



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Expresión genética durante la inducción *in vitro* de brotes en
Mammillaria pectinifera.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A:

BIÓL. GREGORIO REYES LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. JORGE E. CAMPOS CONTRERAS

COMITÉ TUTORAL:

DR. VÍCTOR M. CHÁVEZ ÁVILA
DR. OSWALDO TÉLLEZ VALDÉS



México, D.F. Junio, 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril del 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **REYES LÓPEZ GREGORIO** con número de cuenta **99539760** con la tesis titulada **"Expresión genética durante la inducción *in vitro* de brotes en *Mammillaria pectinifera*."**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS:**

Presidente: DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
Vocal: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Secretario: DR. JUAN GERARDO ORTÍZ MONTIEL
Suplente: DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Suplente: DR. OSWALDO TÉLLEZ VALDÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de junio de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

Al CONACYT por la beca recibida durante mis estudios de posgrado.

Resumen -----	5
I.-Introducción-----	7
1.1.- Generalidades de la familia Cactaceae-----	7
1.2.- Actividad meristemática-----	8
1.3.- Organogénesis y Embriogénesis <i>in vitro</i> -----	10
1.4.- Expresión de algunos genes durante la morfogénesis -----	10
1.4.1.- Genes Knox-----	10
1.4.2.- Genes RLKs -----	11
1.4.3.- Genes LEC -----	12
1.5.- Expresión de proteínas en cultivo <i>in vitro</i> -----	13
1.6.- Histología -----	14
2.- Antecedentes -----	15
3.- Objetivos -----	16
4.- Materiales y Métodos-----	17
4.1.- Inducción de callos -----	18
4.2.- Análisis histológico -----	18
4.3.- Electroforesis en primera dimensión -----	18
4.4.- Patrones de proteínas en segunda dimensión -----	19
4.4.1.- Primera dimensión (Isoelectroenfoque) -----	20
4.4.2.- Electroforesis en segunda dimensión -----	20
4.5.- Extracción de RNAs totales -----	20

4.5.1.- Obtención de los cDNAs -----	21
5.- Resultados y discusión -----	22
6.- Conclusiones -----	35
7.- Bibliografía -----	36
8.- Apéndice -----	45

Registro CVU:

248722

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la expresión de dos genes SERK1 y LEC1, además de patrones electroforéticos de proteína en callos no organogénicos y callos organogénicos, durante la inducción de brotes en *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae). Para ello se indujo la formación de callos en medio (MS), adicionado con 2,4-D/BAP y KIN/AIA, con lo que se obtuvieron callos organogénicos y callos no organogénicos. Se realizaron cortes histológicos de los dos tipos de callos, observándose diferencias estructurales; en callos no organogénicos, se presentó un crecimiento celular uniforme, con amplia presencia de células parenquimatosas, por otro lado, en callo organogénico se observaron meristemos los cuales estuvieron estructurados por zonas límites, como son; células madre centrales, células madre, zonas periféricas y túnica, en las cuales se estarían llevando a cabo los procesos de diferenciación.

Para evaluar la expresión durante la formación de brotes, de SERK1 y LEC1, los cuales solo estaban reportados en la embriogénesis, se realizó la extracción de RNA total y la obtención de sus cDNAs. La amplificación de SERK1 se observó, al inicio de la organogénesis y en el caso de LEC1 durante la misma, lo cual es de gran importancia pues la presencia de estos genes en cultivos organogénicos, implica que son esenciales en el programa de diferenciación no importando la vía (embriogénesis u organogénesis).

Por otro lado, se observaron los patrones electroforéticos de proteínas en segunda dimensión (2D PAGE), de *Mammillaria pectinifera*, donde las proteínas expresadas estuvieron formadas por un total de 190 proteínas, de las cuales 62 se expresaron solo en callo no organogénico, 78 en callo organogénico y 50 se observaron en los dos tejidos.

Se obtuvieron los puntos isoeléctricos y pesos moleculares de los puntos observados, determinándose su probable estructura y su función, con lo que se obtuvieron 47 proteínas que estarían implicadas en procesos de organogénesis, de las cuales; 28 estuvieron presentes en callo organogénico, 3 en callo no organogénico y 16 que se presentaron en los dos callos, además 17 proteínas que aumentaron su expresión en callo organogénico con respecto al no organogénico, la mayoría de estas metabólicas.

Entre las principales proteínas observadas como reguladoras del proceso de organogénesis encontramos: expresión de proteínas de respuesta de unión a cinasas (RLKs), glicoproteínas (GPs), quitinasas, pectinasas y peroxidasas.

Con lo obtenido en este trabajo se puede tener un marco de referencia en la expresión genética y bioquímica de los procesos organogénicos en la familia de las cactáceas creciendo *in Vitro*,

ABSTRACT

In the present work the expression of two genes SERK1 and LEC1 was evaluated, also electrophoresis patterns protein of non-organogenic and organogenic callus, during the induction of shoot in *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae). The formation of calli was induced in the MS medium, added with 2,4-D/BAP and KIN/AIA, obtaining organogenic and non-organogenic calli. Histological sections were made of the two types of calli, structural differences were observed; in non-organogenic callus, a uniform cell growth was presented, with extensive presence of parenchymal cells, on the other hand, in organogenic calli the presence of meristems were observed which they are structured by zones limits, such as; central stem cells, stem cells, peripheral zone and tunic, which would be carrying out the processes of differentiation.

To evaluate the expression of SERK1 and LEC1 during shoot formation, which was reported only in the embryogenic cultures, we performed a total RNA extraction and obtaining their cDNAs. SERK1 was observed at the beginning of organogenesis and LEC1 was observed along organogenesis, this observation is very important because the presence of these genes in organogenic cultures, implies that they are essential in the differentiation program, regardless of the route (embryogenic or organogenic).

On the other hand, a total of 190 proteins were observed in the 2D electrophoretic patterns extracted from *Mammillaria pectinifera*, from which 62 were expressed only in non-organogenic calli, 78 in organogenic calli and 50 was observed in both callus. Isoelectric points were obtained and molecular weights of the observed spots, their probable structure and their function was deducted, from the 47 proteins that are probably implicated in processes of organogenesis, 28 were present in organogenic calli, 3 in non-organogenic and 16 that were present in both callus. Also 17 proteins that increased their expression in organogenic calli with respect to non-organogenic, were mainly involved in metabolic routs.

Among the main proteins observed in the regulation of organogenesis process are: expression of Response Like Kinases (RLKs), glycoproteins (GPs), chitinase, pectinase and peroxidase.

With the results obtained in this work we can have a reference frame of the genetic and biochemical expression of the *in vitro* organogenic processes in the cacti family.

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades de la familia Cactaceae.

México cuenta con una gran diversidad biológica, alberga entre el 10 y 15% de las especies terrestres, por lo cual no hay otro país de tamaño similar (1.3% del total global de Tierra), que tenga tanta diversidad en sus ecosistemas (SEMARNAP, 1997). Entre las plantas más representativas de la flora actual, en México sobresale la familia de las cactáceas, la que junto con otras 5 familias suman aproximadamente el 40% del total de géneros y especies (Rzedowski, 1991). Las cactáceas constituyen un grupo natural originario del continente Americano, con aproximadamente 2000 especies, esta familia se ha diversificado en diferentes climas y tipos de vegetación como las regiones tropicales, subtropicales, templadas y frías, pero la mayor diversidad está distribuida en las zonas áridas y semiáridas (Rzedowski, 1978; 1991, Arias, 1997). La familia de cactáceas está entre las más vulnerables y actualmente tiene aproximadamente 50 especies en peligro de extinción, contempladas en el Apéndice I de CITES (Convención Internacional Sobre la Comercialización de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres, 2011), y toda la familia en el Apéndice II (especies protegidas) excepto *Pereskia* sp., *Pereskopsis* sp., y *Quiabentia* sp. Algunas especies están listadas en la NOM-059-ECOL-2001-2002, las cuales pueden tener la categoría de: Probablemente extintas en el medio silvestre, en peligro de extinción, amenazadas o sujetas a protección especial, como: *Mammillaria pectinifera*, especie endémica de Zapotitlán Salinas, Puebla, Mex. (Gúzman *et al.*, 2003), la cual se ha visto amenazada por factores como la perturbación del ecosistema por pastoreo y la colecta para el comercio ilegal (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), lo que ha contribuido a que esté clasificada como en peligro de extinción en el Apéndice I de CITES, y en la categoría de endémica y amenazada en la NOM-059-ECOL-2001-2002, al respecto, Valverde *et al.* (2009), basados en el protocolo del Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres (MER), del anexo I de la NOM-059-ECOL-2001-2002, proponen que se considere a *Mammillaria pectinifera* en

la categoría de especie en peligro de extinción (P), y que sea incluida nuevamente en la lista roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza).

Por la importancia ecológica y económica que tiene la familia de las cactáceas, se han implementado diversos sistemas de multiplicación y conservación de germoplasma, una de estas técnicas es la micropropagación o cultivo *in vitro*. Este método ha sido utilizado como una alternativa potencial para la propagación de cactáceas y crasuláceas (Hubstenberger *et al.*, 1992; Malda *et al.*, 1999), comúnmente se realiza la inducción de plántulas por organogénesis a partir de callos indiferenciados, los cuales son obtenidos en medio de cultivo adicionados con reguladores de crecimiento por lo general con 2,4-D, el cual junto con citocininas genera una gran cantidad de tejido indiferenciado (Hubstenberger *et al.*, 1992).

Las citocininas han sido consideradas de forma importante en varias fases del crecimiento y desarrollo en las plantas (Sakakibara, 2006), pues pueden estar influyendo en diversos procesos bioquímicos como: estimulación en la biosíntesis de ácidos nucleicos y diferentes proteínas, entre otras, enzimas como proteasas y ribonucleasas (Caba *et al.*, 2000); por lo que su presencia es necesaria para inducir la división celular así como la diferenciación de células o de tejidos (George y Sherrington, 1993; Jankiewicz, 2003, Veit, 2006).

La diferenciación, es un proceso complejo altamente organizado que está regulado por un gran número de genes, la identificación de estos es muy importante para conocer su asociación a mecanismos moleculares (Balén *et al.*, 2002, Bishop-Hurley *et al.* 2003).

En la última década se han venido realizando varios trabajos para conocer cuáles son los genes que están implicados en la diferenciación (ejemplos: Alemanno *et al.*, 2008 en *Theobroma cacao*, Kumar y Millan 2008 en *Solanum tuberosum*, Tomas *et al.*, 2004 en girasol), ya que están regulando la formación de brotes (organogénesis) o embriones (embriogénesis) (Zhang *et al.*, 1998, Pérez-Núñez *et al.*, 2009).

1.2.- ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA.

En el tiempo de vida de las plantas, la primera formación de órganos, se lleva a cabo durante el proceso de embriogénesis, posteriormente la continua formación de órganos depende de la

actividad de los meristemos ya sea del brote o raíz, lo cual puede ser una adaptación a la combinación del estilo sésil de las plantas y la relativa inmovilidad de las células constituyentes (Gegas y Doonan, 2006, Scofield y Murray, 2006).

Los meristemos apicales son regiones especializadas que se encuentran en los extremos de los tallos y las raíces, donde las células permanecen en un estado indiferenciado y tienen la capacidad de proliferar indefinidamente. El número de células en los meristemos puede permanecer sin cambios por varios periodos, evento que podría perdurar por cientos de años (Gegas y Doonan, 2006, Veit, 2006). El término “meristemo” es atribuido a Nageli desde 1858, quien lo describió como tejido generante o permanente (Tooke y Battey, 2003).

El meristemo apical de las plantas es estructurado y dinámico, el cual está dentro de varias capas de células, las cuales forman zonas definidas, también llamadas zonas límites (centro, periferia y costillas), clasificación que está basada en las características citológicas de las células, las cuales incluyen el tamaño de los meristemos, los que en cactáceas tienen modificaciones extremas, esto debido a los procesos evolutivos llegando a medir de 80 a más de 1500 μ (Mauseth, 2004), en otras clasificaciones están: la tasa de crecimiento a lo largo de los planos transversales y verticales, la existencia de otras capas de células y la posición de los centros de crecimiento (Gegas y Doonan, 2006, Aida y Tazaca, 2006, Carraro *et al.*, 2006, Scofield y Murray, 2006, Viet, 2006).

Las zonas meristemáticas están formadas de pequeños grupos de células indiferenciadas (Fig

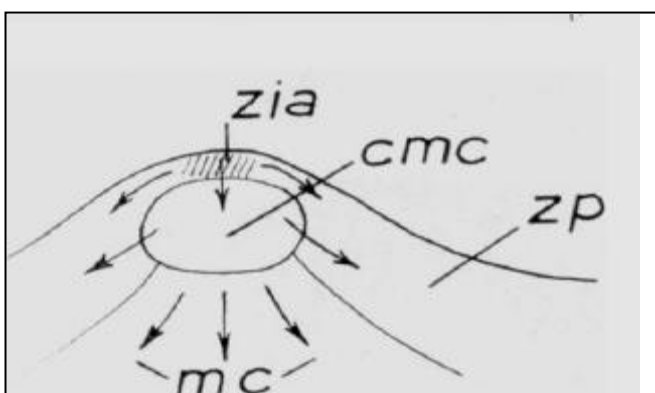


Fig. 1 Zonas citohistológicas de un meristemo: zia (zona apical inicial), cmc (células madres centrales), zp (zona periférica), mc (meristemo central) (Tooke y Battey, 2003).

1), las plantas pueden regenerar todos sus órganos por los brotes meristemáticos, es decir en la periferia de los meristemos apicales de la planta, nombrados (SAMs), también forman las zonas límites que separan los órganos primordiales de un nuevo brote u órgano, los patrones en que éstos son iniciados depende de la expresión de las

diferentes zonas, la zona central o zona inicial apical (zia), localizada en la punta del meristemo, contienen una población de lenta división, las células de alrededor o zona periférica (zp), tienden a ser pequeñas, se dividen rápidamente y eventualmente forman órganos laterales, al principio se forma un órgano primordial, cuando este ha sido formado, se comienzan a diferenciar las zonas límites, formado por las cmc y las mc, que van a separar el brote primordial del tejido circundante, un grupo de células límite comienza a desplegar patrones característicos de división celular, morfología y expresión genética (Aida y Tazaca, 2006, Carraro *et al.*, 2006, Golz, 2006). Estas células se diferencian dando origen a diferentes órganos de acuerdo a su información específica y no pueden retornar a su fase meristemática durante su crecimiento normal (Carraro *et al.*, 2006, Golz, 2006, Scofield y Murray, 2006).

1.3.-ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENESIS *in vitro*.

En las plantas, muchas células son totipotenciales y típicamente son sometidas a una de dos vías para la regeneración *in vitro*, la formación de brotes o la formación de embriones somáticos. La formación y desarrollo de brotes adventicios, clásicamente referido como organogénesis ó también llamado caulogénesis (Thorpe 1994 citado en Zhang *et al.*, 1998, Thomas *et al.*, 2004), es el proceso mediante el cual células totipotenciales o parte de un tejido producen una estructura unipolar, nombrada brote, este brote tiene el sistema vascular unido al tejido parental. En contraste, la formación de embriones somáticos o embriogénesis implica la formación de una estructura bipolar, conteniendo un eje de raíz-brote, el cual produce una independencia en el sistema vascular (Zhang *et al.*, 1998, Thomas *et al.*, 2004)

La regeneración de un tejido o de plantas por cultivo *in vitro*, generalmente involucra la proliferación celular, con un crecimiento definido y por lo tanto genes específicos para la división celular y desarrollo, los cuales se estarían expresando en el meristemo (Zhang *et al.*, 1998, Thomas *et al.*, 2004, Aida y Tazaca, 2006).

1.4.- REGULACIÓN GENÉTICA EN LA EMBRIOGENESIS Y LA ORGANOGENESIS.

1.4.1.- Genes KNOX

La regulación de la diferenciación celular está dada por genes de diferentes familias, entre los primeros genes caracterizados están los pertenecientes a la familia llamada KNOTTED (genes *knox*), los cuales tienen un importante papel en el establecimiento y mantenimiento de células meristemáticas. Este grupo de genes han sido identificados en todas las monocotiledóneas y dicotiledóneas, representan un ancestral y conservado mediador del potencial meristemático (Hake *et al.*, 2004, Carraro *et al.*, 2006, Scofield y Murray, 2006). La primera vez que se observó el papel del dominio del gen-homeobox sobre el SAM (meristemo apical de la planta) fue el gen KNOTTED1 (*ZmKN1*), el cual fue identificado en la planta de maíz. Otro miembro de esta familia es el STM (meristemo de la planta), el cual presenta características similares al anterior, este gen ha sido identificado en varias plantas (Hake *et al.*, 2004, Hjortswang *et al.*, 2002). Por otro lado se ha observado que la sobre expresión de genes KNOX, genera un incremento de las hojas compuestas, así como formación de lóbulos en hojas simples, reduciendo la formación de otros órganos (Carraro *et al.*, 2006).

La formación de un órgano está asociado con un incremento y más de un evento de proliferación celular, las regiones de rápida división son separadas por uniones de células las cuales presentan una lenta división, es decir por zonas diferenciadas dentro del meristemo (Gegas y Doonan. 2006).

Estas zonas son evidenciadas a nivel molecular ya que su presencia es caracterizada por su amplia expresión de D-ciclinas. Uno de estos genes es el *cdc2*, el cual codifica una ciclina dependiente de cinasa (CDK p34), la que tiene un papel muy importante regulando procesos como son los de división celular, en el ciclo de las células eucariotas (Zhang *et al.*, 1998).

1.4.2.- Genes RLKs.

Otro grupo de genes identificados en varias plantas son los receptores de unión a cinasas (RLKs), los cuales forman una gran familia, se han descrito en el genoma de *Arabidopsis thaliana* más de 600 miembros (Shiu *et al.*, 2004). El primer receptor de unión a cinasa fue encontrado por primera vez en maíz (*Zea mays*), subsecuentemente se han identificado en muchas otras

especies de plantas y se ha sugerido que tienen un papel importante en la historia de vida de la planta. Típicamente, Las proteínas expresadas por los RLK contienen una secuencia señal, una región transmembranal y un dominio C-terminal; Las RLKs, son proteínas transmembranales que perciben señales a través de su dominio extracelular y propagan la señal vía el dominio cinasa intracelular (Sharma y Millam 2008, Shiu *et al.*, 2004).

Estos genes tienen una gran importancia en procesos de desarrollo, ya que transcriben señales ambientales y/o información a las células vecinas para generar respuestas intracelulares específicas, tales como, crecimiento, desarrollo y respuestas de defensa. Otro de estos procesos es la embriogénesis somática, la cual no solo va a depender del tipo de célula empleada, sino también de las condiciones en el medio, incluida la composición de nutrientes (Singla *et al.*, 2009).

Dentro de los receptores de unión a cinasas están los genes SERK (Receptor-unión de cinasa en embriogénesis somática), estos forman un pequeño subgrupo de 5 miembros repetidos de leucina (LRR)-RLKs, estos fueron reportados en *Arabidopsis*, los cuales tienen un origen monofilético, altamente conservado y se ha demostrado que se expresan diferencialmente en el desarrollo de la semilla así como en varios órganos y tejidos, bajo la luz o la obscuridad, estos genes están regulados por auxinas/brasinoesteroides (Albrecht *et al.*, 2005,2008, Sharma y Millam, 2008, Singla *et al.*, 2009). El gen SERK1 codifica para proteínas con dominios específicos, los cuales consisten de un péptido señal, un dominio de zíper de leucina, 5 LRR, el dominio serina-prolina-prolina, el cual es un dominio distintivo de las proteínas SERK, además un dominio único transmembranal, el dominio cinasa con 11 subdominios y la región C terminal (Pérez-Núñez *et al.*, 2009), desde hace un tiempo se ha correlacionado la expresión de SERK 1 y la regulación del inicio de la embriogénesis somática en varios cultivos (Salaj *et al.*, 2008, Thomas *et al.*, 2004, Nolan *et al.*, 2009, Pérez-Núñez *et al.*, 2009, Singla *et al.*, 2009).

1.4.3.- Genes LEC

Otro grupo importante de genes que tienen un papel importante en el control de muchos aspectos de la embriogénesis son los genes LEC (cotiledón-hoja), de los cuales se han identificado tres genes LEC1, LEC2 y FUSCA3 (Kumar *et al.*, 2008, Pérez-Núñez *et al.*, 2009,

Schellenbaum *et al.*, 2008, Gaj *et al.*, 2005). Estos intervienen en varias funciones como son el mantenimiento de la identidad celular, especificación de la identidad del cotiledón, tolerancia a la desecación, síntesis y acumulación de reservas e inhibición de la germinación (Alemanno *et al.*, 2008).

