesis de pared celular, formación de membranas, transporte de hormonas anclaje de proteínas a la superficie celular, tráfico de proteínas y respuestas a estrés biótico y abiótico. En todos los procesos anteriores, el inositol (Ins) y sus derivados fosforilados juegan un papel muy importante. A pesar de la importancia de este metabolito, solo se encuentra documentada una vía para su biosíntesis de *novio* y la etapa limitante de la vía metabólica está dada por la enzima mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS). Lo anterior sugiere que la actividad de la enzima MIPS pudiera ser importante durante la germinación de semillas. Con la finalidad de explorar esta posibilidad, en este trabajo se estudió la expresión del gen de la MIPS durante la germinación de ejes de maíz. Los resultados muestran que durante la germinación, en el embrión de maíz se expresa una secuencia de 829 pb, que fue clonada y secuenciada. Su secuencia presentó una elevada identidad con las secuencias de MIPS de otros organismos (83-98%). El mayor porcentaje de homología fue con plantas monocotiledóneas, confirmando así que el fragmento corresponde al de una enzima MIPS. En un análisis filogenético realizado (Apéndice 3), se aprecia la gran variabilidad de enzimas MIPS

---





que existen, incluyendo la de algunas isoenzimas como la MIPS2 de *Arabidopsis thaliana* y lo que principalmente destaca es que comparten en común el sitio catalítico de unión al cofactor de  $\text{NAD}^+$ , el cual es esencial para la función de la enzima. En la secuencia de DNAr obtenida se tuvo una homología del 98% con la MIPS2 (de embriones de maíz), y la diferencia más relevante fue en dos pares de bases que repercuten en la traducción a dos residuos de aminoácidos (ácido aspártico por asparagina y alanina por treonina), estas diferencias se encontraron en las regiones no conservadas de la proteína, lo que sugiere que la enzima en estudio podría corresponder a una isoenzima de MIPS localizada en embriones, muy probablemente la isoforma 2. En estudios anteriores se ha demostrado que existen múltiples genes que codifican para MIPS, como ejemplo están siete secuencias en maíz (Raboy, 2000), tres en *Arabidopsis thaliana* (Mitsubishi, y otros, 2008), al menos cuatro en *Glycine max* (Hegeman, Good, & Grabau, 2001), dos en *Cicer arietinum* (Kaur, Shukla, Yadav, Chattopadhyay, & Majee, 2008) y por lo menos tres copias en *Sesamum indicum* L. (Chun, Jin, Lee, Yi, Hyung, & Kang, 2003); varios investigadores coinciden en que la presencia de múltiples genes de MIPS en las diferentes especies de plantas indica que puede ser empleada para adaptar su expresión diferencial y espacial a determinadas funciones fisiológicas y del metabolismo. Evidencia que apoya esta propuesta es la reportada recientemente en arroz (Majee, y otros, 2004). El gen PINO1 aislado de arroz silvestre (*Portesia coarctata*) tolerante al estrés salino, codifica para una proteína que mantiene su actividad aun a altas concentraciones de sal, mientras que RINO1 aislado de *Oryza sativa*, arroz no tolerante al estrés, codifica para una proteína que es desnaturalizada a concentraciones altas de sal. La diferencia entre estas dos proteínas es que la primera carece de los aminoácidos 174-210, que presenta la segunda. En este caso se observa que si bien el estrés no modifica la expresión del gen, la existencia de genes homólogos le permite a la planta adaptarse a diversos ambientes.

La expresión del gen durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, no se pudo detectar mediante la hibridación Northern Blot. Este tipo de resultados se han reportado cuando se estudia, mediante esta metodología, genes de baja abundancia (Nims, Dubois, Roberts, & Walker, 2006). o bien cuando se trata de genes homólogos y las condiciones de hibridación no se optimizaron. Esta última posibilidad no se pudo explorar ya que la metodología empleada para detectar la hibridación fue poco amigable. Por lo que se decidió analizar la expresión de MIPS por RT-PCR. Debido a que con el mismo lote de cDNA, el gen de ubiquitina podía ser visualizado utilizando 2  $\mu\text{l}$  de templado, mientras que la detección del gen MIPS no se logró ni utilizando 7  $\mu\text{L}$  de templado, concluimos que el gen MIPS era de baja abundancia de cuando