El gen LEC1 codifica factores de transcripción; los cuales tienen una función central en la regulación de las fases tempranas y tardías de la embriogénesis, éste codifica proteínas con secuencia similar a la HAP3, subunidad del factor de unión CCAAT. (Lee *et al.*, 2003 cit., en Gaj *et al.*, 2005, Alemanno *et al.*, 2008).

LEC2, también codifica para un factor de transcripción de las plantas específicamente el dominio B3; este dominio, permite la actividad de unión al DNA de estas proteínas. La ectópica expresión de LEC2, también induce la formación de embriones somáticos y estructuras de unión de órganos, las cuales son características embriogénicas de tejidos vegetativos, por lo que LEC1 y LEC2 han sido considerados como reguladores transcripcionales capaces de establecer condiciones celulares suficientes para iniciar el desarrollo de la embriogénesis.

Además en trabajos recientes se identificó otro gen relacionado a LEC1, el cual codificaba subunidades HAP3, este fue nombrado L1L (LEC-1-LIKE). La interacción de LEC1 y L1L, tienen distintas funciones endógenas y son esenciales para la inducción y desarrollo de la embriogénesis además de que pueden complementarse (Gaj *et al.*, 2005, Kwong *et al.*, 2003, Alemanno *et al.*, 2008).

Otros genes que también se están expresando y regulando la formación y mantenimiento del SAM (meristemo apical de la planta), son los genes CUC (forma de copa del cotiledón), los cuales están siendo requeridos para la separación del brote (Aida *et al.*, 1997, Itoh *et al.*, 2006).

La comprensión de los mecanismos que controlan la expresión de genes durante los procesos de diferenciación, pueden proveer una base de genes para la inducción eficiente de organogénesis o embriogénesis en cultivos no diferenciables (Bishop-Hurley *et al.* 2003, Zhang *et al.*, 1998).

1.5.- EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS *IN VITRO*

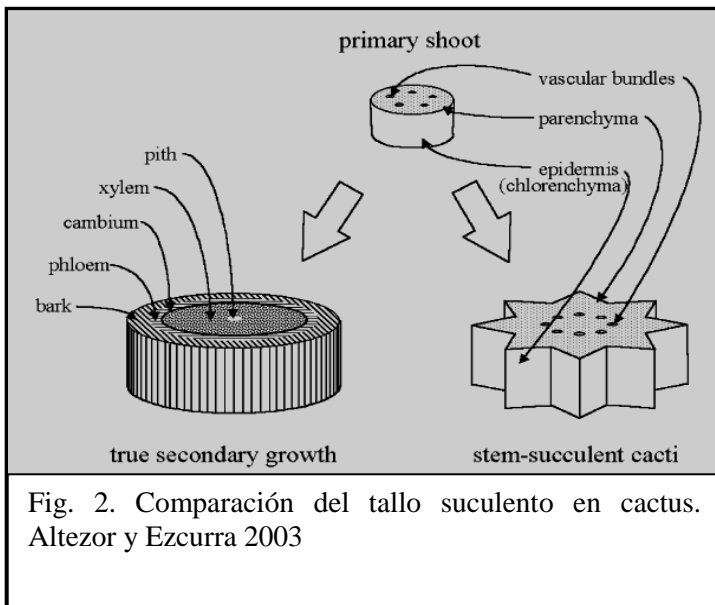
Por otro lado, junto con los trabajos de presencia o ausencia de genes se han realizado trabajos complementarios al estudio del genoma que incluyen la identificación y cuantificación de proteínas por métodos de electroforesis, para saber qué tipo de proteínas están presentes en un tejido en particular, y cómo un determinado patrón de proteínas está relacionado a los eventos de morfogénesis en el tejido, ya que los eventos de desarrollo causados por cambios en la expresión de genes puede ser conocida analizando patrones electroforéticos de proteínas e isoenzimas (Balén *et al.*, 2002). Ya que la diferente apariencia y el potencial de regeneración de callos embriogénicos y no embriogénicos, implica que existen diferencias en la expresión de genes entre los dos tipos de cultivos (Chen y Lhute, 1987).

El cultivo *in vitro* de células y tejidos es de gran importancia por proveer la vía para el estudio de los procesos de desarrollo de la planta, marcadores fisiológicos involucrados en procesos de embriogénesis han sido identificados para algunas especies (Grotkass *et al.*, 1995), dentro de estos marcadores se encuentran proteínas específicas; como peroxidadas, fosfatasas y otras enzimas, que pueden ser usadas en la predicción de los eventos de desarrollo, cuando son causados por modificación en los patrones de expresión de los genes. Las estererasas son un grupo de enzimas que hidrolizan uniones ester, los cuales están presentes en muchas isoformas en las plantas así como en células animales. Isoestererasas son estudiadas como marcadores para la detección de embriogénesis, ya que los cambios de expresión son una fuente de información acerca de las modificaciones bioquímicas que ocurren durante este proceso (Krsnik *et al.*, 1999), también se han mencionado a las peroxidadas, como probables involucradas en los procesos de lignificación, diferenciación y crecimiento (Joersbo *et al.*, 1989). Otras proteínas identificadas como fundamentales en los procesos de diferenciación son las quitinasas y glucanasas, las cuales son enzimas que hidrolizan los polímeros quitina y β -1,3-glucano, respectivamente (Dong y Dunstan, 1997).

1.6.-HISTOLOGÍA

Otro método importante que aporta una primer vista de la organización celular, es la histología,

ya que algunas veces la organización de los meristemos apicales (SAM), parecerá compleja, sin embargo con la ayuda de la histología se pueden identificar y describir varias características (Carraro *et al.*, 2006). Lo cual es muy importante para caracterizar cambios en el tejido de las cactáceas, ya que tienen características particulares, pues son plantas que provienen de plantas



leñosas y que por evolución se perdió el típico crecimiento secundario, hasta formar individuos con más parénquima en el leño (Fig. 2). Por lo que esta familia tiene una de la más grande diversidad morfológica (Altezor y Ezcurra, 2003, Mauseth 1978, 1993, 2004, 2006).

En cultivo de tejidos de cactáceas, los análisis histológicos revelan procesos de regeneración y activación de meristemos apicales y axilares, con lo que se ha observado organogénesis directa e indirecta así como embriogénesis somática, con la formación en el primer caso de la parte aérea de la plántula, a diferencia de el último caso donde se observa la formación de embriones técnicamente completos (Rubluo *et al.*, 2002, Giosti *et al.*, 2002).

2.-ANTECEDENTES.

Se ha estudiado la caracterización de genes que se expresan en un determinado momento del crecimiento o diferenciación *in vitro* de la planta y algunos trabajos se han enfocado en el proceso de embriogénesis somática. Al respecto, Bishop-Hurley *et al.* (2003), aislaron y caracterizaron genes expresados durante la embriogénesis somática en *Pinus radiata*; Jin-Zhuo y Dunstan (1999), caracterizaron y clonaron seis cDNAs asociados a la embriogénesis de *Picea glauca*, así como su expresión comparativa durante la embriogénesis cigótica; Aida *et al.* (1997) Identificaron

y caracterizaron los genes CUC1 y CUC2, así como sus efectos en la separación de los cotiledones, en sépalos y estambres de *Arabidopsis*; Kumar y Millan (2008), trabajaron con la expresión de SERK, y observaron que se expresa durante la iniciación de embriogénesis somática en *Solanum tuberosum*; Tomas *et al.* (2004), trabajaron en la expresión espacial del gen SERK, durante la inducción de embriogénesis somática y organogénesis en girasol, encontrando que hay una acumulación de transcritos de SERK en la zona morfogénica de los explantes, no importando la condición de embriogénesis u organogénesis; Pérez-Nuñez *et al.* (2009), Trabajaron con la detección de SERK en coco y su expresión durante la formación de callos embriogénicos y embriones somáticos, concluyendo que la expresión de SERK puede observarse antes del proceso de la embriogénesis, en contraste a los tejidos no embriogénicos, por lo que concluyen que SERK esta asociado con la inducción de embriogénesis somática; Schellenbaum *et al.* (2008), caracterizaron los genes SERK1, 2, y 3, así como L1L y su expresión durante la embriogénesis somática de *Vitis vinifera*, concluyendo que SERK y L1L, están involucrados en la embriogénesis; Gaj *et al.* (2005), trabajaron con LEC1, LEC2 Y LEC3, concluyendo que son esenciales para la inducción de embriogénesis en *Arabidopsis*; Kwong *et al.* (2003), mencionan que LEC1 es requerido para un normal desarrollo durante la embriogénesis temprana y tardía en *Arabidopsis*.

La presencia de los genes anteriormente descritos característicos durante el proceso de embriogénesis no se ha estudiado en cactáceas cultivadas *in vitro*. De hecho Mauseth 2004, propone determinar la función de algunos genes que están implicados en el desarrollo del meristemo, para comprender sus patrones de expresión.

Por otro lado se ha estudiado la expresión de proteínas (Mangolin *et al.*, 1999), en segunda dimensión en callos de *Cereus peruvianus*, donde se determinaron cambios en la expresión de proteínas bajo diferentes concentraciones de 2,4-D y KIN; Balen *et al.* (2002), trabajaron con proteínas y glicoproteínas relacionadas a la morfogénesis en *Mammillaria gracillis*.

Por lo que en este trabajo se determinaron cambios en la expresión genética entre callos obtenidos *in vitro* de *M. pectinifera*, formadores y no formadores de brotes, y la expresión de los genes SERK1 y LEC1 característicos de embriogénesis.

Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos.

3.-OBJETIVOS

3.1.-OBJETIVO GENERAL.

Conocer cambios en la expresión genética y presencia activa de los genes SERK1 y LEC1 durante la inducción de brotes de *M. pectinifera* creciendo *in vitro*.

3.2.-OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Determinar diferencias entre callos inducidos, formadores y no formadores de brotes de *M. pectinifera*, por medio de cortes histológicos.

- b) Determinar la expresión entre callos inducidos, formadores y no formadores de brotes de *M. pectinifera*, por medio de patrones electroforéticos de proteínas en primera y segunda dimensión.

- c) Extraer RNA total y obtener cDNAs de callos inducidos, formadores y no formadores de brotes, para observar en los mismos la expresión de los genes LEC1 y SERK1, los cuales han sido reportados como característicos solo de embriogénesis.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.-Inducción de callos.

Los callos se indujeron a partir de fracciones apicales de plantas adultas, las cuales fueron divididas en fracciones de aproximadamente 1 cm³ y sembradas en frascos de vidrio de 250 ml, con 20 ml de medio, utilizando dos diferentes medios de cultivo (para callos no organogénicos medio A y callos organogénicos medio B).

A) Constituido por las sales MS (Murashige y Skoog 1962), adicionado con 0.5 mg/l de tiamina, 100 mg/l de Mio-Inositol, 0.5 mg/l de BAP y 1mg/l de 2,4-D, 7 g/l de agar, y un pH de 5.8 (\pm 0.1). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 21 ± 1 °C y una intensidad luminosa de 80 a 90 $\mu\text{mol/ m}^2\text{s}$; después de dos meses de cultivo una parte de los explantes con formación de callo se trasladaron a medio B.

B) Sales MS, con 0.5 mg/l de tiamina, 100 mg/l de Mio-Inositol, 6.3 mg/l de Kin y 5.1 mg/l de AIA (Giosti *et al.*, 2002) 7 g/l de agar y pH de 5.8 (\pm 0.1). Esto con el fin de que el tejido iniciara la formación de brotes.

4.2.- Análisis histológico.

Se fijaron fracciones de callo organogénico y no organogénico en FAA (50 ml de Alcohol 96%, 5 ml de ácido acético, 10 ml de formaldehído al 37.4%, agua 35 ml), por dos días, posteriormente se realizó la deshidratación, en un soluciones alcohol-agua, con concentraciones de etanol 20, 40, 60, 80, 100 % las muestras se dejaron por 2h., en cada solución, haciendo tres cambios finales en alcohol al 100%, al término de la misma se pasaron a una solución de alcohol absoluto-xilol (4:1, 1:1, 1:4). La infiltración e inclusión se realizó con paraplast dejando las muestras por 1 semana hasta que se eliminara el xilol.

Los cortes fueron hechos en un micrótopo American Optical[®] modelo 820, obteniéndose secciones de 15 micras, se desparafinaron en estufa a 55 °C por 20 min. Posteriormente se pusieron en xilol puro por 15 min, posterior a lo cual se colocaron en una solución xilol-etanol absoluto (1:1), por 15 min, al término fueron rehidratadas en soluciones de alcohol 100, 96, 80, 70, 50 y 40%, finalmente en agua destilada. Se realizó la tinción con safranina (Sass, 1958), así como el montado de las mismas con resina (Sigma[®]).

4.3.- Electroforesis en primera dimensión.

Se llevó a cabo mediante la comparación de patrones electroforéticos de proteínas totales, de acuerdo a la técnica modificada de Kondo *et al.* (1998). Se utilizó el homogenizado de 1g de tejido (callo organogénico y no organogénico), más 50 mg de PVP (polivinilpirrolidona) y se le agregó 1

ml de buffer Hepes-KOH 50 mM (pH 8.2), el cual contenía 5 mM de Dithiothreitol, 0.2 mM de disodio EDTA, 1% de Triton X-100. El homogenizado se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -18 °C, hasta el momento del corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 10%. De acuerdo a la técnica descrita por Laemmli, (1970) (ver apéndice 1), los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250, una vez obtenidos los geles se tomaron fotografías de los mismos y se analizaron los patrones de corrimiento utilizando el transiluminador Singene® y los software Gene Snap versión 6.08, Synoptics Ltd. England, analizando las imágenes por medio de software Gene Tools de Synoptics Ltd. England

4.4.-PATRONES DE PROTEÍNA EN SEGUNDA DIMENSIÓN.

Las muestras de proteínas totales se lavaron con el KIT 2D-CLEAN-UP, ETTAN®, con lo que se eliminó el exceso de sales.

Para lo cual se transfirió 1 ml de muestra (callo organogénico y callo no organogénico) a tubos Eppendor®, adicionando 300 µl de precipitante, se mezcló por inversión, y se colocó en hielo (4-5 °C) por 15 min, al término se le agregaron 300 µl de co-precipitante a la mezcla, agitando suavemente en el vortex, posterior a lo cual se procedió a la centrifugación a 14, 000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante evitando la resuspensión de la pastilla, posteriormente se le adicionaron nuevamente 40 µl de co-precipitante, y se dejó reposar en hielo por 5 min. Al término, se centrifugó por 5 min y se retiró el sobrenadante; se agregaron 25 µl de agua bidestilada a las pastillas y se agitó en vortex por 10 segundos, al término se adicionó 1 ml de buffer de lavado, así como 5 µl de aditivo de lavado y se agitó en vortex hasta que las pastillas se dispersaron, se incubaron los tubos a -20 °C por 30 min, durante los cuales cada 10 min fueron agitadas en vortex por 30 seg, después se centrifugaron a 14,000 rpm por 5min se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en un volumen de 125 µl de solución de rehidratación (ver solución de rehidratación en el apéndice 2).

Se realizó el corrimiento para 2D en un equipo Ettan IPGphor 3 EIF GE®, para lo que se utilizaron tiras (GE Healthcare Immobiline® DryStrip pH 3-10 y de 7 cm.), éstas se colocaron en la bandeja de pozos para la hidratación de las tiras (DryStrip Reswelling Tray), antes se agregó la solución de hidratación con la muestra (un carril por muestra), y se colocaron las tiras, con la parte del gel orientadas hacia la solución (boca-abajo) y se cubrió la tira con 3-4 ml de aceite, que evitó la evaporación y cristalización de la urea, se dejó hidratando las tiras por 16 h a temperatura ambiente.

4.4.1.-Primera dimensión (ISOELECTROENFOQUE)

Posterior a la hidratación de la tira se procedió a la primera dimensión (Isoelectroenfoque), para lo cual se colocaron alrededor de 5 ml de aceite en el contenedor IPGphor[®], y se retiraron las tiras del recipiente de hidratación, con pinzas, para enjuagar las tiras con agua bidestilada, y quitarle el exceso de la solución de rehidratación en la superficie del gel; se retiró el exceso de agua con papel filtro, evitando el contacto con la parte del gel, se colocó la tira en el IPGphor, se colocaron los electrodos y se procedió al isoelectroenfoque, para el que se utilizó un voltaje de 0 a 5000 v, utilizando el protocolo 1 del programa de Ettan IPGphor 3[®] de General Electric.

4.4.2.-Electroforesis en segunda dimensión (2D).

Para la segunda dimensión se retiraron las tiras del IPGphor y se colocaron en tubos, 2.5 ml de las soluciones de equilibrio por muestra (ver apéndice 2), las tiras estuvieron 30 min., en cada solución, al término de lo cual se trasladaron a la cámara de electroforesis (protean 3[®] de Biorad) para la segunda dimensión en geles de poliacrilamida al 10%, en donde se cubrieron las tiras con SDS-agarosa al 0.5%, se incluyó un marcador de Peso Molecular junto con las tiras (SDS-PAGE, Broad range de Biorad[®])

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R (ver apéndice 2), por 16 h., posterior a lo cual fueron desteñidos en una solución de Metanol, Acido acético, agua y se procedió a tomar la imagen en el transiluminador Singene[®] y los software Gene Snap versión 6.08, Synoptics Ltd. England, con lo que posteriormente se obtuvieron los puntos isoeléctricos y los pesos moleculares de los puntos observados en los geles.

4.5.-Extracción de RNA total

Ésta se llevó a cabo por medio de aislamiento de RNAs totales y tomando en cuenta las recomendaciones de Gehrig *et al.* (2000), que mencionó que los métodos de extracción pueden ser modificados para ser aplicables a especies particulares de plantas. En este caso para la extracción de RNA total se realizó de acuerdo a Seol *et al.* (2008). La cual es una modificación de la técnica de extracción propuesta por Chomczynski y Sacchi en 1987. La extracción de RNAs totales de las muestras fueron aisladas con TRIZOL reagent (Invitrogen US). Aproximadamente 50-100 mg de tejido se mezclaron con 1 ml de TRIZOL y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo a cada una de las muestras. La mezcla se incubó por 2 min a temperatura ambiente y fue centrifugada a 14 x 1000 rpm a 4 °C por 30 min., el

sobrenadante se recuperó y se le agregó 1.0 ml de isopropanol, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 10 min y centrifugada a 14 x 1000 rpm por 15 min. La pastilla de RNA se colectó y lavó con etanol al 75%. La pastilla fue disuelta en agua libre de nucleasas para preservar la integridad del RNA.

Para determinar la integridad del RNA se realizó un corrimiento en gel de agarosa al 1%, 10 ml de TBE y 90 ml de H₂O y se tiñó con Bromuro de etidio, para observar la integridad del mismo.

4.5.1.-Obtención de los cDNAs

Para esta técnica se usó la enzima Super scrip[®] II Reversa transcriptasa (Invitrogen), se adicionó primeramente 1 µl de oligo dT₁₂₋₁₈, 5 µg de RNA total, 1µl de dNTPs y agua destilada hasta obtener 13 µl, la mezcla se incubó a 65 °C por 5 min, posterior a lo cual se dejó reposar en hielo por 1 min, al término se centrifugó por 30 seg, a 5000 rpm para concentrar la muestra. El siguiente paso fue la adición de 4 µl de buffer 5X de primera cadena y 2 µl de 0.01 M de DTT, posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 30 seg y se incubó a 42 °C por 2 min, al término, se le adicionó 1 µl de la enzima Transcriptasa Reversa, se mezcló por pipeteo y se centrifugó a 5000 rpm por 30 seg., siguiendo con una incubación a 42 °C por 50 min, al término de lo cual se inactivó la reacción por calentamiento a 72 °C por 15 min, con el fin de producir los cDNAs, primarios que posteriormente fueron amplificados por PCR utilizando la enzima *Taq* polimerasa[®] de invitrogen, se desnaturalizó la muestra por dos minutos y se utilizaron 40 ciclos de amplificación 94 °C para desnaturalizar por 45 seg, 55 °C por 1 min para alineación y 72 °C por 1 min para la extensión, terminando a 72 °C por 10 min, en un termociclador TC-312, TECHNE[®], de los cDNAs obtenidos se amplificaron los genes de Actina 2 (Silva-Ortega *et al.*, 2008) (Forward, aactgggatgacatggagaa. Reverse, atgttgaggtagtacttcacacta), LEC1, a partir de *Bryophyllum* (Forward, gatatctgacgacgccaag. Reverse, catcattaccataaccgtcgac) y SERK1 (Pérez-Nuñez *et al.*, 2009) (Forward, tatctggtacattggtcctc. Reverse, ctcttcagcaggcacatc). Para los corrimientos se utilizaron como patrón dos marcadores (100 bp DNA Ladder de invitrogen[®], y The geneRuler[®] plus DNA Ladder de Fermentas).