---





menos 3.5 veces menor que la del de la ubiquitina. Sin embargo la anterior conclusión es válida siempre y cuando la eficiencia de amplificación para ambos genes haya sido similar. Posteriormente, el transcrito del gen de MIPS fue detectado satisfactoriamente mediante esta técnica en los cuatro tiempos de germinación estudiados (6, 8, 16, y 24 h; en condiciones ideales de germinación). El resultado anterior se logró utilizando 2  $\mu$ l de cDNA como templado, y 30 ciclos de amplificación, mientras que para ubiquitina el gen de referencia, se utilizaron 24 ciclos de amplificación y 1  $\mu$ l de templado. De nuevo, los resultados sugieren que la abundancia del gen MIPS era menor que el de la de ubiquitina por al menos 2.5 veces. Los resultados también mostraron un patrón de expresión entre las 6 y 24 h germinación, período que coincide con la fase 2 de germinación. Este comportamiento pudiera deberse al hecho de que en *Arabidopsis thaliana* (Johnson & Sussex, 1995) y en levadura (Graves & Henry, 2000), (Loewy & Henry, 1984), la expresión del gen se regula negativamente por la presencia de inositol, el producto final de la MIPS. Durante este lapso, es probable que el pozal de MIP esté mantenido, principalmente, por la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos durante la señalización (Boss, Davis, Im, Galvão, & Perera, 2006), y posiblemente por los derivados de la hidrólisis de la fitina por la fitasa (Loewus & Murthy, 2000). Aunque la contribución de este último proceso a mantener los niveles del pozal de MIP debería ser pequeña o nula, pues la mayor inducción del gen de fitasa se realiza a las 48 h de iniciada la germinación (Maugenest, Martinez, & Lescure, 1997). O bien, a que la degradación de mio-inositol por la vía oxidativa para formar ácido glucurónico y pentosas no es importante durante esta etapa del desarrollo de la planta (Loewus F. A., 2006), aún cuando la biosíntesis de polisacáridos para la formación y remodelación de la pared celular sea muy activa durante este período (Howell, y otros, 2009). Los resultados obtenidos al utilizar como templado el cDNA proveniente de ejes sin germinar no permite distinguir entre si el gen MIPS es constitutivo o inducido durante la germinación. Aunque también es probable que el patrón variable de la expresión que se observa en los ejes embrionarios de semillas secas, se deba a la contaminación por tejido escutelar debido a que la obtención de los ejes se realiza de forma manual y es muy probable que residuos de este tejido aún estuvieran presentes durante el estudio. En trabajos realizados por Yoshida y colaboradores mostraron que los transcritos de RINO1 (MIPS del arroz), fueron primero detectados en células apicales del embrión, pero a medida que la semilla se desarrolló, lo transcritos aparecieron después en escutelo y aleurona (Yoshida K. &, 1999) y en trabajos en *Arabidopsis thaliana* la presencia de MIPS predomina en el citosol de células





de endospermo (Mitsuhashi, y otros, 2008), por lo que la contaminación por escutelo podría revelar falsos positivos en la inducción del gen en eje embrionario de maíz sin germinar.

En cuanto al efecto de germinar la semilla en condiciones de estrés similares a las que las semillas podrían estar sometidas cuando son sembradas en campo, los resultados indican que tanto la germinación como la expresión del gen se ven afectados por el estrés hídrico. La disminución en la disponibilidad de agua, menor potencial de agua por la adición de PEG, retrasa la germinación. Sorprendentemente, en estas condiciones de estrés hídrico, el gen se expresa durante las primeras 24 h de germinación y posteriormente, no se detecta señal. Sin embargo, durante la recuperación del estrés el gen MIPS se expresa de nuevo y parecería que su expresión, es ligeramente mayor que durante la germinación en condiciones óptimas de germinación. Por otro lado, en publicaciones anteriores sobre la expresión de MIPS en estrés se ha observado que los niveles del transcrito son muy variables. En algunos sistemas el efecto del estrés sobre los niveles de expresión de MIPS se ve inducido por el aumento en la concentración de sal (Ishitani, 1996), mientras que en otras fuentes vegetales el aumento en la concentración de sal lo reprime (Chun, Jin, Lee, Yi, Hyung, & Kang, 2003); en algunos más como es el caso de *Oryza sativa*, el efecto sinérgico de la concentración de azúcares más ABA inducen la expresión del gen durante las primeras 4 horas pero después de este tiempo el nivel de expresión disminuye (Yoshida, Fujiwara, & Naito, 2002) y este patrón es similar al observado en *Passiflora edulis* (Abreu & Aragao, 2007) donde el estrés fue una combinación entre luz y temperatura; finalmente en un caso de estrés por deshidratación en garbanzo la expresión de CaMIPS2 se induce en mayor proporción que la CaMIPS1 (Kaur, Shukla, Yadav, Chattopadhyay, & Majee, 2008) y la variabilidad de los resultados en los sistemas de plantas que se han estudiado bajo estímulos diferentes ya sea estrés osmótico, luz, temperatura o elicitores bióticos reflejan o muestran que existen cambios rápidos en el metabolismo del Ins, lo cual le permite a la planta u organismo contender con el medio que lo rodea, sin importar la etapa en la que se encuentre o el órgano que se esté afectando.





## *Capítulo 8*

# Conclusiones

- ♣ La enzima estudiada es una isoenzima de MIPS, probablemente la MIPS2 de maíz.
- ♣ Durante la germinación de semillas y ejes de maíz, ya sea en condiciones óptimas o durante la recuperación del estrés hídrico, el gen MIPS se expresa.
- ♣ Durante la germinación de ejes, en condiciones óptimas, el transcrito de MIPS se expresa de manera constitutiva y con baja abundancia.
- ♣ Durante la germinación de semillas en estrés por sequía, la abundancia del transcrito de MIPS decrece después de 24 h.
- ♣ Durante la recuperación del estrés, la abundancia del transcrito de MIPS incrementa.





## *Capítulo 9*

# Perspectivas

- ⚙ Confirmar la identidad de la isoenzima de MIPS mediante el aislamiento y secuenciación del transcrito completo.
- ⚙ Estudiar el patrón de expresión de MIPS durante la fase post-germinativa.
- ⚙ Analizar la expresión del transcrito durante la germinación de ejes y/o semillas de otros cultivares de maíz





## Capítulo 10

# Bibliografía

Abreu, E., & Aragao, F. (2007). Isolation and characterization of a myo-inositol phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Annals of Botany*, *99*, 285–292.

Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, *9*, 1055-1066.

Bewley, J. D., & Black, M. (1994). *Seeds. Physiology of development and germination* (Segunda edición ed.). New York, E. U. A.: Plenum Press.

Boss, W. F., Davis, A. J., Im, Y. J., Galvão, R. M., & Perera, I. (2006). Phosphoinositide Metabolism: Towards an Understanding of Subcellular Signaling. En A. L. Majumder, & B. Biswas (Edits.), *Biology of Inositols and Phosphoinositides* (Vol. 39, págs. 181-204). Holanda: Springer.

BRENDA, B. E. (2007). *BRENDA The Comprehensive Enzyme Information System*. Recuperado el Septiembre de 2007, de <http://www.brenda-enzymes.info/>, 2007.

Chun, J.-A., Jin, U. H., Lee, J., Yi, Y. B., Hyung, N., & Kang, M. (2003). Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta*, *216*, 874–880.

---





Escamilla-Martínez, E. E. (2006). Selección de tejido para la clonación del transcrito de mio-inositol 1-fosfato sintasa. *Tesis de licenciatura*. D. F., México: UNAM.

FIRA. (1 de Octubre de 1998). Oportunidades de desarrollo del maíz mexicano. Alternativas de competitividad. *Boletín informativo*, XXX (309).

Graves, J. A., & Henry, S. (2000). Regulation of the Yeast INO1 Gene: The Products of the INO2, INO4 and OPI1 Regulatory Genes Are Not Required for Repression in Response to Inositol. *Genetics*, 154, 1485-1495.

Hegeman, C. E., Good, L. L., & Grabau, E. A. (2001). Expresión of D-myo inositol-3 phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 125, 1941-1948.

Howell, K. A., Narsai, R., Carroll, A., Ivanova, A., Lohse, M., Usadel, B., y otros. (2009). Mapping Metabolic and Transcript Temporal Switches during Germination in Rice Highlights Specific Transcription Factors and the Role of RNA Instability in Germination Process. *Plant Physiology*, 149, 961–980.

Ishitani, M. (1996). Coordinate transcriptional induction of myo inositol metabolism during environmental stress. *Plant journal*, 9, 537-548.

Johnson, M. D., & Sussex, I. M. (1995). 1L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 107, 613-619.