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Análisis histológico: Este se realizó con los cultivos de callo no organogénico y callo organogénico (Fig. 3), a partir de los cuales se hicieron los cortes histológicos, con lo que se observaron diferencias en los tejidos.

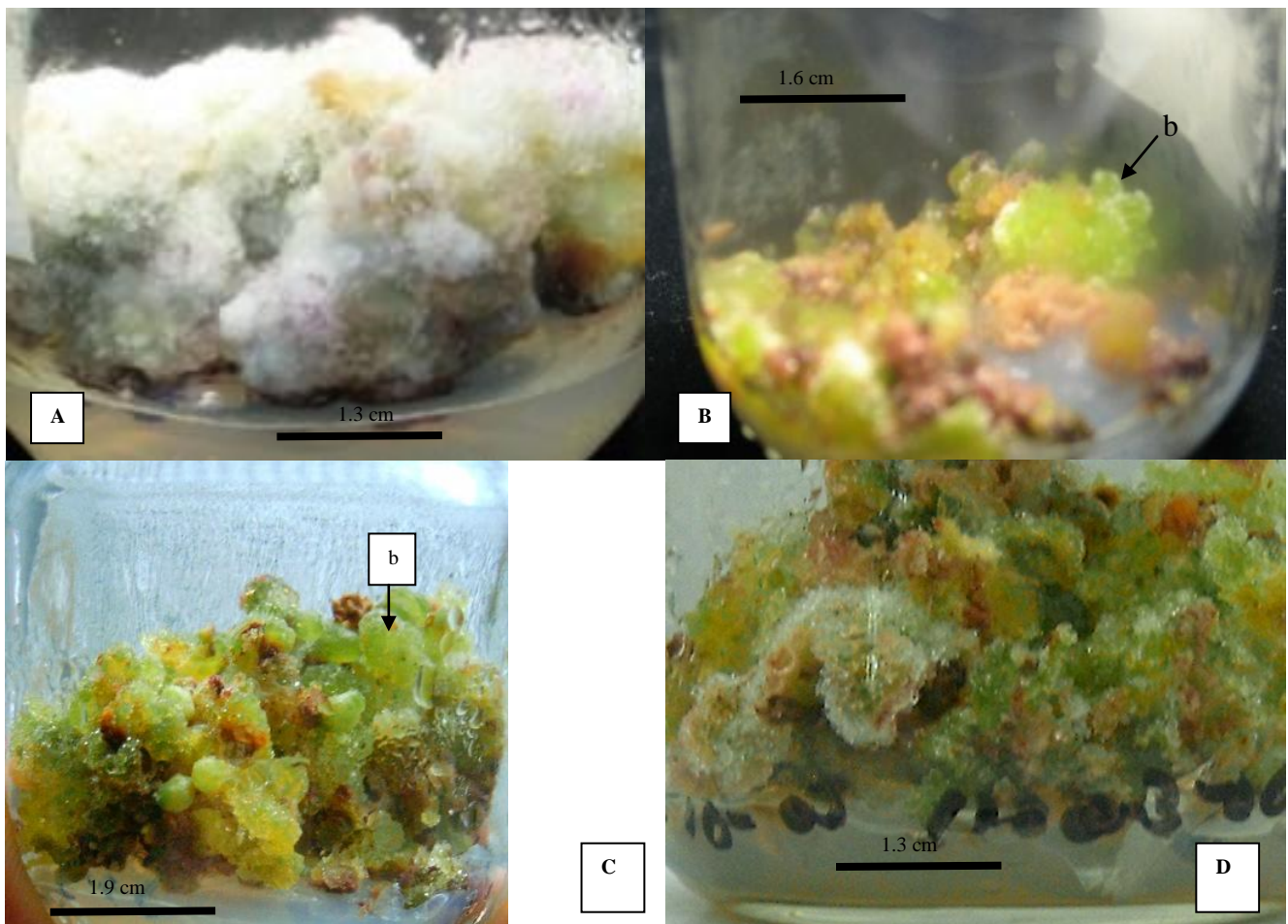


Fig. 3.- A) Callo no organogénico generados aproximadamente al mes de cultivo, en el medio A, Figuras B, C y D, Callos organogénicos, obtenidos en el medio B. (b- Brote), inicio de la organogénesis a los 2 meses aprox., (D).

Estas fueron con respecto al tipo de células, las cuales en callo no organogénico son de tamaño uniforme y parenquimatosas por otro lado no se observó la formación de zonas meristemáticas u otras estructuras (Fig. 4 A y B), lo cual concuerda con lo obtenido por Rubluo *et al.* (2002), los cuales en histología de callos de *Mammillaria san angelensis*, antes de la organogénesis

observaron células irregulares, típicamente parenquimatosas, con pocos espacios entre ellas y con cloroplastos en la periferia.

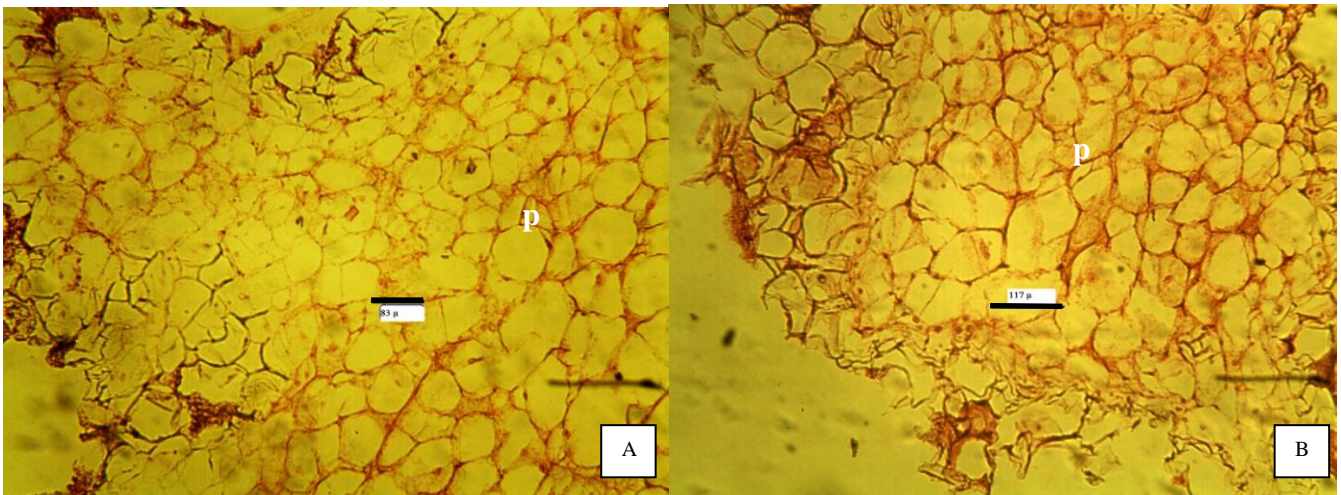


Fig.4.- A y B) (10x) cortes histológicos de callo no organogénico, se pueden observar células de parénquima, de tamaño uniforme y presencia de división celular, no se observa diferenciación (p-parenquima). Barra de la figura A 83 μ , barra en la figura B, 117 μ , cultivo de dos meses aprox., en el medio A

Se ha señalado que en la organogénesis se pueden observar tres fases, en la primera las células adquieren la competencia de desarrollo, que es la capacidad de reconocer señales hormonales u otras que lleven a un determinado programa de crecimiento, subsecuentemente estas señales inducen procesos que confieren a las células la capacidad de alterar sus tasas de desarrollo, finalmente la fase de diferenciación para formar un órgano (Banno *et al.*, 2001).

Lo cual coincide con las estructuras en el callo organogénico donde se observaron diferencias anatómicas, las cuales están formando zonas meristemáticas. Al respecto Veit, (2006), mencionó la importancia de la organogénesis en la regulación de producción y crecimiento celular por los procesos de diferenciación, en otras palabras como explica Carraro *et al.*, (2006), que las estructuras que forman el meristemo deben de distinguirse por características específicas tales como tamaño o arquitectura citoplasmática, así las células dentro de las estructuras se llegan a diferenciar y tener características de crecimiento por patrones de expresión de genes específicos.

Al respecto Mauseth (1978), (2006); describe que el desarrollo de un típico meristemo apical de angiospermas esta dividido en varias zonas, (Fig. 1), y menciona que en cactáceas se observan diferencias con respecto al meristemo de dicotiledóneas, como son: la túnica, la zona de células

madre centrales, llamado zona de células madre del haz vascular, células madre, zona periférica, estas zonas van a estar reguladas por mecanismos morfogenéticos, estos cambios morfogenéticos se observaron en los cortes histológicos de *Mammillaria pectinifera*, donde en callos organogénicos se identificaron diferentes zonas, tales como presencia de túnica, zona de las células madre, células madre centrales y zonas periféricas (Fig. 5 B y 6 A, B), en las cuales se estarían llevando los procesos de diferenciación y regulación de la organogénesis. También como parte de la diferenciación específica de cada una de estas zonas se observó crecimiento celular diferencial, presencia de vasos secundarios encargados de nutrir al nuevo órgano en formación y las zonas periféricas que comienzan a separar el nuevo tejido del original (Figs. 5 A y 7 A, B).

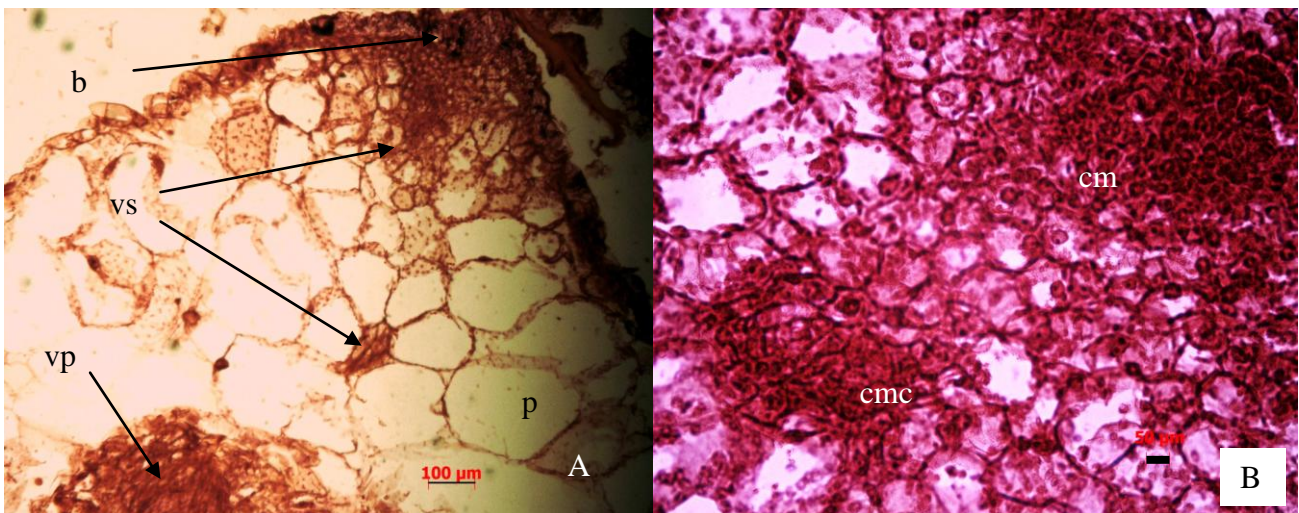


Fig. 5).- Callo organogénico: A (10 x), inicio de la formación del brote por activación del meristemo el cual forma una protuberancia (b), presencia de vasos secundarios (vs) y vasos primarios (vp), B (40 x), detalle de las células madre y las células madre centrales.

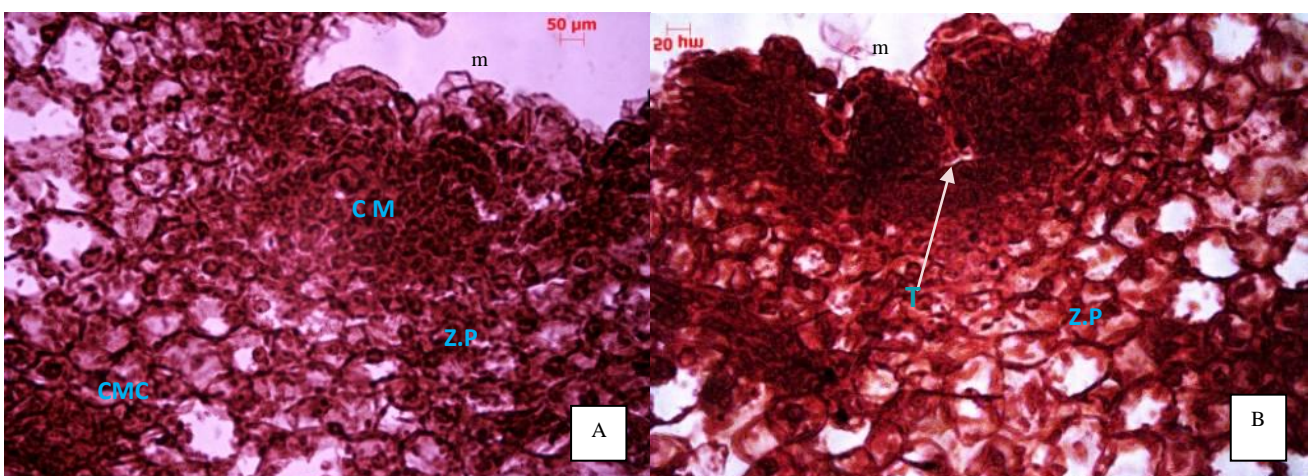


Fig. 6).- Callo organogénico: A y B (40 x) acercamiento de meristemos (m), se observó la presencia de zonas, como son: túnica (T), células madres centrales (CMC), la zona de células madre (CM) y las zona periférica (ZP). Cultivo de un mes aproximadamente en el medio B.

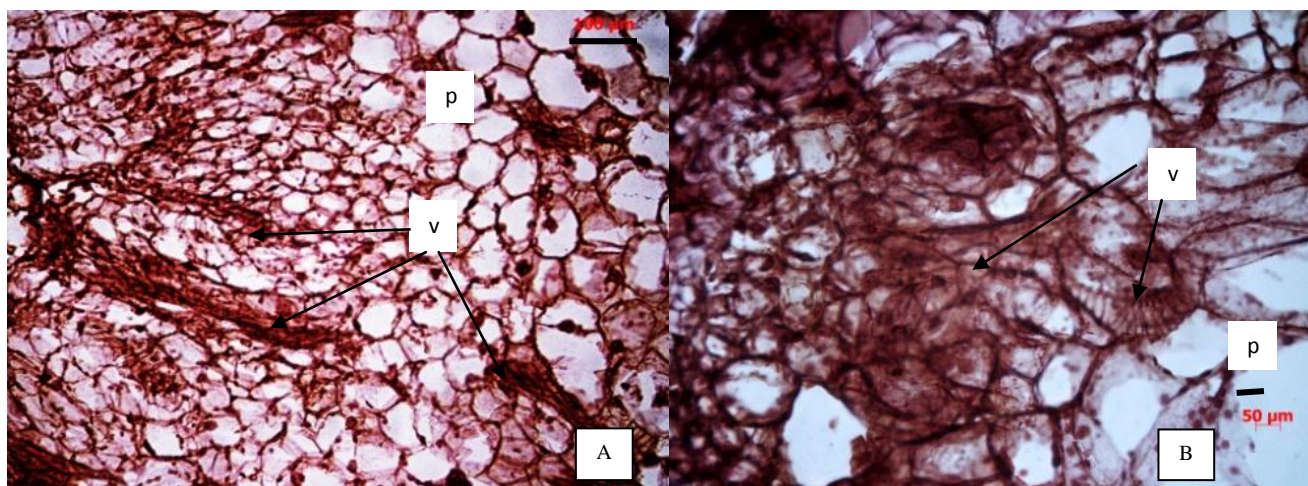
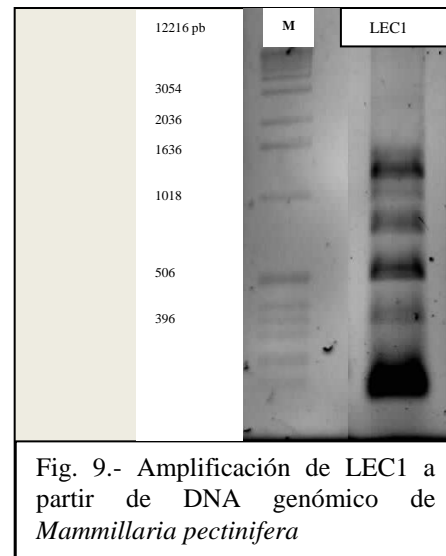
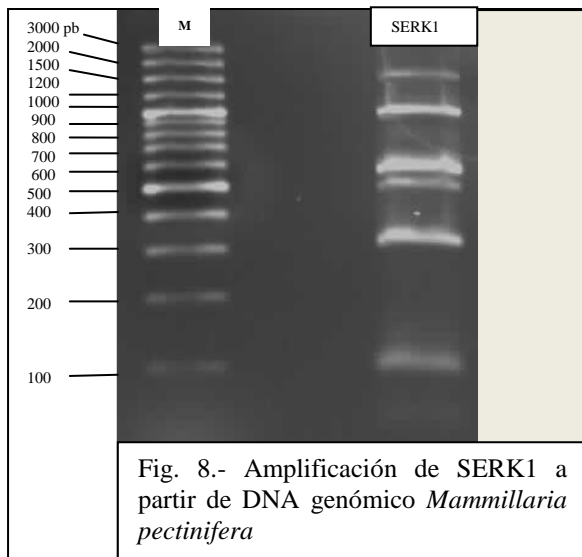


Fig. 7).- Callo organogénico: A (20 x), presencia de vasos secundarios (V), en esta imagen se observó la unión de estos vasos vasculares secundarios a los vasos primarios de la planta madre. B (40 x), detalle de la presencia de vasos secundarios.

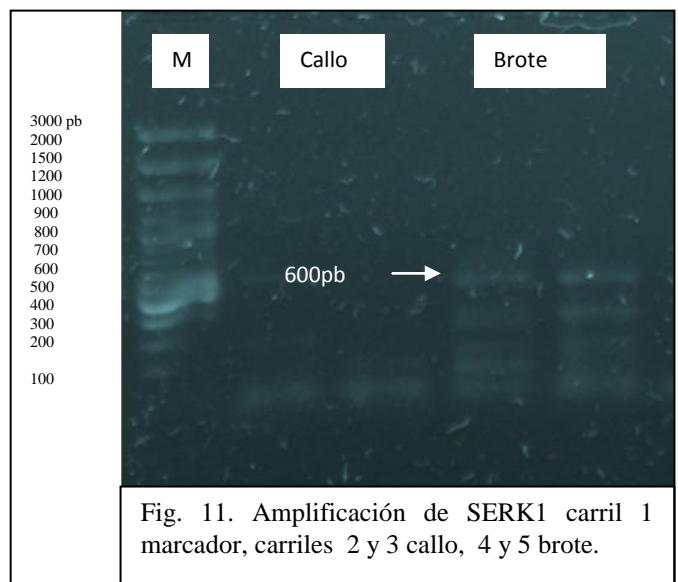
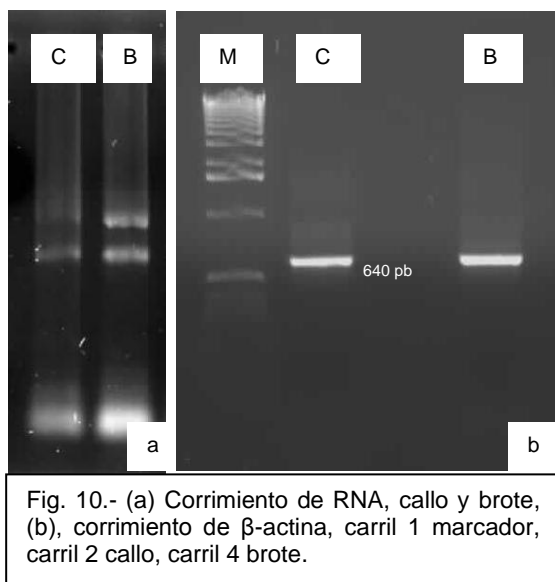
Además Carraro *et al.* (2006), mencionan que la coordinación celular es muy importante, para un mejor determinante en el desarrollo, tales como el intercambio de moléculas como son nutrientes, hormonas y proteínas, de las cuales muchas de estas interacciones bioquímicas entre células son esenciales para el desarrollo de un órgano.