Kaur, H., Shukla, R. K., Yadav, G., Chattopadhyay, D., & Majee, M. (2008). Two divergent genes encoding L-myo-inositol 1 phosphate synthase1 (CaMIPS1) and 2 (CaMIPS2) are differentially expressed in Chickpea. *Plant, Cell and Environment*, 1-16.

Loewus, F. A. (2006). Inositol and Plant Cell Wall Polysaccharide Biogenesis. En B. o. Phosphoinositides, & A. L. Biswas (Ed.).

Loewus, F., & Murthy, P. (2000). Myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150, 1-19.

Loewy, B. S., & Henry, S. A. (1984). The INO2 and INO4 loci of yeast are pleiotropic regulatory genes. *Molecular Cell Biology*, 4, 2479-2485.

Luque, J., & Herráez, A. (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.* ( Primera edición ed.). Madrid, España: Ediciones Harcourt.





Majee, M., Maitra, S., Dasidar, K. G., Pattnaik, S., Chatterjee, A., Hait, N. C., y otros. (2004). A novel salt-tolerant L-myo Inositol-1-phosphate synthase from *Portesia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (27), 28539-28552.

Martínez-Silva, A. V. (2006). Clonación de genes inducidos durante la germinación del maíz. *Tesis de maestría*. D. F., México: UNAM.

Matsuoka, Y. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99 (9), 6080-6084.

Maugenest, S., Martinez, I., & Lescure, A.-M. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochemical Journal* (322), 511–517.

Mitsubishi, N., Kondo, M., Nakaune, S., Ohnishi, M., H. M., Hara-Nishimura, I., y otros. (2008). Localization of myo-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 59 (11), 3069-3076.

Moreno, C. P. (1996). *Vida y obra de granos y semillas*. (Primera edición ed.). D. F., México: Fondo de Cultura Económica.

Nims, E., Dubois, C. P., Roberts, S., & Walker, E. L. (2006). Expression profile of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 8, 385-394.

Raboy, V. &. (2000). Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol*, 124, 355-368.

SAGARPA, (. d. (14 de Julio de 2008). Productores de maíz y comercializadores de insumos contribuyen a la seguridad alimentaria. *Boletín de prensa (135/08)*. Ciudad de México, D. F., México.

SIAP, S. d. (2007). *Producción Agrícola. Año agrícola OI+ PV 2007*. Ciudad de México.

SIAP, S. d. (2007). *Sistemas producto*. Recuperado el Septiembre de 2008, de [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_sispro/index.php?portal=maiz](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_sispro/index.php?portal=maiz)

Vázquez, Y. C. (1997). *La reproducción de las plantas: semillas y meristemos*. (Primera edición ed.). D. F., México: Fondo de Cultura Económica.

Vollbrecht, E., & Sigmon, B. (2005). Amazing grass: developmental genetics of maize domestication. *Biochemical Society Transactions*, 33, 1502-1506.

Xolalpa, J. (2007). *Identificación del gen codificante de la mio inositol 1-fosfato sintasa*. Informe de LABDEA, D. F.





Yoshida, K. &. (1999). Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol 1-phosphate synthase and phytin containing particles during seed development in rice. *Plant physiology*, 119, 65-72.

Yoshida, K. T., Fujiwara, T., & Naito, S. (2002). The synergistic effects of sugar and abscisic acid on myo-inositol-1-phosphate synthase expression. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 114, 581–587.





# Capítulo 11

## Apéndices

### ∞ *Apéndice 1 Disoluciones y Amortiguadores*

#### *AISLAMIENTO DE RNA<sub>TOTAL</sub>*

##### **ACETATO DE AMONIO 10M (50 ML)**

Calentar 38.54 g de la sal y disolverla en la mínima cantidad de agua-DEPC, calentar casi a ebullición para disolver. Esterilizar por filtración con material previamente esterilizado. Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz

##### **AGUA-DEPC (DIETILPIROCARBONATO)**

Por cada 3 L de agua bidestilada adicionar 1.5 mL de dietilpirocarbato (DEPC). Agitar toda la noche y esterilizar al día siguiente por 1 h. (0.2 mL de DEPC/100 mL de agua)





---

*DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA<sub>TOTAL</sub> POR ELECTROFORESIS.*

---

**AMORTIGUADOR MAE 10x (200 mL)**

MOPS 0.4M, pH 7:	18.494 g
Acetato de sodio 0.1M:	1.6407 g
EDTA 10mM, pH 8:	10 mL
Agua-DEPC:	c. b. p. 200 mL

Disolver en 80 mL de agua-DEPC los primeros dos reactivos y ajustar el pH a 7. Por separado preparar el EDTA a 100 mM (0.9305 g) y ajustar el pH a 8. Adicionar 10 mL de la solución de EDTA a los 80 mL de la disolución inicial. Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

**AMORTIGUADOR MAE 1x (200 mL)**

Disolver 20 mL de la solución de MAE 10x en 180 mL de agua-DEPC.

**AMORTIGUADOR DE CARGA RLB 4x (RNA LOADING AMORTIGUADOR) DESNATURALIZANTE. (4 mL)**

Glicerol 80%:	0.4 mL
Formamida desionizada al 100%:	2.2 mL
Formaldehído al 37%:	0.8 mL
MAE 10x:	0.5 mL
Azul de bromofenol al 1%:	100 µL
Ciano-xileno FF al 1%:	100 µL

Por cada 3 µL de muestra adicionar 1 µL de amortiguador.

*DETERMINACIÓN DE DNA EN GEL DE AGAROSA AL 1% POR ELECTROFORESIS.*

Gel de agarosa	(30 mL)
Agarosa	0.30 g
Amortiguador TAE 1x	30 mL
Ficol (6x)	1 µL de ficol por cada 5 µL de muestra



**AMORTIGUADOR TAE 50x (500 mL)**

Tris	121 g
Ácido acético glacial	22.55 mL
EDTA (0.5 M, pH 8)	50 mL (9.38 g)

**AMORTIGUADOR TAE 1x (220 mL)**

En una probeta de 250 mL preparar la disolución agregando 4.4 mL del Amortiguador TAE 50x y adicionar agua bidestilada hasta aforar a 220 mL aprox. Tomar 30 mL para la preparación del gel.

*HIBRIDACIÓN NORTHERN BLOT*

EDTA 200 mM a pH 8, estéril (25 mL)	1.8612 g
SDS 20% (p/v, 50 mL)	10 g

**AMORTIGUADOR SSC 20X A PH 9.5 (500ML)**

NaCl 3 M	86.66 g
Citrato de sodio 0.3 M	44.116 g

**AMORTIGUADOR DE LAVADO A PH 7.5 (250 ML)**

Ácido maléico 0.1 M	5.805 g
NaCl 0.15 M	4.383 g
Tween 20, 0.3 % (v/v)	7.5 mL

Disolver el ácido maléico y el NaCl en 100 mL de agua estéril y ajustar el pH con lentejas de NaOH, adicionar el Tween 20 dejando resbalar por las paredes y mezclar perfectamente. Aforar al volumen. Almacenar a TA.

**AMORTIGUADOR DE ÁCIDO MÁLEICO A PH 7.5 (250 ML)**

Ácido maléico 0.1 M	5.805 g
NaCl 0.15 M	4.383 g

Disolver el ácido maléico y el NaCl en 100 mL de agua estéril y ajustar el pH con lentejas de NaOH. Aforar al volumen. Almacenar a TA.





---

**AMORTIGUADOR DE DETECCIÓN A PH 9.5 (250 ML)**

Tris-HCl 0.1M	25 mL de Tris-HCl 1M
NaCl 0.1 M	1.461 g

Disolver los reactivos en agua estéril y ajustar el pH con lentejas de NaOH. Aforar al volumen. Almacenar a TA.

**SOLUCIÓN DE BLOQUEO 1X**

Diluir en amortiguador de ácido maléico la solución de bloqueo (vial 6) en proporción 1:10. Preparar la solución por cada trabajo.

**SOLUCIÓN ANTICUERPO**

Centrifugar previo a cada uso el anticuerpo-digoxigenina-AP (vial 4) a 10,000 rpm por 5 min. Pipetear la cantidad necesaria cuidadosamente de la superficie y diluir en solución de bloqueo 1X en proporción 1:10,000. Prepararlo antes de su uso o almacenar a 4 °C máximo 12 h.