Amplificación de genes: SERK1, es un gen que transcribe señales ambientales entre células para generar respuestas intracelulares específicas, uno de estos procesos es la embriogénesis (Salaj *et al.*, 2008, Thomas *et al.*, 2004, Nolan *et al.*, 2009, Pérez-Núñez *et al.*, 2009, Singla *et al.*, 2009). Otro de los genes es LEC1, el cual ha sido reportado como importante en el control de la embriogénesis temprana y tardía (Kumar *et al.*, 2008, Pérez-Núñez *et al.*, 2009, Schellenbaum *et al.*, 2008, Gaj *et al.*, 2005). Además de ser un regulador transcripcional capaz de establecer condiciones celulares suficientes para el inicio de la embriogénesis así como de mantener la identidad celular (Alemanno *et al.*, 2008).

Por lo que se realizó la amplificación en primera instancia en DNA genómico de *Mammillaria pectinifera*, con el propósito de ver si estos genes se encontraban presentes en el genoma. En los corrimientos con DNA genómico se observó la presencia de amplificación de los dos genes (ver figuras 6 y 7), sin embargo en estos corrimientos se observaron productos secundarios lo que pudo deberse a las regiones intrónicas presentes en el genoma.

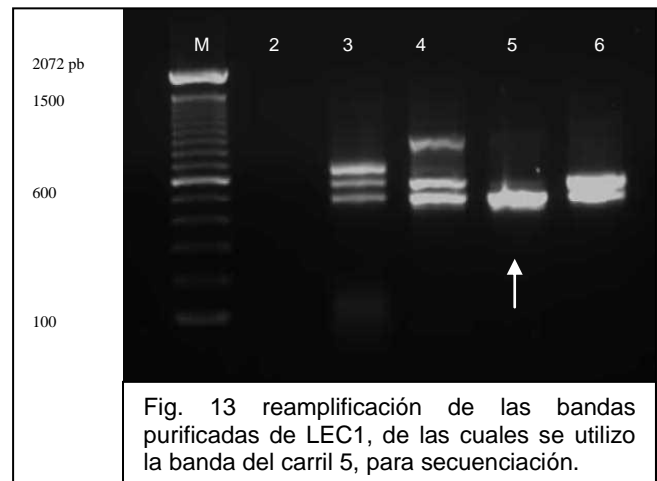
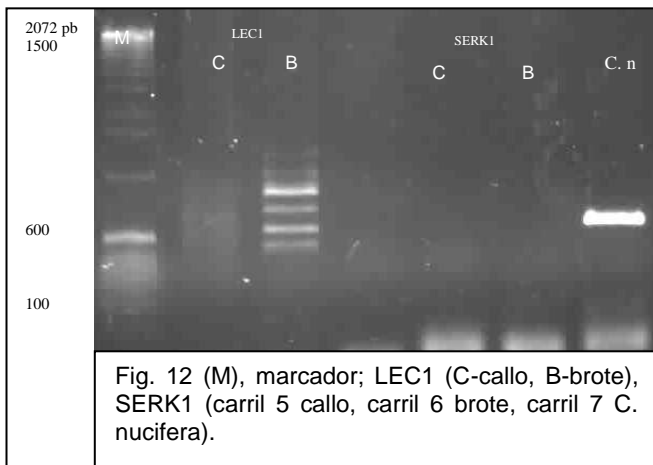


Posteriormente se realizó la amplificación en las muestras de callo no organogénico y organogénico, para lo que se obtuvieron los RNAs totales (ver figura 10-a), y sus cDNAs, para evaluar la calidad de los cDNAs se amplificó β -actina 2 como control o testigo (fig. 10-b), la cual tuvo una buena amplificación en las dos muestras (callo no organogénico y callo organogénico), obteniéndose un peso de 640 pb aproximadamente.



Una vez obtenidos los cDNAs se procedió a la amplificación de SERK1 observándose su amplificación solo en las muestras de callo organogénico, que ocurrió solo al principio de la organogénesis cuando en el callo organogénico apenas comenzaba a observarse la formación de órganos (figuras. 3 D y 9), sin embargo la amplificación de este gen fue tenue y generó productos

secundarios que en posteriores amplificaciones con muestras de callo con la presencia de órganos formados (Fig. 3 B C), ésta amplificación no se observó. La expresión de este gen se observó en *Cocus nucifera* utilizado como control (ver fig. 12), del cual se tomó tejido en cultivo con embriogénesis temprana, estos resultados son similares a lo que reportan en callos embriogénicos Kumar y Millan (2008); y Pérez-Nuñez *et al.* (2009), los cuales observaron la expresión de SERK1 al inicio de la embriogénesis, en este caso aun cuando se presentaron productos secundarios en la expresión, se observó una respuesta y ocurrió al principio de la organogénesis, estos resultados son similares a lo obtenido por Tomas *et al.*, (2004), los que trabajando con cultivos de callos embriogénicos y organogénicos de girasol, encontrando que SERK1, se encontraba presente en los dos cultivos al inicio del proceso de diferenciación, por lo que SERK1, estaría regulando el inicio del proceso de diferenciación no importando la vía (embriogénesis u organogénesis).



La expresión del gen LEC1, se observó en las muestras de callo organogénico, la cual no se presentó en callo no organogénico (fig. 12), sin embargo al igual que en SERK1 se produjeron productos secundarios. Estos productos se intentaron purificar para secuenciar y generar un primer específico, por lo que se cortaron, limpiaron y reamplificaron las bandas presentes en el gel. Una vez obtenido el producto se realizó un corrimiento del cual se utilizó la muestra presente en el carril 5 (fig 13), para secuenciación, sin embargo la secuencia de esta muestra no fue de la pureza esperada, por lo que ya no se pudo comparar en las bases da datos y generar un nuevo primer.

La presencia de estos dos genes en el cultivo organogénico de *Mammillaria pectinifera*, aun cuando presento productos secundarios es de gran importancia, pues no se había reportado su

presencia en el proceso de organogénesis en este tipo de plantas y tampoco se encontró algún reporte en el orden de las Caryophyllales. Sin embargo por la presencia de productos secundarios se propone la amplificación de nuevos primer, ya que en el caso de SERK, éste fue diseñado para *Cocus nucifera*, aun cuando Pérez-Núñez *et al.*, 2009, mencionan una gran similitud con la secuencia de SERK, reportada para *Arabidopsis*, este primer no funciono adecuadamente para *Mammillaria pectinifera*, por lo que se propone un nuevo primer diseñado en base a secuencias conservadas de *Gossypium hirsutum*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana* utilizando el programa CLUSTERW, se realizo la alineación ver apéndice 3.

Fw 5'GTTCCNGAYAATGGCTCCTTC3'

Rv 5'GCAACACTTCCATTRGCGATG3'

Primer propuesto de SERK1, en base a secuencias conservadas de dicotiledóneas.

Para observar su especificad, para el gen SERK1, se corrió el primer en BLAST, obteniéndose una alta similitud para el gen SERK1 en varias especies.

En el caso de LEC1, este primer fue diseñado a partir de una secuencia de *Bryophyllum*, sin embargo también se observaron productos secundarios, razón por la cual se diseño un primer degenerado haciendo la comparación de *Kalanchoe*, *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*, ver apéndice 3

Fw 5'GAGCAAGACMRRTWCATGCC3'

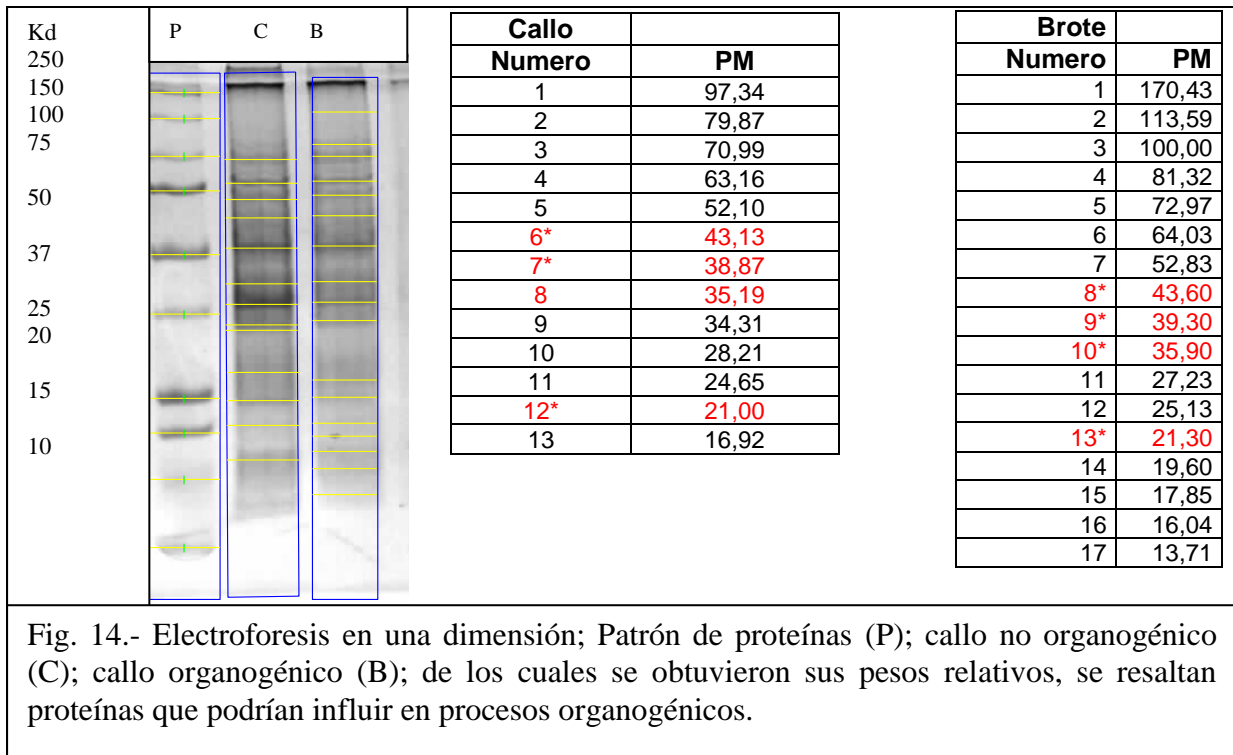
Rv 5'CCCGRTACTCGTTYGADCCCT3'

Primer propuesto de LEC1, en base a secuencias conservadas de dicotiledóneas.

En este caso también se realizó una prueba del primer en BLAST obteniendo una alta afinidad para el gen LEC1 y L1L, en varias especies.

Corrimientos de proteínas en primera dimensión (1D): se pudieron comparar los corrimientos: de callo no organogénico y callo organogénico en primera dimensión a los cuales se les tomó la imagen en el transiluminador, obteniéndose diferencias en cuanto al número de proteínas expresadas, pues en callo no organogénico se apreciaron 13 proteínas y en callo organogénico 17. También se compararon los pesos y la expresión de las bandas, se observaron cuatro bandas (43, 38, 35, 21 Kd) que de acuerdo a Helleboid *et al.* (2000) y Balen *et al.* (2002), podrían estar influyendo en los procesos de embriogénesis. Otras coincidencias fueron con respecto a la intensidad de las bandas, ya que al igual que Balen *et al.* (2002), también se observó que la

intensidad de las bandas en callos no organogénicos es mayor que en callos organogénicos (Fig. 14), sin embargo, estos patrones de proteína mostraron varias bandas muy próximas entre sí (isoformas), por lo que se buscó otra manera de obtener una mayor resolución.



Corrimiento de proteínas en segunda dimensión (2D): En la búsqueda de una mayor resolución en los patrones electroforéticos y poder identificar proteínas que intervienen en los procesos de organogénesis se optó por la electroforesis en segunda dimensión, la cual fue usada en dos especies de cactáceas; *Cereus peruvianus* (Mangolin *et al.*, 1999) y *Mammillaria gracilis* (Balén *et al.*, 2002), los cuales señalan que la electroforesis en segunda dimensión, es una buena herramienta para observar diferencias de expresión de proteínas entre cultivos creciendo *in vitro*.

En este trabajo, obtuvimos los corrimientos en 2D, con lo que se compararon patrones de proteínas de callos organogénico y no organogénicos de *Mammillaria pectinifera*, con lo que se tuvieron un total de 190 proteínas, de las cuales 62 proteínas solo se expresaron en callo no organogénico, 78 en callo organogénico y 50 estuvieron presentes en los dos tejidos. Las proteínas observadas se agruparon de acuerdo a su *pI* (punto isoeléctrico) y peso molecular, para poder

compararlas en la base de datos, obteniéndose la proteína teórica aproximada, así como su función (apéndice 4). De estas proteínas se agruparon las que estuvieran relacionadas a procesos de diferenciación, obteniéndose 47 proteínas de las cuales 28 están presentes en callo organogénico, 3 en callo no organogénico y 16 están presentes en los dos tejidos, además se marcaron 17 proteínas en callo organogénico, que tienen una expresión diferencial con respecto al callo no organogénico, las cuales son en su mayoría metabólicas (Tabla 1 y Fig. 15 y 16).

23) C,B MR	5.45	89.08	BGAL6_ORYSJ (Q10NX8) Beta-galactosidase 6. pl: 5.46, Mw: 89856
24) B* MR	5.5	82.84	ACCR2_ARATH (O80963) Serine/threonine-protein kinase-like protein CCR2. pl: 5.53, Mw: 82936
32) C, B* M	5.76	56.43	MTBC1_Vitis_vinifera (E0CSI1) bifunctional methylthioribulose- 1-phosphate deh. pl: 5.76, Mw: 56152 MTBC_Arabidopsis_thaliana (Q9FN41) bifunctional methylthioribulose- 1-phosphate dehydrogenase. pl: 5.79, Mw: 56521
34) B* M	5.97	56.43	DCE_Solanum_lycopersicum (P54767) Glutamate decarboxylase. pl: 5.96, Mw: 56786
39) C, B* M	5.81	48.94	E137_ARATH (Q9M069) Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7. pl: 5.83, Mw: 50645
43) B* R	5.91	44.23	EFTM_ARATH (Q9ZT91) Elongation factor Tu, mitochondrial. pl: 5.92, Mw: 44099
48) C,B MR	5.73	40.58	SRK2G_ARATH (P43292) Serine/threonine-protein kinase SRK2G. Chain: 1-353, pl: 5.71, Mw: 40198
49) C, B* MR	5.86	40.85	NGA3_ARATH (Q9MAN1) B3 domain-containing transcription factor NGA3. pl: 5.86, Mw: 40288
55) C E	5.08	38.45	CCA33_ARATH (A0MEB5) Cyclin-A3-3. pl: 5.05, Mw: 38130
57) C M	5.54	35.57	E1314_ARATH (Q9ZQG9-3) Isoform 3 of Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14 pl: 5.55, Mw: 35376
67) C,B* M	6.3	104.46	Y1534_ARATH (COLGG7) Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinas... pl: 6.32, Mw: 104790
68) C,B*	6.42	104.46	ERL1_ARATH (COLGW6) LRR receptor-like serine/threonine- protein kinase ERL1. Chain: 26-966, pl: 6.44, Mw: 103742
70) B*	6.26	95.32	Y5188_ARATH (Q9FZB1) Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinas... pl: 6.24, Mw: 94708
72) C,B* M	6.46	95.32	Y5344_ARATH (COLGG9-2) Isoform 2 of Probable LRR receptor-like serine/threonine-. pl: 6.44, Mw: 96489
73) B M	6.22	87	AGD2_ARATH (Q9C6C3) ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD2. pl: 6.21, Mw: 87803
76) C,B* M	6.03	66.2	LK110_ARATH (Q3E884) Putative L-type lectin-domain containing receptor kinase pl: 6.04, Mw: 66074
77) C,B*	6.1	66.2	MPK8_ARATH (Q9LM33) Mitogen-activated protein kinase 8. pl: 6.09, Mw: 66232
79) C,B* M	6.85	61.43	Y1719_ARATH (O04567) Probable inactive receptor kinase At1g27190. pl: 6.87, Mw: 62706
82) B*	6.3	59.93	G6PD1_ARATH (Q43727) Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1, chloroplastic. pl: 6.33, Mw: 59990
90) B* M	6.0	45	KNAP1_MALDO (O04134) Homeobox protein knotted-1-like 1. pl: 6.01, Mw: 45172
96) B* M	6.26	43.06	STM_Brassica_oleracea (Q9M6D9) Homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS. pl: 6.26, Mw: 43142
99) C, B M	6.6	43.06	THIK5_ARATH (Q570C8-2) Isoform 2 of 3-ketoacyl-CoA thiolase 5, peroxisomal. pl: 6.62, Mw: 43173
101) B* M	6.26	39.41	WRK35_ARATH (O64747-2) Isoform 2 of Probable WRKY transcription factor 35 pl: 6.26, Mw: 39095

113) C, B R	6.23	33.64	GBF1_ARATH (P42774-2) Isoform 2 of G-box-binding factor pl: 6.25, Mw: 33675
122) B EF	6.22	19.44	AGL31_ARATH (Q9FPN7-2) Isoform 1 of Agamous-like MADS-box protein AGL31 OS pl: 6.21, Mw: 19981
126) B* M	7.13	70.36	CRK10_ARATH (Q8GYA4) Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10. pl: 7.13, Mw: 70178
128) B* M	7.42	70.36	CRK5_ARATH (Q9C5S8-2) Isoform 2 of Cysteine-rich receptor-like protein kinase 5... pl: 7.44, Mw: 73760
134) C,B EF	7.22	59.93	PME_Brassica napus (P41510) Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor. Chain: 23-584, pl: 7.20, Mw: 60829
136) B M	7.18	54.88	1A11_ARATH (Q06429) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein 1. pl: 7.16, Mw: 55003
139) C, B* MR	7.63	50.91	CIPK3_ARATH (Q2V452-1) Isoform 1 of CBL-interacting serine/threonine-protein kin... pl: 7.63, Mw: 51692
142) B* M	7.14	43.25	GATL9_ARATH (O04536) Probable galacturonosyltransferase-like 9. pl: 7.16, Mw: 44259
148) B M	7.6	36.05	GBLPA_ARATH (O24456) Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like prot. pl: 7.61, Mw: 35748
149) B* M	7.73	36.05	PER34_ARATH (Q9SMU8) Peroxidase 34. pl: 7.71, Mw: 35696
150) C, B* M	7.13	34.41	PER61_ARATH (Q9FLV5) peroxidase 61. pl: 7.11, Mw: 34651
151) B* MR	7.1	32.88	CTL1_ARATH (Q9MA41) Chitinase-like protein 1. pl: 7.11, Mw: 32940
152) B* MR	7.35	30.09	ULT1_Arabidopsis thaliana (Q8GZA8) Protein ULTRAPETALA 1., pl: 7.34, Mw: 26744
153) B* MR	7.53	29.61	MYB3_ARATH (Q9S9K9) Transcription factor MYB3. pl: 7.54, Mw: 29352
155) C EF	7.6	26.44	GATA4_ARATH (O49743) GATA transcription factor 4. pl: 7.61, Mw: 26467
156) B* M	7.73	24.77	ERF2_TOBAC (Q40479) Ethylene-responsive transcription factor 2. pl: 7.74, Mw: 25563
157) B* M	7.83	24.77	RA210_ARATH (Q9SW63) Ethylene-responsive transcription factor RAP2-10. pl: 7.83, Mw: 21362
159) B* MR	7.4	23.82	ULT1_ARATH (Q8GZA8) Protein ULTRAPETALA 1. pl: 7.34, Mw: 26744
174) B MR	8.35	39.41	B3GT9_ARATH (Q5XEZ1) beta-1,3-galactosyltransferase 9. pl: 8.36, Mw: 39059
178) B M	8.53	31.72	CHIT_SOLTU (P05315) Endochitinase. pl: 8.53, Mw: 31737
181) B* MR	8.9	25	EXP11_ARATH (Q9LNU3) Expansin-A11. Chain: 21-252, pl: 8.91, Mw: 24818
186) B* R	8.9	14.23	GRP3_ARATH (Q9SL15-2) Isoform 2 of Glycine-rich protein 3 pl: 8.94, Mw: 13656
189) B* M	9.66	53.87	ABAH4_ARATH (Q9LJK2) Abscisic acid 8'-hydroxylase 4. pl: 9.66, Mw: 53922
190) B* R	9.66	36.53	WRK74_ARATH (Q93WU6) Probable WRKY transcription factor 74. pl: 9.67, Mw: 36514

Tabla 1.- Listado de 47 proteínas de importancia en los procesos de diferenciación, expresadas en callo organogénico (B) y no organogénico (C), reportadas en la base de datos Swiss Uniprot, utilizando TagIdent tool, de acuerdo a su p. I. y su PM.

Letras M) metabólica, R) respuesta, EF) estructural y/o función.

La mayor cantidad de proteínas presentes en los corrimientos se observaron en un rango de 20 a 60 kD y en un rango de pH de 4 a 7.5 , lo cual es similar a lo obtenido por Nogueira *et al.* (2007), los

cuales mencionan que la mayoría de las proteínas presentes en corrimientos de *Vigna unguiculata*, se observaron en un rango con tendencia ácida.

Salaj *et al.* (2008), mencionan que varios marcadores han sido reportados para distinguir entre cultivos embriogénicos y no embriogénicos, entre los principales mencionan varias proteínas como son EP2, arabino-glicoproteínas (AGPs) y quitinasas.

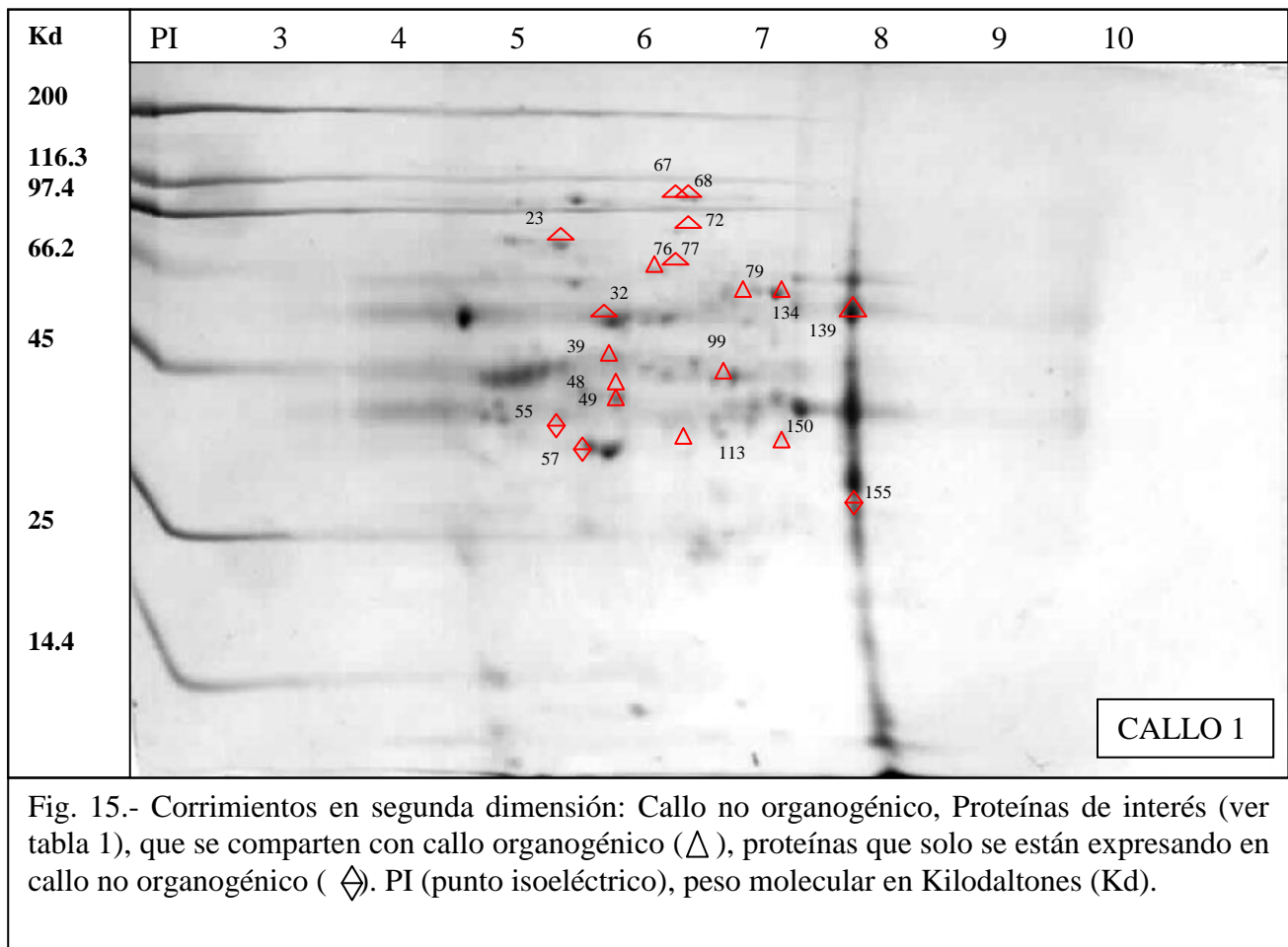


Fig. 15.- Corrimientos en segunda dimensión: Callo no organogénico, Proteínas de interés (ver tabla 1), que se comparten con callo organogénico (Δ), proteínas que solo se están expresando en callo no organogénico (\diamond). PI (punto isoeléctrico), peso molecular en Kilodaltones (Kd).

En las proteínas observadas y caracterizadas como promotoras o que tienen influencia en el proceso de organogénesis, se distingue la expresión de receptores de unión a cinasas (RLKs), aun cuando no se observó la proteína expresada por SERK1, la presencia de las RLKs es importante ya que se han mencionado de gran importancia en la historia de vida de la planta, una de sus funciones es recibir señales extracelulares y propagarlas intracelularmente (Shiu *et al.*, 2004,

Sharma y Millam 2008), en este caso es posible que estén regulando procesos relacionados con la división celular (Tabla 1).

Otro grupo de proteínas que se encontraron presentes, en los callos de *Mammillaria pectinifera*, fueron glicoproteínas (GPs), algunas de las cuales se presentaron tanto en callo organogénico como en callo no organogénico y dos solo en callo organogénico.

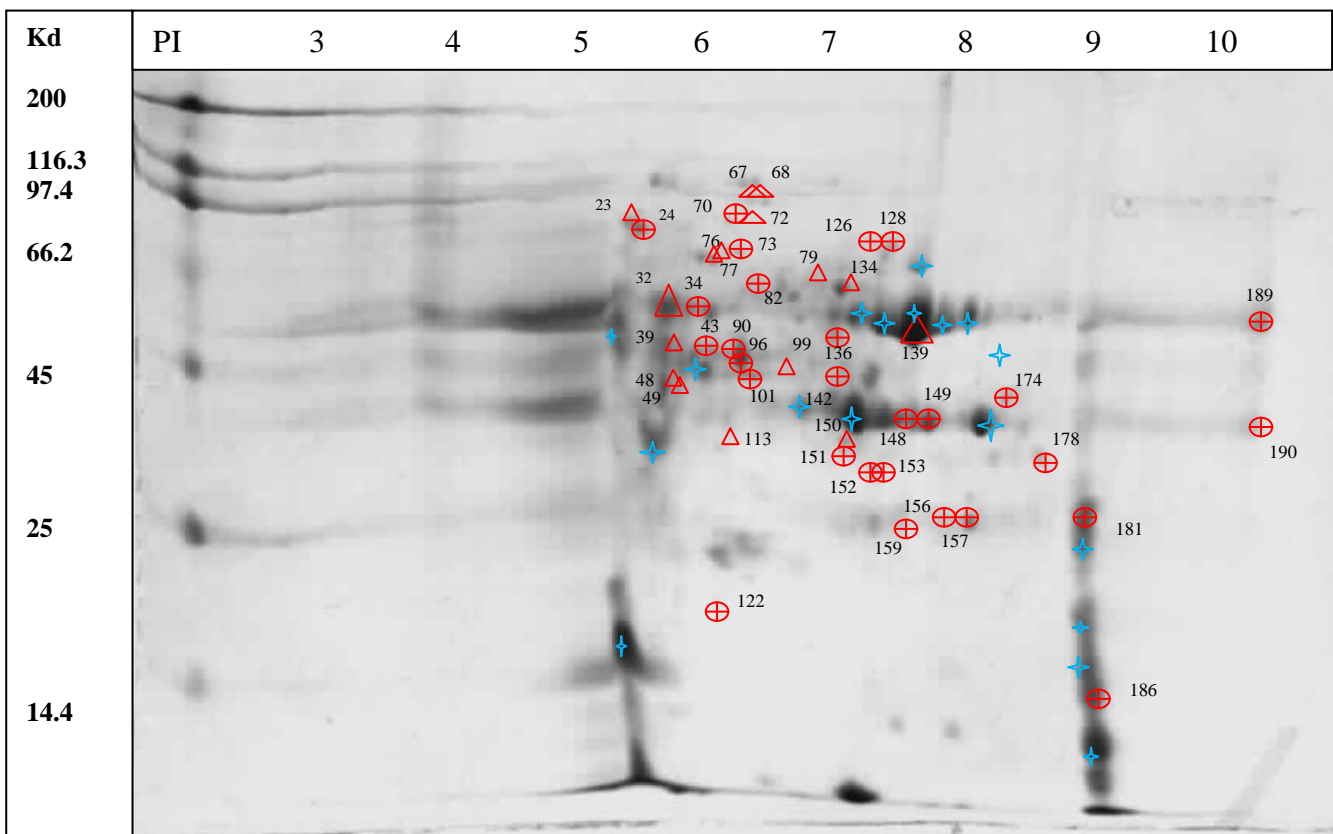


Fig. 16.- Corrimientos en segunda dimensión: Callo organogénico, Proteínas de interés (ver tabla 1), que se comparten con callo no organogénico (Δ), proteínas de interés que solo se están expresando en el callo organogénico (\oplus) y proteínas que aumentan su expresión con respecto a callo no organogénico ($+$), las cuales pudieran estar influyendo en el proceso de organogénesis. PI (punto isoeléctrico), peso molecular en Kilodaltones (Kd).

La presencia de estas proteínas concuerda con lo obtenido por Balen *et al.* (2002), en cultivo de *Mammillaria gracilis*, donde señalan que estas proteínas son altamente reguladas durante el desarrollo de la planta y están correlacionados con la diferenciación, pues se ha visto que en el desarrollo de la planta influyen en el proceso de glicosilación, además que en procesos de organogénesis aumenta su concentración y presencia.

Otras proteínas presentes y que han sido consideradas importantes en los procesos de diferenciación son quitinasas, pectinasas y peroxidasas, las cuales estuvieron presentes en callo organogénico y también han sido reportadas por Nogueira *et al.* (2007) y Balen *et al.* (2002).

La presencia de estas proteínas estarían regulando varios procesos, Helleboid *et al.* (2000) las han nombrado como parte de las proteínas involucradas en la patogénesis (PR), y sugieren que estas proteínas están relacionadas con la embriogénesis.

Al respecto Beers y Freeman, (1997), consideran a estas proteínas como fundamentales para los procesos de muerte celular programada (pcd), que en cultivos son distintos a los procesos patológicos y necróticos de muerte celular. Estos eventos ocurren en la diferenciación terminal, lo que resulta en la formación de xilema primario y secundario, esto está caracterizado por la presencia de traqueidas, las cuales son formadas por la actividad del núcleo y citoplasma, por lo que concuerda con lo obtenido pues en el tejido organogénico se determinó la presencia de estas proteínas así como la presencia de traqueidas (Fig. 7 B, 16 y Tabla 1).

Además de las anteriores proteínas se encontró la proteína asociada a el gen STM, la cual solo se presentó en callo organogénico, este gen se considera importante en la regulación de la morfogénesis del meristemo (Hake *et al.*, 2004, Hjortswang *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

a).- Con el análisis histológico, se pudieron observar diferencias estructurales de *Mammillaria pectifera*, entre callos no organogénicos y callos organogénicos, en callos no organogénicos, se presentó un crecimiento uniforme, con presencia de células parenquimatosas, las cuales estuvieron muy próximas entre sí, mientras que en callo organogénico se observó la presencia de meristemas los cuales estaban estructurados en zonas diferenciables, en las cuales se estima que se estarían regulando los procesos organogénicos.

b).- Se observó la presencia de SERK1 y LEC1, en DNA genómico y la expresión de los mismos en callos organogénicos, el primero solo al inicio del proceso de organogénesis, por lo que se demuestra que estos genes están regulando el proceso de organogénesis.

c).- Por otro lado en los corrimientos electroforéticos en una dimensión se observó la presencia de 13 proteínas en callo no organogénico y 17 para callo organogénico, entre estas bandas se observaron 4 reportadas como organogénicas (43, 38, 35, 21 Kd).

d).-En los corrimientos en 2D, se obtuvieron un total de 190 proteínas, de las cuales 62 solo se expresaron en callos no organogénicos, 78 en callo organogénico y 50 estuvieron presentes en los dos tejidos.

e).- Utilizando sus *pI* y *PM* y la base de datos, se determinó su probable función, con lo que se obtuvieron 47, proteínas que estarían implicadas en el proceso de diferenciación, de las cuales; 28 estuvieron presentes en callo organogénico, 3 en callo no organogénico y 16 estuvieron presentes en los dos tejidos, además 17 proteínas que se observó aumentaron su expresión con respecto a callo no organogénico

f).- Entre estas proteínas se observaron la presencia de proteínas expresadas por (RLKs), glicoproteínas (GPs), quitinasas, pectinasas y peroxidasas, las cuales estarían regulando el proceso de organogénesis.

g).- Con lo obtenido en este trabajo se tiene un marco de referencia en procesos de expresión genética y bioquímica de los procesos organogénicos en Cactáceas creciendo *in vitro*,

específicamente en *Mammillaria pectinifera*, lo cual nos permitirá plantear trabajos de propagación más eficientes y en algún momento su reintroducción a su lugar de origen.

6.- Bibliografía.

-Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H., and Tasaka M. 1997. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*. 9:841-857.

-Aida M., Tasaka M. 2006. Genetic control of shoot organ boundaries. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 72-77.

-Albrecht C., Russinova E., Hecht V., Baaijens E., and Vries S. 2005. The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant Cell*. 17: 3337-3349.

-Albrecht C., Russinova E., Kemmerling B., Kwaaitaal M., and Vries S. 2008. Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and-independent signaling pathways. *Plant Physiology*. 148: 610-619.

-Alemanno L., Devic M., Nicmenak N., Sanier C., Guilleminot J., Rio M., Verdeil J., Montoro J. 2008. Characterization of *leafy cotyledon 1-like* during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*. 227: 853-866.

-Altesor A., Ezcurra E. 2003. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. *Journal of Arid Environments*. 53: 557-567.

-Arias M. S. 1997. Distribución de las cactáceas. *Suculentas Mexicanas /Cactáceas*. CVS, CONABIO, SEMARNAP, UNAM. CVS publicaciones S.A. de C.V. 19-25.

-Balén B., Milosevic J., Krsnik-Rasol. 2002. Protein and glycoprotein patterns related to morphogenesis in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *Tissue culture. Food Technology Biotechnology* 40 (4): 275-280.

-Balén B., Krsnik M., Simeon V., 2003. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *Tissue culture. Journal of Plant Physiology*. 160: 1401-1406.

- Banno H., Ikeda Y., Niu Q., and Chua N. 2001. Overexpression of Arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *The Plant Cell*. 13: 2609-2618.
- Beers E., and Freeman T. 1997. Proteinase activity during tracheary element differentiation in *Zinnia* mesophyll cultures. *Plant physiol.* 113: 873-880.
- Bishop-Hurley S., Gardner C. R., Walter C. 2003. Isolation and molecular characterization of genes expressed during somatic embryo development in *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 267-281.
- Caba M. J., Luz C. M., Fernández B., Gresshoff M. P., Ligeró F. (2000). Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta* 211: 98-104.
- Carraro N., Peaucelle A., Laufs P., Traas J. 2006. Cell differentiation and organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Molecular Biology*. 60: 811-826.
- Chen L., and Luthe D. 1987. Analysis of protein from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oriza sativa* L.) calli. *Plant Science*. 48: 181-188
- Chomczynski P., and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- CITES, 2011. Appendix I. <http://www.cites.org/esp/app/index.shtml>.
- Francis D., Halford N. G. 2006. Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Molecular Biology*. 60: 981-993.
- Gaj M., Zhang S., Harada J. 2005. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*. 222: 977-988
- Gegas V., Doonan J. 2006. Expression of cell cycle genes in shoot apical meristems. *Plant Molecular Biology*. 60: 947-961.
- Gehrig H. H., Winter K., Cushman J., Borland A., and Taybi T. 2000. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18: 369-376.
- George F. E., and Sherrington D. P. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Tomo 1. British Library 386pp.

- Giosti P., Vitti D., Fiocchetti F., Colla G., Saccardo F., Tucci M. 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. 95: 319-332.
- Golz J. 2006. Signaling between the shoot apical meristem and developing lateral organs. *Plant Molecular Biology*. 60: 889-903.
- Grotkass C., Lieberei R., and Preil W. 1995. Polyphenoloxidase-activity and -activation in embryogenic and non-embryogenic suspension cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Plant Cell Report*. 14: 428-431.
- Gúzman, U; Arias, M. S.; Dávila, A. P. 2003. Catálogo de Cactáceas. UNAM, CONABIO. 1ª edición. México D. F.
- Hake S., Smith H. M. S., Holtan H., Magnani E., Mele G., Ramirez J. 2004. The role of *KNOX* genes in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 125-54.
- Helleboid S., Hendriks T., Bauw G., Inze D., Vasseur J. and Hilbert J. 2000. Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR protein. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 51(358): 1189-1200.
- Hjortswang H., Larsson A., Bharathan G., Bozhkov P., Arnold S., Vahala T. 2002. *KNOTTED1*-like homeobox genes of gymnosperm, Norway spruce, expressed during somatic embryogenesis. *Plant Physiology Biochemical*. 40: 837-843.
- Hubstenberger J. F., Glayton P. W., and Phillips G. C. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae), in Bajaj, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 20, High-tech and micropropagation IV. Berlin, Heidelberg Springer-Verlag. Pp. 49-68.
- Itoh J., Sato Y., Nagato Y., Matsuoka M. 2006. Formation, maintenance and function of the shoot apical meristem in rice. *Plant Molecular Biology*. 60: 827-842.
- Jankiewicz. 2003. Reguladores del crecimiento desarrollo y resistencia en plantas, Propiedades y acción. Vol.1. Universidad Autónoma Chapingo. Ediciones Mundi Prensa, México, pp 487.
- Jin-Zhuo D., and Dustan D., 1997. Endochitinase and β -1,3-glucanase genes developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*. 201:189-194.

- Jin-Zhuo D., and Dustan D. 1999. Cloning and characterization of six embryogenesis associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*. 39: 859-864.
- Joersbo M., Andersen J., Okkels F., and Rajagopal R. 1989. Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiologia Plantarum*. 76:10-16.
- Kondo A., Nose A., Ueno O. 1998. Leaf inner structure and immunogold localization of some key enzymes involved in carbon metabolism in CAM plant. *Journal of Experimental Botany*. 49 (329): 1953-1961.
- Krsnik M., C&ipc'ic'H., Hage' ge D. 1999. Isoesterases related to differentiation in plant tissue culture. *Chemico-Biological Interactions*. 119-120: 587-592.
- Kumar S. S., Millan S., Hein I., Bryan G. 2008. Cloning and molecular characterisation of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta*. 228: 319-330.
- Kwong R., Bui A., Lee H., Kwong L., Goldberg R., and Harada J. 2003. Leafy cotyledon1-like defines a class of regulators essential for embryo development. *The plant Cell*. 15: 5-18.
- Laufs P., Peaucelle A., Morin H., and Traas J., 2004. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size in *Arabidopsis* meristems. *Development*. 131(17):4311-4322.
- Leal-Rojas P. A., Gutierrez-Moraga A., Destefano-Beltran L., Salvo-Garrido A., Gidekel M. 2007. Expresión diferencial de genes en plantas de *Cala (Zantedeschia spp.)*. *Agrociencia* 41:141-152.
- O'Leary M. C. and Boyle T.H. 1998. Segregation at isozyme locus Lap-1 in *Schlumbergera* (Cactaceae) is caused by linkage with the gametophytic self-incompatibility (S) locus. *The American Genetic Association* 89: 206-210.
- Mou L., Miller H., Li J., Wang E., Chalifour L. 1994. Improvement to the differential display method for gene analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 119 (2):564-569.
- Macleod M. R., Davies H. V., Jarvis B. S. and Taylor M. A. 1999. Characterisation of genes isolated from a potato swelling stolon cDNA library. *Potato Research*. 42:31-42.