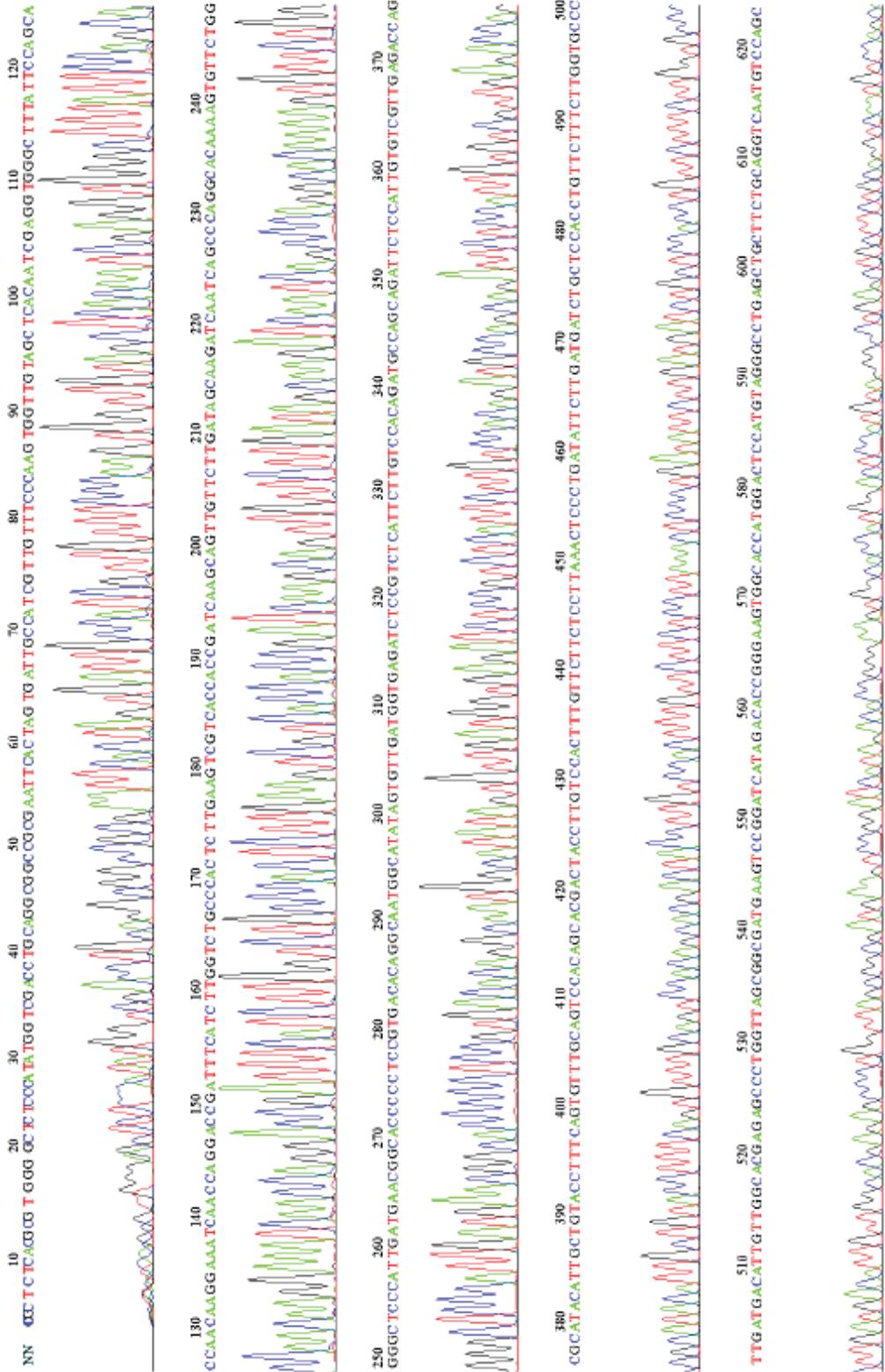




Apéndice 2 Gráfico de calidad

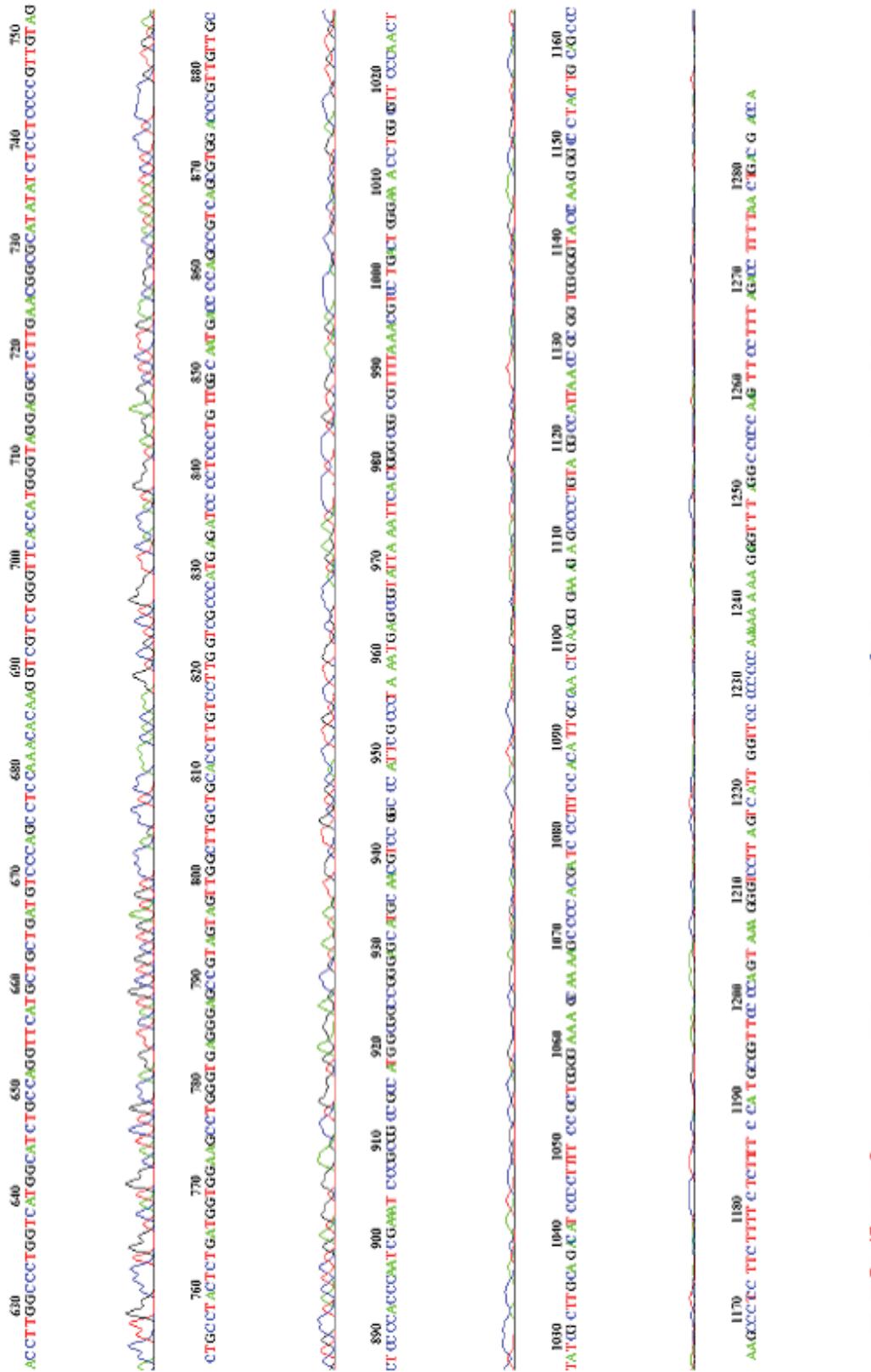


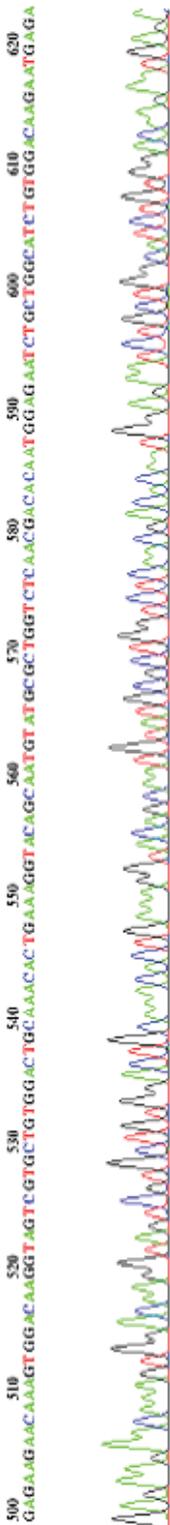
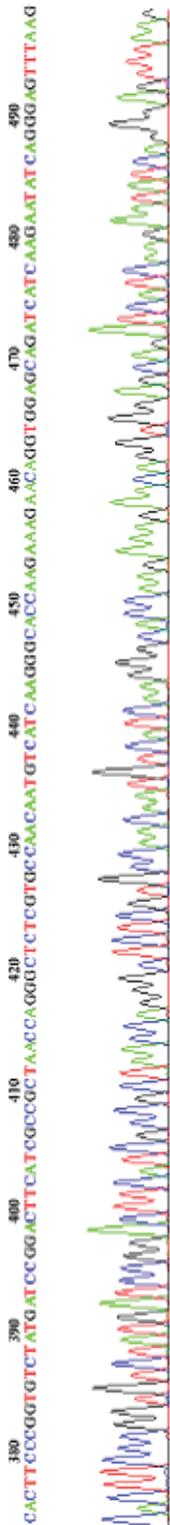
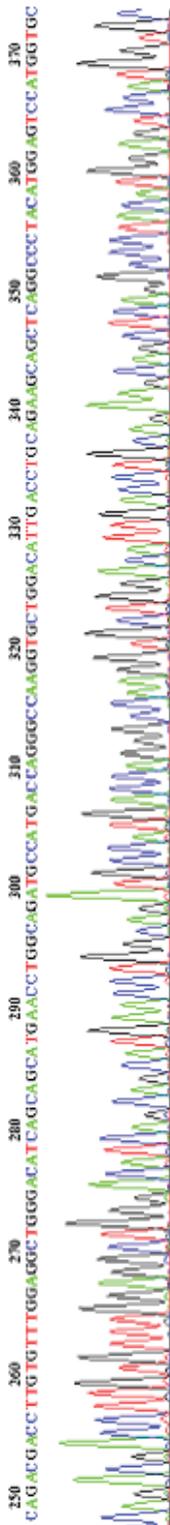