- Malda G., Suzan H., and Backhaus R. 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crasulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*. 81:71-87.
- Mangolin C., Ottoboni L., Machado M. 1999. Two-dimensional electrophoresis of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) callus tissue proteins. *Electrophoresis*. 20: 626-629.
- Mauseth J. 1978. An investigation of the morphogenetic mechanisms which control the development of zonation in seeding shoot apical meristems. *American Journal of Botany*. 65 (2): 158-167.
- Mauseth J. 1993. Medullary bundles and the evolution of cacti. *American Journal of Botany* 80 (8): 928-932.
- Mauseth J. 2004. Giant shoot apical meristems in cacti have ordinary leaf primordia but altered phyllotaxy and shoot diameter. *Annals of Botany* 94: 145-153.
- Mauseth J. 2006. Structure-function relationships in highly modified shoot of cactaceae. *Annals of Botany* 98: 901-926.
- McKinney E., and Meagher R. 1998. Members of the Arabidopsis actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics* 149: 663-675.
- Mikola M. 2001. Electrophoresis studies on endoproteinase of oat grain. EKT series 1219 University of Helsinki Department of Food Technology. 58 p.
- Moebius-Goldammer, K. G.; Mata-Rosas, M; Chávez-Ávila, V. M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem) K. Schum. (Cactaceae) an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant*. 39:388-393
- Norma Oficial Mexicana, 2002 Norma Oficial Mexicana, 2002. (Nom-059-ECOL-2001-2002). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección (6 de Marzo del 2002) México, pp. 1-81.
- Nogueira F., Gonçalves E., Jereissati E., Santos M., Costa J., Oliveira O., Soares A., Domond G., Campos F. 2007. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Report*. 26: 1333-1343.

- Nolan K., Kurdyukov S., and Rose R. 2009. Expression of the SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*. 60 (6): 1759-1771.
- Pérez-Núñez M., Souza R., Sáenz L. 2009. Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep*. 28: 11-19.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa, 431p.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*. 14: 3-21.
- Sakakibara H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57:431-449.
- Salaj J., Recklinghausen I., Hecht V., Vries S., Schel J., Lammeren A. 2008. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 709-714.
- Sass J. 1958. *Botanical microtechnique; Botany; Anatomy; Morphology*. Edit. Iowa State College Press. 3rd edition. 228 p.
- Schellenbaum P., Jacques A., Maillot P., Bertsch C., Mazet F., Farine S., Bernard W. 2008. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3*, and *VvL1L* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Report*. 27:1799-1809.
- Scofield S., and Murray J. 2006. The evolving concept of the meristem. *Plant Molecular Biology*. 60: V-VII.
- SEMARNAP 1997. Programa de conservación de la vida silvestre y diversificación productiva en el sector rural. SEMARNAT. México.
- Seol E., Jung Y., Lee J., Cho C., Kim T., Rhee J., Lee S. 2008. In planta transformation of *Notocactus scope* cv. *Soonjung* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Report*. 27: 1197-1206.
- Sharma S., Millan S. 2008. Cloning and molecular characterization of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. 228: 319-330.

- Shiu S., Karlowski W., Pan R., Tzeng Y., Mayer K. 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and Rice. *The Plant Cell*. 16: 1220-1234.
- Silva-Ortega C., Ochoa-Alfaro A., Reyes-Agüero J., Aguado-Santacruz G., and Jimenez-Bremont J. 2008. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol. Biochem.* 46 (1): 82-92.
- Singla B., Khurana J., and Khurana P. 2009. Structural characterization and expression analysis of the SERK/SERL gene family in Rice (*Oriza sativa*). *International Journal of Plant Genomics* Vol. 2009. Article ID 539402. 8 p.
- Thakare D., Tang W., Hill K., and Perry S. 2008. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in Arabidopsis and soybean. *Plant Physiology*. 146: 1663-1672.
- Thomas C., Meyer D., Himber C., Steinmetz A. 2004. Spatial expression of sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 35-42.
- Tooket F., Battey N. 2003. Model of shoot apical meristem function. *New Phytologist*. 159 (1): 37-52.
- Valverde P., Zavala-Hurtado J., Jiménez-Sierra C., Rendón-Aguilar B., Cornejo-Romero A., Rivas-Arancibia S., López-Ortega G., Pérez-Hernández A. 2009. Evaluación del riesgo de extinción de *Mammillaria pectinifera*, cactácea endémica de la región de Tehuacan-Cuicatlan. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 219-230.
- Veit Bruce. 2006. Stem cell signaling networks in plants. *Plant Molecular Biology*. 60: 793-810
- Vroeman W. C., 2003 Mordhost P. A., Albrecht C., Kwaaitaal and de Vries. The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* Gene Is Required for Boundary and Shoot Meristem Formation in Arabidopsis. *The plant cell*. Vol 15: 1563-1577
- Zhang S., Williams-Carrier R., Jackson D., Lemaux P. 1998. Expression of CDC2Zm and KONOTTED1 during in-vitro axillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (*Zea mays* L.) and barley (*Hodeum vulgare* L.). *Planta*. 204: 542-549.

Bibliografía complementaria para proteínas.

- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J Biochem. Biophys. Methods.* 6: 317-339.
- Garcia H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamina: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG.* 1(2): 31-41
- Westermeier R. 2005. *Electrophoresis in practice.* Edit. WILEY-VCH. 466 p.
- Westermeier R., Naven T., 2002. *Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis.* Edit. WILEY-VCH Verlag GmbH (electronic). 316 p.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., and Weiss W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 21: 1037-1053.
- Görg A., Walter W., and Dunn M. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Hummon B. A., Lim R. S., Difilippantonio J. M. and Ried T. 2007. Isolation and solubilization of proteins alter TRIZOL[®] extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* 42: 467-472.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- O'Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 250 (25):4007-4021.
- Rabarjo T. J., Widjaja I., Roytrakul S., and Verpoorte R. 2004. Comparative proteomics of *Cannabis sativa* plant tissues. *Journal of Biomolecular Techniques.* 15: 97-106.
- Ribeiro C. I., Simao S. P., Bloch C., Llamota-Zarate R., Campos F. 2001 Isolation and characterisation of a reserve protein from the seeds of *Cereus jamacaru* (Cactaceae) Brazilian *Archives of Biology and Technology.* 44 (4): 331-335.

-Sheen H., and Ali-Khan Z. 2005. Protein sample concentration by repeated loading onto SDS-PAGE. *Anal Biochem.* 343 (2): 338-340.

-Zarre S., Khodaei Z., Karamali Z., Nikman V., Mirmasoumi M. 2007. Isoenzyme variation patterns and species concept in *Astragalus gossypinus* and *Astragalus persicus* complexes (fabaceae) in Iran. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 757-763.

-Yamamoto I., and Duich M. J. 1994. Electrophoretic identification of cross-pollinated Bentgrass species and cultivars. *Crop Science.* Vol. 34 May-Jun.

APÉNDICE

1.-Reactivos para geles desnaturalizantes (Primera y Segunda dimensión)- SDS-PAGE.

Acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%) (Laemmli, 1970)

Acrilamida 150 g (manéjese con cuidado)
Bisacrilamida 4 g

Se disuelve la acrilamida en 200 ml de agua destilada y la bisacrilamida en 100 ml a baño María a 37° C. Se mezclan las soluciones y se ajusta el volumen a 500 ml, se almacena a 4° C en frasco ámbar.

SDS 10 %

Dodecil Sulfato de Sodio 10 g
Agua destilada 100 ml

Regulador para el gel concentrador (SB 5x)

Tris HCl 0.5 M pH 6.8: Pesar 12.1 de tris base, disolver en 120 ml de agua y ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado, aforar a 200 ml.

Regulador para gel de resolución (RB 5x).

Tris HCl 2M a un pH 8.8: pesar 121.1g de Tris base y disolver en un volumen menor a 500 ml, ajustar el pH a 8.8, con HCl concentrado y aforar a 500 ml.

Regulador de corrimiento (10x).

Tris-base 15 g
Glicina 72 g

Aforar a 500 ml.

Para usarse diluir 100 ml del regulador de corrimiento 10x, 890 ml de agua y 10 ml de SDS al 10%.

Solución de persulfato de amonio.

Persulfato de amonio al 10% (APS), pesar 10 mg de persulfato de amonio en un tubo eppendorf y disolver en 100 µl de agua destilada, siempre se prepara antes de hacer los geles.

Cantidades usadas en la preparación del gel al 10%

componentes	Gel de resolución 10 %	Gel de concentración 5%**
Agua destilada	4 ml	2.85 ml
RB	2.5 ml	-----
SB	-----	1.25 ml
Acril-bisacrilamida	3.3	0.83 ml
SDS	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
APS	50 µl	50 µl

** El gel de concentración solo en el caso de corrimiento normal, este no se usa en corrimiento en segunda dimensión.

2.- Soluciones o buffer 2D.

1.- a) Buffer de rehidratación

	Concentración final	concentración	
Urea (PM 60.06)	8 M	12 g	2.4 g
CHAPS	2% (W/V)	0.5 g	100 mg
Pharmalite IPG Buffer (el mismo rango que las tiras)	0.5 o 2% (V/V)	125 o 500 µl	26 µl
1% de solución de azul de bromofenol (ver solución)	0.002%	50 µl	10 µl
Agua bidestilada	-----	A 25 ml	A 5 ml

NOTA: 7 mg de DTT, es adicionado a una alícuota de 2.5 ml, antes de su uso
Detergentes sustituyentes del CHAPS pueden ser usados entre los que están TRITON X-100, NP-40.

Una concentración de 125 µl de pharmalite IPG buffer es recomendado para ettan IPGphorII

1.- b) Buffer de rehidratación.

	Concentración final	concentración	
Urea (PM 60.06)	7 M	10.5 g	2.1 g
Thiourea	2 M	3.8 g	760 mg
CHAPS	2% (W/V)	0.5 g	100 mg
Pharmalite IPG Buffer (el mismo rango que las tiras)	0.5 o 2% (V/V)	125 o 500 µl	26 µl
1% de solución de azul de bromofenol (ver solución)	0.002%	50 µl	10 µl
Agua bidestilada	-----	A 25 ml	A 5 ml

2a.- Solución de equilibrio SDS buffer.

	Concentración final	Concentración	
Urea	6 M	72.1 g	
Tris-HCl pH 8.8	75 mM	10 ml	
Glicerol 87%	2 9.3% w/v	69 ml	
SDS	2% v/v	4 g	
1% azul de bromofenol	0.002 w/v	400 µl	
Agua bidestilada		A 200 ml	

Agregar 50 mg de DTT x 5 ml, para la primera solución y 125 mg de Iodoacetamida x 5 ml, para obtener la segunda solución de equilibrio.

3.- alineación de las secuencias para el diseño de primers por CLUSTALW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>)

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment SERK1

```

gi|215260692|gb|EU869193.1| -----
gi|24935323|gb|AY162176.1| -----
gi|312618974|gb|HQ621831.1| GAAAAAATCACTCCATCACTTGACTTACAAAGAGAAAGTTTTGAGAAACGCAAAAAGGA
gi|145337426|ref|NM_105841.4| -----AACAAACACACTAATCATAGTTTCTCTGGCAGGCTTGTGTGGCGCTTAATAAA

gi|215260692|gb|EU869193.1| -----
gi|24935323|gb|AY162176.1| -AGTTTATGTTTCT-----GGG-----TCAG
gi|312618974|gb|HQ621831.1| AAGTTCATTTCTTTTTATTTTGTTTTTTAAACTTGCTAAAAGAA-----AGGG
gi|145337426|ref|NM_105841.4| AAGCTC-TTTTGTATTATTACTTCACGTAGATTTTCCCCAAAAGCTCTATTTTTTTTG

gi|215260692|gb|EU869193.1| -----AGAG---G-----
gi|24935323|gb|AY162176.1| TCCAAAAAAG---GTGTA--TTTGGACGAGATCGGGTCTCGG-----GTATA-G
gi|312618974|gb|HQ621831.1| TTTAAAAAAA---GAGTAATTTTGGCTTGGTTTTTCTGTCTTTTTCTTTGTATATA
gi|145337426|ref|NM_105841.4| TTTAAAAAAAAGTTTTCATCTTTATTCAACTTTTGTTTTACA-----GTGTGTG
          * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| -----AATG-----|
gi|24935323|gb|AY162176.1| TGTGGTAGATAGATAGATTCT----AATGCTTCAAGATTTCA---ACTGAGA---TTTG
gi|312618974|gb|HQ621831.1| TGTTTTTGTGGCTGCCTTTTTGGGCGTGC TTTTGAATGGAGGGGAGTGGGA---TCAA
gi|145337426|ref|NM_105841.4| TGTGAGAGAGAGAGTGTGGT-----TGATTGAGGAAAGACGACGACGAGAACGCCGG
          * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| AGGGT---GGTTT-----TTTT-----GTGATG----
gi|24935323|gb|AY162176.1| GGGGTTAGGGTTTAT---GCTCATTTTCATTTATT----GTGCTGCTGGTGGTGAA--
gi|312618974|gb|HQ621831.1| AGGGA-AGGATTTGATTGAGGAGATTTTTG-----GGCGGTAATGGT--
gi|145337426|ref|NM_105841.4| AGAATTAGGATTTTGAT---TTTATTTTAC TCTTTGTTTGTTTAATGCTAATGGGTT
          * * * * * * * * * * * * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| -----TTGTA-----TTGGGGT-----GCGAGGT
gi|24935323|gb|AY162176.1| -----GGTGGTTGAA-----TGGGTTT-----GTGATGT
gi|312618974|gb|HQ621831.1| -----GGGATTTGAGAGCTAGGGTTTTTGGTTTTTT---GGTTTTTGTCTGTAATGT
gi|145337426|ref|NM_105841.4| TTTAAAGGGTTATCGAAAAAATGAG---TGAGTTTGTGTTGAGGTTGCTCTGTAAGAT
          * * * * * * * * * * * * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| TTTG-----T-----TTGGATCTGAGGTTGTTGG-----
gi|24935323|gb|AY162176.1| TTTA-----TAATT-----ATTATTTGGATCTGAGGTTATTTA-----
gi|312618974|gb|HQ621831.1| TGTG-----CTGTTGGGGTTTCTGTATTGTTTGGATCTAAGGATATTTAGATTGA
gi|145337426|ref|NM_105841.4| GTTAATGGTGGTGATTTTTCGGAAGTTAGGGTTTTCTCGGATCTGAAGAGATCAAA--TCA
          * * * * * * * * * * * * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| ---CT-----ACATAG-----GTTG
gi|24935323|gb|AY162176.1| ---CT-----ACTTAA-----TCAA
gi|312618974|gb|HQ621831.1| GAGCTTAAAAAATTTAAATTTAAAAAGTTGCAGCTTTTAGTTTCCCC TTTCTTTTGTCAA
gi|145337426|ref|NM_105841.4| AGATTCGAA---ATTTAG-----CATTGTTGTTTGAA
          * * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| ATGGAGAG-----AAAGTTCATGGCT--TTAGGTTTCATTTGG-----TGGGTGGTGT
gi|24935323|gb|AY162176.1| ATGGAGGAGAC---AAAGTTCGTGCT--TTAGCTTTTCAATTTGTGCC TTTCTTCTGCTGT
gi|312618974|gb|HQ621831.1| ATGGAAGGAAGCAAAAAGGTTAAATCT--TTGGTTTTGTTTGT---TTGATCTCGGTGC
gi|145337426|ref|NM_105841.4| ATGGAGTC-----GAGTTATGTGGTGTTTATCTTAC TTTTAC---TGATCTTACTTC

gi|215260692|gb|EU869193.1| TGGTTCATCCACTATGCCTGATTCTGCTAACATGGAAGGAGATGCTTTGCATAGTCTGA
gi|24935323|gb|AY162176.1| TGCTTCATCCATTATGGCTGGTTTCTGCTAACATGGAAGGTGATGCTTTACATAAATTGA
gi|312618974|gb|HQ621831.1| TACTGCATCCATTTCTGGCTTATTTCTGCTAATGTGGAAGGTGATGCATTGCACAGCCTAA
gi|145337426|ref|NM_105841.4| CGAATCATCCACTGTGGCTTGTCTTCTGCTAATTTGGAAGGTGATGCTTTGCATACTTTGA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| GGACAAACTTACAGGATCCCAACAATGTTTTGCAAAGTTGGGATCCTACACTTGTAAATC
gi|24935323|gb|AY162176.1| GGACAAATTTACAAGATCC TAATAATGTTTTGCAAAGTTGGGATCCTACACTTGTAAATC
gi|312618974|gb|HQ621831.1| GGACCAACTTGAATGATCCTAACAATGTAAGTGCAGAGTTGGGATCCTACCTTTGTTAAAC
gi|145337426|ref|NM_105841.4| GGGTACTCTAGTTGATCCAAACAATGCTTTGCAGAGCTGGGATCCTACGCTAGTGAATC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|215260692|gb|EU869193.1| CATGTACATGGTTTCATGTAACATGCAACAATGATAAATAGTGTGCATAAGAGTTGATCTGG
gi|24935323|gb|AY162176.1| CTTGTACATGGTTTTCATGTAACCTGCAACAATGATAAATAGTGTGCATAAGAGTTGATCTGG
gi|312618974|gb|HQ621831.1| CCTGCACATGGTTTTCACGTTACATGTAACAATGATAAATAGTGTATTAGAGTTGATCTGG
gi|145337426|ref|NM_105841.4| CTTGCACATGGTTTTCATGTAACCTGCAACAACGAGAAGTGTGCATAAGAGTTGATTTGG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

LEC1

```

gi|240254421:c7729617-7727577   AATTATTTTATAAAGAACAAAAAAAAAAAAAGACGGCAGAGAAACAAATGGAACGTGGAGC
gi|170280632|gb|EU371726.1|     -----ATGGAACGTGGAGC
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     -----GAATTCGAAGTAAATA
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   TCCCTTCTCTCACTATCAGCTACCAAATCCATCTCTGGTAATC-----TAAGTGGCTA
gi|170280632|gb|EU371726.1|     TCCCTCTCTCACTATCAGCTACCCAATCTAACTCTGGTAATCAAATAAAGTGCCTA
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     CATTTCCAACCACCTCC--TTAC---GCTCTGTTTCTGTT-----CCCA
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   TTTTATACAGTATATACCTGCCTCCATGTATTTATATGCTCATGAAAAATTGGAGAC
gi|170280632|gb|EU371726.1|     TTTAT-----GTATACCTGCCTGCAC----TATGTATCTACGAATCAT---AAAC
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     GCCTT-----CAC-TGCTCTGCTGCTTG-----TTATTTTACCAA---AAT
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   ATGCTTTTGAATTTTATGAGACTTTGCAACACGAACAAATGCTTTC----TTTCT--
gi|170280632|gb|EU371726.1|     TTGTTTTGAGATTTTTTGTATAT----CAACAAAGAACTAGAGACTTTCATGCTTCTTA
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     GTAATAAAGAAACTCATGAACCAACCAATCACAATCCGATGTTAG-----
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   -----AGAAATTTTTAAT--TTAGATTTG--TGAAGTTTTGGGAATGGCC-----C
gi|170280632|gb|EU371726.1|     AAACAGTAGAGATTTTTATTTCTTAGATTTTTTAAAGGTACGGAGAAGAGTCTACTCAC
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     -----CGTAATTCCTCGTTGAGATCGCCACACGCCACG---TGTC-----
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   GGAGAAGACGATTTTATATACATACATGCAAGA----GTTTGATATGT-----ATTGT
gi|170280632|gb|EU371726.1|     ATGCAAGACGCTTATATATATATGCATGCATGAATGAGTTTGATATATCTATATTTTAT
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     -----CCACCCTACACACCCCTCTTCAA---CTTCATTATAA-----AAACGG
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   TT-----CATCATGGCTG-AGTCAAAGTTTTATCCAAATATTTCCATGTT
gi|170280632|gb|EU371726.1|     TTGCATATTCGTGTATACATCCAAGCAGGAACCAATCCTTAATTCAAATATTTTC--GTGAT
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     CT-----CAAAC TAGCAGCAGAAAAAC----ACACACCGGCTTCGGAGAG
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   GTGGTAT-TAG-----TTAA-----ACAAATCTCTCGTATG--TGTTCATTG
gi|170280632|gb|EU371726.1|     ATGGTATAAAGAACAATTTTTAATGGGGGATGATAGATCT-TCATATGTTTGTCCATTG
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     AAGCGGAGCAG-----TGG-----GTGAAT-----ATATG---GACGGTG
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   AATATACCCGTGCATGTACCAG--GAATGTT---TTTGAGTATCGTTTCTTTCTTTTFA-
gi|170280632|gb|EU371726.1|     ACAATACCGGTGCATGCAC AAG--AAATATTGAGTTTCGATTCTTTTCTATCTTTTAG
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     GCGGTGGCGGTGGCTGTGGCGGTGGAGGGTT--TCATGGGTTCCACAGGCTCCCTCC-
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   --TCAA-----AAAAATTCGATTC TAAAAACGTTTTTTTC--TTTGTGTGA
gi|170280632|gb|EU371726.1|     ATTTATATTC TGGCTTTTTAAAAATATAGAGGTGGGAATTGTATGTGTGGTTTAGTTTA
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     -----ACTCCAAC-CGAGGTCCGCCCTCC--CCATTTTFA
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   ACGGTTGAGTT-----TTTTTCTTCTGTTTCAAACG--AGATTCT
gi|170280632|gb|EU371726.1|     AAGGCCGACTCAAATCTAAAAAACTTAATTTATTTTCAATTGGAAATATTAATTAAT
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     GCAG--AAATC-----CATGCTCTGGGTT-----TTACC
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   CGTTTG---TCTCTCCCTTGTCTAAAAACAT--CT---ACGGTTCATGTGATCAAAA
gi|170280632|gb|EU371726.1|     CTTATGATATTTCTTTATAGTTTATTCGCTTACTGTAACGGTGTGTTTTTTTTTT---
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     CTGTTG-----TATGAAC TT---CGCAT-----GCAGTAGACGCAAGT-----
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   ACACTAAAAAATAGAAACTCAAATTTTTTTAGTACTTAACATTTAACTAT---ATATA
gi|170280632|gb|EU371726.1|     -CGTTTCAAAC--GAAATCTCTGTTTGTCCA--ACCTGAT-TTGGAAATATCCAATGAA
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     -----AGAATTTCAATGTTCCA----TTGATCATCACTCTGTCTCTGTTG
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   TATATAT-ATATATCTTATACTAGTCC---CAAGTTTT--AGTGTGAGGTTTTTTTATT
gi|170280632|gb|EU371726.1|     TCTAAAT-ACACTTTTTAGCCAAATATAATATAAATACT--ATTGAAA-CTCCTCTATT
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     TCTGCATTACACTTGTGAGCT--CCCATTTCCGCTTTTGAATTATAAG---CCGTC AAG
                                   * * * * *

gi|240254421:c7729617-7727577   CAAAATCTATCA-GTAATTT-----TTTTGGAA---AA---AAACTAAGTGAAT--TT
gi|170280632|gb|EU371726.1|     TAAAGCCAAAAAAGTAATATAAATATATTGTAATTC TAGTTCACAGGGGATGAAATCGTT
gi|110340515|gb|DQ674267.1|     CTCGATTGATTGATCGATCTCCATGTGTAGCGAGA-TAATCGAAGCTGTGTG--CTCGCT
                                   * * * * *

```

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TC TCCAAATTTTCTTTTACTATTGATTTTTTAATTACTGGAT--GTCATTAAC TCCAAT
TCACC TAATCCAAATCGTTTTATTAATTAGTAAAAGAATTGGTTAACCAATAAC--CAAC
TCGCT---TC TTGATCATTCTGATTGGGTAGTTGGAGT-----GTTGTGTGC-----
*** *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

CTTTTGATTCTTTCAACATTTTACCATTGGGAACCTTCACATGAAATAAATGTCTACTTTTA
--TTTAATTCTTT-----TTAAGTA-----ATAAAAACAATTTTGAAATTA
---TTAATTCTTT-----TTG-----CGGCTTTCT--CTGA
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TTGAGTCATACCTTCGCTACATAAATT--AAT---TGATGTTCTTCTCCAAAT--TTT
GCAAGCTAGAAAATTGCAAAAGAAAATTGGGAATACGCCTGTACTTGTAATAAC--ATC
TCGATTTTGAC-----TCAGCAGAATCT---GGT---CG-TGCTTTTTCTATTTGTTTT
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

GAGTTTTTGGTTTTCTA--ATT--AATAATCTAAGC GAAAGCTTTTTGG---TATACAT
AAATTTCAAGTATTTTCGAGAAGTGGAAAGATCCTTTTGA---CTTTTTCGTTCTATGAAT
GAATTTGTGACTGT--GAGAAGC--AGAGAGCCGAGTGGT--GCCAGTTGG-----TAGTC
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

GTA AACGT AACGGCAAGAACTGGAACAGTCTACTCAACGGGGTCCATAAGTCTAGAATG
GTAAC--CGTAACGTCAAGAACTGGAACAGTCTACATAATGGAACC-----
GGGAAGATGACGTAC---TC TCAACAAGTGTCCCGCTGCACC-----
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TAGACCCACAACTTA-CTCTTATCTTATTGGTCCG---TAAC TAAGAACGTGTCC--
-GGGACCTGTAACTTATCTTTTATCTTATTGGT TAGGACTTAACTAAGCAGCTGTCTTC
----ACCTCCGCCCTCTTCGCTT--CCCATTCGTC-GCGTCTCTCT-----CGGGCTTC
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

-CTTGATTCTC-TTGTT-----TTCTTCTAATCCATTCGT--ATCC--TACAAATTAAT
ACTTGATAGTCTCTGTT-----TTCAACTATTAATCCGC--TTTC--TAAAAATGTAAT
-CTTAAAGCCGTTACGAAAGGCCATTTATAAAGCCGCCAAACAGTTCGAATGCAAG
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

CATCATTTCTACTTCAACTAATCTTTTTTATTCTTAAAGATTTCAATTTCTCTCTGTAT
T-TCATTT-----AGTA-----TTCCAAACAAC TTCAATTTAT-----
A-TCGTTG-----A-----CCGATTGACTTTTATTCT-----
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TTTTATGAACAGAATTGAAC TTGGACCAGCACAGCAACAACCCCAACCC---CAATGACC
-----GTAACAGGACTGAAC TTGGACCAGCACA---ACAAC TCAATCCC GACAATGACC
-----CAGGGATGAAGT--GGAC-AG-ACA-----TCAAT-----ATGA--
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

AGCTCAGTCGTAGTAGCCGGCGCCGGTGACAAGAACAATGGTATCGTGGTCCAGCAG-CA
GGCTCCATCGGTGCATGCGAGC-----ACAAGAACAAGACTCTTGTG---CCGCAG-CA
AGCT--ACC--TGAGGACGGGA-----GCAGCAACGGCGC GACTGTT--CCGGCGGGCG
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

ACCACCA-TGTGTGGCTCTGTGAGCAAGACCAATACATGCCAATCGCAACGTCATAAGAA
ACAACCA-AGCATGCCCTGTGAGCAAGACCAATACATGCCAATCGCAACGTTGATAAGGA
ACAGCGAGTGCAATTTGAAGGGAGCAAGACAGGTTTCATGCCGATCGCAAGTGATACGCA
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TCATGCGTAAAACCTTACC GTC TCACGCCAAAATCTCTGACGACGCCAAAAGAAACGATTC
TCATGCGTAAAATCTTACC GCCACACGCCAAAATCTCTGACGACGCCAAAAGAAACGATTC
TCATGCGGAAAGATCCCTCCGACGCCAAGATATCCGACGACGCCAAGGAGACCATTC
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

AAGAATGTGTCTCCGAGTACATCAGCTTCTGTGACC GGTTGAAGCAACGAGCGTTGCCAAC
AAGAATGCGTCTCCGAGTACATCAGCTTCTGTGACC GGTTGAAGCAACGAGCGTTGCCAAC
AAGAATGCGTCTCCGAGTATATCGGCTTCTACGAGCGAGCGAACGAGCGATGCCAGC
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

GTGAGCAACGTAAAGACATAAAGCTGTAAGATATCCTTTGGGCTATGAGCAAGCTTTGGGT
GTGAGCAACGTAAAGACAATAAAGCTGTAAGATATCCTTTGGGCAATGAGCAAACTTTGGGT
ATGAGCAGAGGAAGACCGTACGCTGAGGACGTCTTTGGGCCATGAGCAAGCTCGGTT
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TCGATAACTACGTGGACCCCTCACCGTGTTCATTAACCGGTACCGTGAGATAGAGACCG
TCGATGATTACGTTGGACCCTCAACGTGTTTCTTAACCGGTACCGTGAGTTCTGAGACCG
TCGA-----CTC-----TGACTGACCGATACAGGGACATGGAGGTTG
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

ATCGTGGTCTGCAC TTAGAGGTGAGCCACC GTC GTTGTGAGACAAC--CTATGGAGGAAA
ATCGTGGGTGTTTCTACTAGAGGTGAGTCA---TCATTTAAACCGGT--CTATGGAGGAAAG
ACCGCGGG---GCGGTGAGAGGAGATCCGCTGGTGTCTAAAAGGGCTCCCTGGCGGA--
* *

gi | 240254421 | c:7729617-7727577
gi | 170280632 | gb | EU371726.1 |
gi | 110340515 | gb | DQ674267.1 |

TGGTATTGGGTTTACGGCC-----CATCTCATGGCTTACCTCTC--CGGGTCTCTTA
TGGTATTGGGTTTACGGCC-----CA-----CCTCCAC--CGGGTCTCTTA
--GCACGGGGCTTTCTGCCAGCTGCGACGTTTCATATGGGCAATCATGAGGTTTTC
* *

4.-Total de proteínas de acuerdo a la base de datos Swiss Uniprot.

Proteínas reportadas en la base de datos Swiss Uniprot, utilizando TagIdent tool, de acuerdo a su p. I. y su PM obtenido. Proteínas diferentes 190, proteínas expresadas en Callo 62, en Brote 78, Proteínas observadas en los dos tejidos 50; M) metabólica, R) respuesta, EF) estructural y o función.

	P.I (pH)	PM (KD)	PROTEINAS REPORTADAS EN SWISS-PROT
1) C R	4.93	79.57	HS903_ Arabidopsis thaliana (P51818) Heat shock protein 90-3. Chain: 1-699, pI: 4.95, Mw: 80052
2) C,B M	4.66	56.38	ACCD Gossypium barbadense (A0ZZ44) Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase pI: 4.70, Mw: 56236 ACCD Gossypium hirsutum (Q2L915) Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase pI: 4.66, Mw: 56088
3) C EF	4.88	45	FBK26 Arabidopsis thaliana (O04591) Putative F-box/kelch-repeat protein At1g62270. pI: 4.88, Mw: 44940
4) C M*	4.76	43.13	PGLR3 Arabidopsis thaliana (Q9LW07) Probable polygalacturonase At3g15720. pI: 4.80, Mw: 43529
5) C EF	4.88	43.13	MRS27 Arabidopsis thaliana (Q304A0) Magnesium transporter MRS2-7. Chain: 1-386, pI: 4.86, Mw: 43431
6) C M	4.73	40.34	NU1C VITVI (Q0ZIW3) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 1, chloroplastic. pI: 4.75, Mw: 40253
7) C EF	4.83	40.34	PUP13 Arabidopsis thaliana (Q8RY83) Probable purine permease 13. Chain: 1-361, pI: 4.83, Mw: 40138
8) C M	4.74	38.48	F16P1 Glycine max (Q42796) Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic. Chain: 51-402, pI: 4.73, Mw: 38559
9) C M	4.88	38.02	RIR2C Arabidopsis thaliana (Q9LSD0) Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C. pI: 4.87, Mw: 38035
10) C EF	4.85	32.9	CNBL9 Oryza sativa J (Q3HRN8) Calcineurin B-like protein 9. pI: 4.86, Mw: 32893
11) C M	4.82	25.03	TMT2_ Brassica oleracea (Q93XC4) Probable thiocyanate methyltransferase 2. pI: 4.83, Mw: 25017 LBD11 Arabidopsis thaliana (Q9SK08) LOB domain-containing protein 11. pI: 4.83, Mw: 25162
12) C MR	4.5	24.04	EF1B2 Arabidopsis thaliana (Q9SCX3) Elongation factor 1-beta 2. pI: 4.42, Mw: 24201
13) C M	4.48	13.7	NU3C GOSBA (A0ZZ40) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3, chloroplastic. pI: 4.57, Mw: 13820 NU3C Phaseolus vulgaris (A4GG92) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3, chloroplastic. pI: 4.40, Mw: 13827
14) C M	4.7	13.7	RK12 Spinacia oleracea (P02398) 50S ribosomal protein L12, chloroplastic. pI: 4.62, Mw: 13815 GCSH Mesembryanthemum crystallinum (P93255) Glycine cleavage system H protein, mitochondrial. pI: 4.70, Mw: 13588
15) C T	4.53	9.5	ACP1 Brassica napus (P10352) Acyl carrier protein, chloroplastic. pI: 4.53, Mw: 9185 CML29 Arabidopsis thaliana (Q9LF54) Probable calcium-binding protein CML29. pI: 4.53, Mw: 9048
16) C EF	4.31	10.14	PLAS Phaseolus vulgaris (P00287) Plastocyanin. pI: 4.32, Mw: 10492 PLAS Spinacia oleracea (P00289) Plastocyanin, chloroplastic. pI: 4.37, Mw: 10413

17) C R	4.66	7.7	DF254 Arabidopsis thaliana (Q2V318) Putative defensin-like protein 254. pl: 4.67, Mw: 7663
18) C,B* M	5.6	106.8	GCSP1 Arabidopsis thaliana (O80988) Glycine dehydrogenase [decarboxylating] 1, mitochondrial. pl: 5.63, Mw: 105549
19)B EF	5.76	106.8	PUM1 Arabidopsis thaliana (Q9ZW07) Pumilio homolog 1. pl: 5.75, Mw: 106564
20) C EF	5.46	103.9	NLP8 Arabidopsis thaliana (O22864) Protein NLP8. pl: 5.46, Mw: 104884
21) C EF	5.15	89.08	SWI3C ARATH (Q9XI07) SWI/SNF complex subunit SWI3C. pl: 5.13, Mw: 88250
22) C EF	5.27	89.08	UFL1 ARATH (Q9LX73) E3 UFM1-protein ligase 1 homolog. pl: 5.28, Mw: 89073
23) C,B MR	5.45	89.08	BGAL6 ORYSJ (Q10NX8) Beta-galactosidase 6. pl: 5.46, Mw: 89856
24) B* MR	5.5	82.84	ACCR2 ARATH (O80963) Serine/threonine-protein kinase-like protein CCR2. pl: 5.53, Mw: 82936
25) C EF	5.02	78.63	SUVR2 ARATH (Q9FNC7) Histone-lysine N-methyltransferase SUVR2. pl: 5.03, Mw: 79363
26) C EF	5.33	76.6	PUB2 ARATH (Q5XEZ8) U-box domain-containing protein 2. pl: 5.33, Mw: 78120
27) C EF	5.466	66.2	PP287 ARATH (Q9LYT2) Pentatricopeptide repeat-containing protein At3g59040. pl: 5.46, Mw: 66162
28) C M	5.55	66.2	MTHR1 ARATH (Q9SE60) Methylenetetrahydrofolate reductase 1. pl: 5.55, Mw: 66289
29) C E F	5.63	66.2	ARP9 ORYSJ (Q0JF03) Actin-related protein 9. pl: 5.62, Mw: 65837
30) C M	5.26	62.68	RGA2 Brassica campestris (Q5BN22) DELLA protein RGA2. pl: 5.28, Mw: 63294
31) C, B M	5.42	62.68	ILVB ARATH (P17597) Acetolactate synthase, chloroplastic. pl: 5.41, Mw: 62410
32) C, B* M	5.76	56.43	MTBC1 Vitis vinifera (E0CSI1) bifunctional methylthioribulose- 1-phosphate deh. pl: 5.76, Mw: 56152 MTBC Arabidopsis thaliana (Q9FN41) bifunctional methylthioribulose- 1-phosphate dehydrogenase. pl: 5.79, Mw: 56521
33) C T	5.93	56.43	GLPT1 ARATH (Q9C5L3) Putative glycerol-3-phosphate transporter 1. pl: 5.94, Mw: 56309
34) B* M	5.97	56.43	DCE Solanum lycopersicum (P54767) Glutamate decarboxylase. pl: 5.96, Mw: 56786
35) B* M	5.4	54.86	ACCD SPIOL (Q9M3L7) Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subuni... pl: 5.44, Mw: 55172
36) C M	5.26	53.87	ATPB Solanum lycopersicum (Q2MI93) ATP synthase subunit beta, chloroplastic. pl: 5.28, Mw: 53468
37) B M	5.4	54.85	P2C06 ARATH (Q9SA22) Probable protein phosphatase 2C 6. pl: 5.37, Mw: 54354
38) C EF	5.7	48.94	PP107 ARATH (Q3ECH5) Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g66345, mi... pl: 5.71, Mw: 48816
39) C, B* M	5.81	48.94	E137 ARATH (Q9M069) Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7. pl: 5.83, Mw: 50645
40) C M	5.9	48.94	UKL2 ARATH (Q9LK34) Uridine kinase-like protein 2, chloroplastic. pl: 5.91, Mw: 49205
41) C EF	5.26	46.97	WRK14 ARATH (Q9SA80) Probable WRKY transcription factor 14. pl: 5.26, Mw: 46803
42) C, B M	5.76	45	PDI22 ARATH (Q9MAU6) Protein disulfide-isomerase like 2-2. pl: 5.76, Mw: 45367
43)B* R	5.91	44.23	EFTM ARATH (Q9ZT91) Elongation factor Tu, mitochondrial. pl: 5.92, Mw: 44099
44) C EF	5.0	43.25	FB136 ARATH (Q9C9Y4) F-box protein At3g08750. pl: 5.03, Mw: 43037
45) C EF	5.08	43.25	FB136 ARATH (Q9C9Y4) F-box protein At3g08750. pl: 5.03, Mw: 43037
46) C M	5.2	44.22	NDHH TOBAC (P12133) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplastic. pl: 5.21, Mw: 45488
47) C M	5.6	42.29	MANS5 SOLLC (Q6YM50) Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 5. pl: 5.63, Mw: 43983
48) C,B MR	5.73	40.58	SRK2G ARATH (P43292) Serine/threonine-protein kinase SRK2G. Chain: 1-353, pl: 5.71, Mw: 40198
49) C, B* MR	5.86	40.85	NGA3 ARATH (Q9MAN1) B3 domain-containing transcription factor NGA3. pl: 5.86, Mw: 40288
50) C R	5.0	39.89	SGT1B ARATH (Q9SUT5) Protein SGT1 homolog B. pl: 5.03, Mw: 39763

51) C EF	5.48	39.41	PSBD PHAVU (A4GGA2) Photosystem II D2 protein. pl: 5.46, Mw: 39580
52) C R	5.61	38.93	EHD1 ORYSJ (Q7Y0W5) Two-component response regulator EHD1. pl: 5.61, Mw: 38863
53) C,B M	5.76	38.45	CADH4 ORYSJ (Q2R114) Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase 4. pl: 5.76, Mw: 38635
54) C EF	5.88	38.45	ATL31 ORYSJ (Q8H7N9) E3 ubiquitin-protein ligase Os03g0188200. pl: 5.86, Mw: 38124
55) C M	5.08	38.45	CCA33 ARATH (A0MEB5) Cyclin-A3-3. pl: 5.05, Mw: 38130
56) C M	5.33	38.45	HEM6 ARATH (Q9LR75) Coproporphyrinogen-III oxidase, chloroplastic. pl: 5.33, Mw: 38445
57) C M	5.54	35.57	E1314 ARATH (Q9ZQG9-3) Isoform 3 of Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14 pl: 5.55, Mw: 35376
58) C,B M	5.58	31.64	DAPB2 ARATH (Q8LB01) Dihydrodipicolinate reductase 2, chloroplastic. pl: 5.58, Mw: 32056
59) C,B T	5.8	35.57	ERDL9 ARATH (Q7XA64) Sugar transporter ERD6-like 9. pl: 5.82, Mw: 35713
60) B* EF	5.63	31.24	BH023 ARATH (Q9SVU6-2) Isoform 2 of Transcription factor bHLH23 pl: 5.61, Mw: 30838
61) C EF	5.6	26.44	EF101 ARATH (O80338) Ethylene-responsive transcription factor 2. Chain: 1-243, pl: 5.59, Mw: 26797
62) B EF	5.86	21.61	RRFC Oryza sativa I (A2YMU2) Ribosome-recycling factor, chloroplastic. pl: 5.83, Mw: 21712 RRFC Oryza sativa J (A3BLC3) Ribosome-recycling factor, chloroplastic. pl: 5.83, Mw: 21712
63) B R	5.36	18.07	ITRY1 Bauhinia rufa (P84882) Kunitz-type trypsin inhibitor BrTI. pl: 5.82, Mw: 18326
64) B R	5.83	17.90	HSP11 Pisum sativum (P19243) 18.1 kDa class I heat shock protein. Chain: 1-158, pl: 5.83, Mw: 18086 HSP12 Medicago sativa (P27880) 18.2 kDa class I heat shock protein. Chain: 1-158, pl: 5.82, Mw: 18166
65) C,B EF	5.4	15.51	LGB2 Phaseolus vulgaris (O04939) Leghemoglobin. pl: 5.37, Mw: 15537 LGB3 Glycine max (P02237) Leghemoglobin C3. pl: 5.36, Mw: 15451
66) C,B EF	5.73	12.67	GRP2 Oryza sativa J (A3C5A7) Glycine-rich cell wall structural protein 2. pl: 5.75, Mw: 12060 GRP2 Oryza sativa I (P0C5C7) Glycine-rich cell wall structural protein 2. pl: 5.75, Mw: 12060
67) C,B* M	6.3	104.46	Y1534 ARATH (COLGG7) Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinas... pl: 6.32, Mw: 104790
68) C,B*	6.42	104.46	ERL1 ARATH (COLGW6) LRR receptor-like serine/threonine- protein kinase ERL1. Chain: 26-966, pl: 6.44, Mw: 103742
69) C,B EF	6.96	104.46	CMTA5 ARATH (O23463) Calmodulin-binding transcription activator 5. pl: 6.95, Mw: 104848
70) B*	6.26	95.32	Y5188 ARATH (Q9FZB1) Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinas... pl: 6.24, Mw: 94708
71) C,B* M	6.37	95.32	CDC5L ARATH (P92948) Cell division cycle 5-like protein. pl: 6.37, Mw: 95767 PP197 ARATH (Q7XJN6) Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g40720. pl: 6.37, Mw: 95394