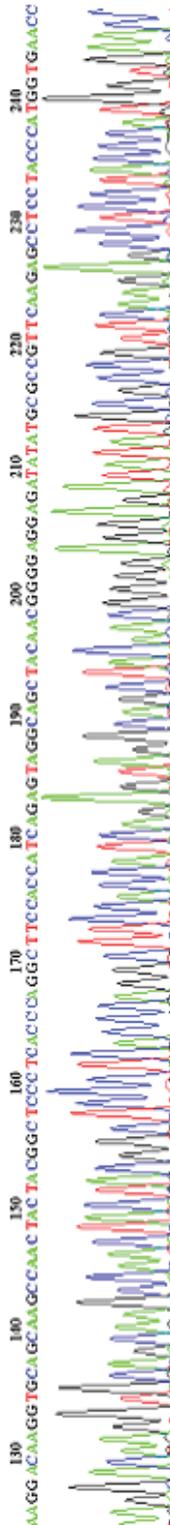
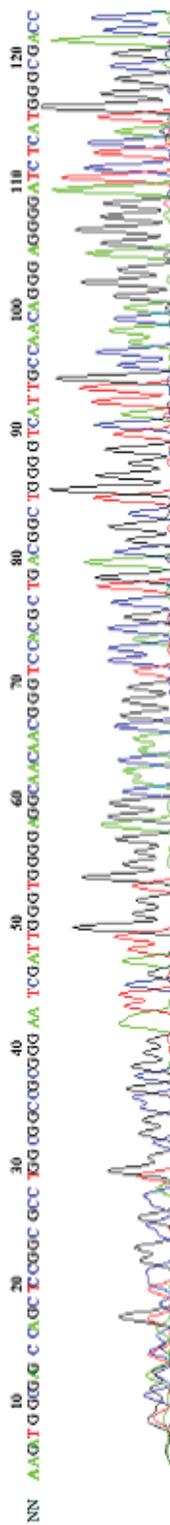
File: 080307-01\_G01\_pGEM-ZmMIPS-SP6.ab1 Run Ended: 2008/3/8 15:27:18 Signal G:925 A:604 C:666 T:694  
Sample: pGEM-ZmMIPS\_SP6 Lane: 9 Base spacing: 14.03 1289 bases in 14906 scans Page 1 of 2





File: 080307-01\_G01\_pGEM-ZmMIPS-SP6.ab1 Run Ended: 2008/3/8 15:27:18 Signal G:925 A:604 C:666 T:694  
Sample: pGEM-ZmMIPS\_SP6 Lane: 9 Base spacing: 14.03 1289 bases in 14906 scans Page 2 of 2









Apéndice 3 Análisis filogenético