72) C,B* M	6.46	95.32	Y5344 ARATH (COLGG9-2) Isoform 2 of Probable LRR receptor-like serine/threonine- . pl: 6.44, Mw: 96489
73) B M	6.22	87	AGD2 ARATH (Q9C6C3) ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD2. pl: 6.21, Mw: 87803
74) C EF	6.26	82.84	LUP4 ARATH (B6EXY6) Beta-amyrin synthase. pl: 6.26, Mw: 86954
75) B T	6.3	70.36	AB23G ARATH (Q3E9B8) ABC transporter G family member 23. pl: 6.32, Mw: 69934
76) C,B* M	6.03	66.2	LK110 ARATH (Q3E884) Putative L-type lectin-domain containing receptor kinase pl: 6.04, Mw: 66074
77) C,B*	6.1	66.2	MPK8 ARATH (Q9LM33) Mitogen-activated protein kinase 8. pl: 6.09, Mw: 66232

78) C M	6.28	62.0	ASO Cucurbita pepo (P37064) L-ascorbate oxidase. pl: 6.29, Mw: 61704
79) C, B* M	6.85	61.43	Y1719 ARATH (O04567) Probable inactive receptor kinase At1g27190. pl: 6.87, Mw: 62706
80) C, B EF	6.93	61.43	PP104 ARATH (Q9C7V5) Putative pentatricopeptide repeat- containing protein At1. pl: 6.92, Mw: 61401
81) C, B M	6.64	60.43	1A110 ARATH (Q9LQ10) Probable aminotransferase ACS10. pl: 6.67, Mw: 61016
82) B*	6.3	59.93	G6PD1 ARATH (Q43727) Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1, chloroplastic. pl: 6.33, Mw: 59990
83) B EF	6.46	59.88	MPPB ARATH (Q42290-2) Isoform 2 of Probable mitochondrial-processing peptidase . pl: 6.45, Mw: 59612
84) C, B EF	6.7	59.88	NHX1 ARATH (Q68K14) Sodium/hydrogen exchanger 1. pl: 6.73, Mw: 59514
85) B EF	6.86	59.88	BGL37 ARATH (Q9C5C2) Myrosinase 2. pl: 6.87, Mw: 59595
86) C, B M	6.1	56.43	CKX3 ARATH (Q9LTS3) Cytokinin dehydrogenase 3. pl: 6.09, Mw: 56023
87) C EF	6.28	57.18	AMSH1 ARATH (Q8VYB5) AMSH-like ubiquitin thiolesterase 1. pl: 6.26, Mw: 57384
88) B EF	6.86	57.18	C71BV ARATH (Q9LIP6) Cytochrome P450 71B34. pl: 6.87, Mw: 57140
89) C, B EF	6.82	56.43	C71AO ARATH (Q9STK9) Cytochrome P450 71A24. pl: 6.83, Mw: 56006
90) B* M	6.0	45	KNAP1 MALDO (O04134) Homeobox protein knotted-1-like 1. pl: 6.01, Mw: 45172
91) C, B EF	6.16	45	MCAS5 ARATH (O64518) Metacaspase-5. pl: 6.17, Mw: 44846
92) C, B* M	6.36	45	DHE1 ARATH (Q43314) Glutamate dehydrogenase 1. pl: 6.37, Mw: 44524
93) C, B EF	6.56	45	FH21B ARATH (P0C5K5) Formin-like protein 21b. pl: 6.58, Mw: 45234
94) B M	6.9	44.22	AAT1 ARATH (P46643) Aspartate aminotransferase, mitochondrial. pl: 6.90, Mw: 44813 PUP18 ARATH (Q9C508) Probable purine permease 18. pl: 6.90, Mw: 44182
95) B M	6.08	43.25	CHSY ARATH (P13114) Chalcone synthase. pl: 6.08, Mw: 43116 CHS1 HORVU (P26018) Chalcone synthase 1. pl: 6.08, Mw: 43532 BH112 ARATH (Q94JL3) Transcription factor bHLH112. pl: 6.08, Mw: 43041
96) B* M	6.26	43.06	STM Brassica oleracea (Q9M6D9) Homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS. pl: 6.26, Mw: 43142
97) C, B EF	6.35	42.29	PP226 ARATH (Q9LK57) Pentatricopeptide repeat-containing protein At3g13160, mi... pl: 6.34, Mw: 42037
98) C, B M	6.46	43.06	CHS2 Camellia sinensis (P48387) Chalcone synthase 2. pl: 6.48, Mw: 42595 CHS2 Citrus sinensis (Q9XJ57) Chalcone synthase 2. pl: 6.48, Mw: 42592
99) C, B M	6.6	43.06	THIK5 ARATH (Q570C8-2) Isoform 2 of 3-ketoacyl-CoA thiolase 5, peroxisomal. pl: 6.62, Mw: 43173
100) C EF	6.76	43.06	LIP2 ARATH (Q67ZU1) Triacylglycerol lipase 2. pl: 6.74, Mw: 42900 MAN4 ARATH (Q9SG95) Putative mannan endo-1,4-beta-mannosidase 4. pl: 6.74, Mw: 42911
101) B* M	6.26	39.41	WRK35 ARATH (O64747-2) Isoform 2 of Probable WRKY transcription factor 35 pl: 6.26, Mw: 39095
102) B* EF	6.35	39.41	ASK20 ARATH (A8MQG7-2) Isoform 2 of SKP1-like protein 20 pl: 6.37, Mw: 39434 FH15B ARATH (P0C5K3) Putative formin-like protein 15b. pl: 6.37, Mw: 39474
103) C, B EF	6.66	39.41	IDND Vitis vinifera (Q1PSI9) L-idonate 5-dehydrogenase. pl: 6.66, Mw: 39466
104) C, B M	6.86	38.45	ALF ARATH (P22197) Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme. pl: 6.84, Mw: 38811 P2C08 ARATH (Q9LMT1) Probable protein phosphatase 2C 8. pl: 6.84, Mw: 38486
105) C EF	6.49	37.97	Y1203 ARATH (Q9C6X0) B3 domain-containing protein At1g32030. pl: 6.49, Mw: 37697
106) C M	6.08	37.49	GDL51 ARATH (Q9LJP2) GDSL esterase/lipase At3g14220. pl: 6.08, Mw: 37263
107) C, B EF	6.16	36.72	AGL86 ARATH (Q9C6V3) Agamous-like MADS-box protein AGL86. pl: 6.16, Mw: 36942
108) C, B EF	6.33	37.49	FBL44 ARATH (Q9LUS9) Putative F-box/LRR-repeat protein At3g16555. pl: 6.34, Mw: 37153
109) C EF	6.43	37.01	CML50 ARATH (Q9FYE4) Probable calcium-binding protein CML50. pl: 6.42, Mw: 37113

110) C EF	6.55	37.01	PP17 ARATH (O82733-3) Isoform 3 of Serine/threonine-protein phosphatase pl: 6.54, Mw: 36873
111) C EF	6.8	36.53	LEU3 Solanum tuberosum (P29696) 3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplastic. pl: 6.79, Mw: 36424 NAC22 ARATH (Q84TE6) NAC domain-containing protein 21/22. pl: 6.82, Mw: 36570
112) C, B* EF	6.61	34.61	LBD36 ARATH (Q9FKZ3) LOB domain-containing protein 36. pl: 6.62, Mw: 34524
113) C, B R	6.23	33.64	GBF1 ARATH (P42774-2) Isoform 2 of G-box-binding factor pl: 6.25, Mw: 33675
114) C R	6.48	32.68	ERF5 Nicotiana tabacum (Q40478) Ethylene-responsive transcription factor 5. Chain: 1-291, pl: 6.49, Mw: 32878
115) C EF	6.42	27.88	CEMA Aethionema grandiflora (A4QJL1) Chloroplast envelope membrane protein. pl: 6.44, Mw: 27664 IRT2 ARATH (O81850-2) Isoform 2 of Fe(2+) transport protein 2 pl: 6.44, Mw: 27695
116) C M	6.61	27.88	ATP62 ARATH (P92547) ATP synthase subunit a-2. pl: 6.62, Mw: 28156 ATP61 ARATH (P93298) ATP synthase subunit a-1. pl: 6.62, Mw: 28156
117) C, B EF	6.35	23.30	TXND9 ARATH (O64628) Thioredoxin domain-containing protein 9 homolog. pl: 6.34, Mw: 24451
118) C R	6.63	22.61	IAA3 ARATH (Q38822) Auxin-responsive protein IAA3. pl: 6.62, Mw: 21521
119) C EF	6.86	22.61	VPS2C ARATH (Q941D5) Vacuolar protein sorting-associated protein 2 homolog 3. pl: 6.87, Mw: 23026 DI197 ARATH (Q9FJ17) Protein DEHYDRATION-INDUCED 19 homolog 7. pl: 6.87, Mw: 23495
120) B EF	6.16	20.07	CRUA Brassica napus (P11090) Cruciferin subunit beta. pl: 6.16, Mw: 20844
121) C, B EF	6.4	20.07	U4979 SOYBN (C6T2J5) UPF0497 membrane protein 9. pl: 6.40, Mw: 20555
122) B EF	6.22	19.44	AGL31 ARATH (Q9FPN7-2) Isoform 1 of Agamous-like MADS-box protein AGL31 OS pl: 6.21, Mw: 19981
123) B* M	6.8	19.11	NDHI Jasminum nudiflorum (Q06R76) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I, chloroplastic. pl: 6.80, Mw: 19446 NDHI Morus indica (Q09WW4) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I, chloroplastic. pl: 6.79, Mw: 19501 NDHI Palafoxia arida (Q8HVN5) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I, chloroplastic. pl: 6.80, Mw: 19456
124) B* M	6.13	17.74	NDHJ Carica papaya (B1A938) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J, chloroplastic. pl: 6.12, Mw: 18517
125) B EF	6.36	8.0	QCR6 Solanum tuberosum (P48504) Cytochrome b-c1 complex subunit 6. pl: 6.37, Mw: 7846
126) B* M	7.13	70.36	CRK10 ARATH (Q8GYA4) Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10. pl: 7.13, Mw: 70178
127) B EF	7.26	70.36	PP145 ARATH (Q8LK93) Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g02980. pl: 7.25, Mw: 68170
128) B* M	7.42	70.36	CRK5 ARATH (Q9C5S8-2) Isoform 2 of Cysteine-rich receptor-like protein kinase 5... pl: 7.44, Mw: 73760
129) C EF	7.02	64.18	CCR4A ARATH (Q8W0Z9) Carbon catabolite repressor protein 4 homolog 1. pl: 7.04, Mw: 66762 CDPKO ARATH (Q9SIQ7) Calcium-dependent protein kinase 24. pl: 7.04, Mw: 66113
130) B EF	7.36	65.18	DGP10 ARATH (Q9FIV6) Protease Do-like 10, mitochondrial. pl: 7.37, Mw: 62235
131) B* M	7.64	63.31	MASY Brassica napus (P13244) Malate synthase, glyoxysomal. pl: 7.63, Mw: 63728
132) C, B EF	7.33	62.68	PP147 ARATH (Q9SI53) Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g03880, mi... pl: 7.30, Mw: 63022
133) B EF	7.06	60.81	4CLL3 ARATH (Q3E6Y4) 4-coumarate--CoA ligase-like 3. pl: 7.04, Mw: 60499 LAC13 ARATH (Q9LYQ2) Laccase-13. pl: 7.08, Mw: 60770
134) C,B EF	7.22	59.93	PME Brassica napus (P41510) Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor. Chain: 23-584, pl: 7.20, Mw: 60829
135) C EF	7.03	56.43	CATA2 Cucurbita pepo (P48351) Catalase isozyme 2. pl: 7.04, Mw: 56954

136) B M	7.18	54.88	1A11_ARATH (Q06429) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein 1. pl: 7.16, Mw: 55003
137) C,B M	7.63	56.43	NU4C_PHAVU (A4GGE6) NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 4, chloroplastic. pl: 7.63, Mw: 55920 C71BQ_ARATH (Q9LTL0) Cytochrome P450 71B26. pl: 7.63, Mw: 57080
138) B EF	7.37	52.88	PP422_ARATH (Q9LVS3) Pentatricopeptide repeat-containing protein At5g47360. pl: 7.38, Mw: 53784
139) C, B* M	7.63	50.91	CIPK3_ARATH (Q2V452-1) Isoform 1 of CBL-interacting serine/threonine-protein kin... pl: 7.63, Mw: 51692
140) B EF	7.84	51.90	FBD5_ARATH (Q9C8Y6) FBD-associated F-box protein At1g66310. pl: 7.86, Mw: 50199
141) B EF	7.03	49.93	FB58_ARATH (Q0WQM8) F-box protein At1g53790. pl: 7.03, Mw: 51031
142) B* M	7.14	43.25	GATL9_ARATH (O04536) Probable galacturonosyltransferase-like 9. pl: 7.16, Mw: 44259
143) B M	7.33	42.29	GCST_ARATH (O65396) Aminomethyltransferase, mitochondrial. pl: 7.33, Mw: 41747
144) C, B* M	7.0	38.45	KPRS2_ARATH (Q42583) Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2, chloroplastic. pl: 7.00, Mw: 38639
145) C, B* M	7.18	36.53	G3PA_Pisum sativum (P12858) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic. pl: 7.16, Mw: 36186 C3H35_ARATH (Q6IDS6) E3 ubiquitin-protein ligase makorin. pl: 7.16, Mw: 36563
146) B EF	7.4	36.53	FB330_ARATH (Q8LB33) F-box protein At3g58530. pl: 7.44, Mw: 39733
147) B EF	7.5	36.53	PPCS1_ARATH (Q8GXR5) Phosphopantothenate--cysteine ligase 1. pl: 7.54, Mw: 35369
148) B M	7.6	36.05	GBLPA_ARATH (O24456) Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like prot. pl: 7.61, Mw: 35748
149) B* M	7.73	36.05	PER34_ARATH (Q9SMU8) Peroxidase 34. pl: 7.71, Mw: 35696
150) C, B* M	7.13	34.41	PER61_ARATH (Q9FLV5) peroxidase 61. pl: 7.11, Mw: 34651
151) B* M	7.1	32.88	CTL1_ARATH (Q9MA41) Chitinase-like protein 1. pl: 7.11, Mw: 32940
152) B* M	7.35	30.09	ULT1_Arabidopsis thaliana (Q8GZA8) Protein ULTRAPETALA 1., pl: 7.34, Mw: 26744
153) B* M	7.53	29.61	MYB3_ARATH (Q9S9K9) Transcription factor MYB3. pl: 7.54, Mw: 29352
154) C EF	7.6	29.80	SEN22_ARATH (Q9LSS3) tRNA-splicing endonuclease subunit Sen2- 2. pl: 7.61, Mw: 28519
155) C EF	7.6	26.44	GATA4_ARATH (O49743) GATA transcription factor 4. pl: 7.61, Mw: 26467
156) B* M	7.73	24.77	ERF2_TOBAC (Q40479) Ethylene-responsive transcription factor 2. pl: 7.74, Mw: 25563
157) B* M	7.83	24.77	RA210_ARATH (Q9SW63) Ethylene-responsive transcription factor RAP2-10. pl: 7.83, Mw: 21362
158) B EF	7.06	23.82	GDL3_ARATH (Q9LMS5) GDSL esterase/lipase At1g18120. pl: 7.05, Mw: 23234
159) B* M	7.4	23.82	ULT1_ARATH (Q8GZA8) Protein ULTRAPETALA 1. pl: 7.34, Mw: 26744
160) B EF	7.2	24.63	PUR3_ARATH (P52422) Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, chloroplastic. pl: 7.24, Mw: 24958
161) C EF	7.6	20.95	FK130_ARATH (Q9FFV5-2) Isoform 2 of F-box/kelch-repeat protein At5g38670 OS pl: 7.61, Mw: 20770
162) C EF	7.6	19.95	FK130_ARATH (Q9FFV5-2) Isoform 2 of F-box/kelch-repeat protein At5g38670 pl: 7.61, Mw: 20770 CITRX_ARATH (Q9M7X9-2) Isoform 2 of Thioredoxin-like protein CITRX, chloroplasti... pl: 7.62, Mw: 19413
163) C EF	7.6	17.38	U4974_ARATH (Q3ECT8) Putative UPF0497 membrane protein At1g49405. pl: 7.63, Mw: 16638
164) B EF	7.4	11.92	IP25_SOLTU (Q41488) Proteinase inhibitor type-2 P303.51. pl: 7.36, Mw: 13966
165) B M	7.8	11.53	NDUS6_ARATH (Q9M9B4) NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron- sulfur protein 6. pl: 7.83, Mw: 12530
166) B* M	8.03	53.87	1A18_ARATH (Q9T065) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8. pl: 8.00,

			Mw: 53371
167) B EF	8.16	53.87	ZDH10 ARATH (Q9M306) Probable S-acyltransferase At3g48760 . pl: 8.16, Mw: 53696
168) B M	8.43	56.43	NU4C Gossypium hirsutum (Q2L955) NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 4, chloroplastic . pl: 8.44, Mw: 56263 C71BF ARATH (Q9LW27) Cytochrome P450 71B15 . pl: 8.44, Mw: 56062
169) B M	8.66	56.43	NU4C Helianthus annuus (Q1KXQ3) NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 4, chloroplastic . pl: 8.65, Mw: 56096 C81D1 ARATH (Q9FG65) Cytochrome P450 81D1 . pl: 8.65, Mw: 56724
170) B EF	8.86	51.70	FMO2 ARATH (Q9FKE7) Putative flavin-containing monooxygenase 2 . pl: 8.85, Mw: 51562
171) B EF	8.84	44.22	FB45 ARATH (P0C2G5) Putative F-box protein At1g47800 . pl: 8.83, Mw: 44144
172) B* M	8.84	42.29	MAN4 SOLLC (Q8L5J1) Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 4 . pl: 8.83, Mw: 42394
173) B* EF	8.26	39.41	DOF56 ARATH (Q9FM03) Dof zinc finger protein DOF5.6 . pl: 8.28, Mw: 39801
174) B M	8.35	39.41	B3GT9 ARATH (Q5XEZ1) beta-1,3-galactosyltransferase 9 . pl: 8.36, Mw: 39059
175) B EF	8.1	36.53	PUM18 ARATH (Q9LVG3) Pumilio homolog 18 . pl: 8.09, Mw: 36838
176) B EF	8.4	35.28	CCSA TOBAC (P12216) Cytochrome c biogenesis protein ccsA . pl: 8.38, Mw: 35559
177) B EF	8.23	31.72	NAC42 ARATH (Q9SK55) NAC domain-containing protein 42 . pl: 8.24, Mw: 31456
178) B M	8.53	31.72	CHIT_SOLTU (P05315) Endochitinase . pl: 8.53, Mw: 31737
179) B M	8.03	21.15	NDHI Ranunculus macranthus (A1XGT7) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I, chloroplastic . pl: 8.05, Mw: 20831 NDHI Nandina domestica (Q09FQ6) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I, chloroplastic . pl: 8.05, Mw: 20794
180) B M	8.24	21.5	NDHK Jasminum nudiflorum (Q06RC5) NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K, chloroplastic . pl: 8.24, Mw: 23977
181) B* M	8.9	25	EXP11 ARATH (Q9LNU3) Expansin-A11 . Chain: 21-252, pl: 8.91, Mw: 24818
182) B R	8.9	21.5	EF110 ARATH (Q70II3) Ethylene-responsive transcription factor ERF110 . pl: 8.91, Mw: 24257 CYB6 Calycanthus floridus (Q7YJU8) Cytochrome b6 . pl: 8.91, Mw: 24139 U4976 ARATH (Q9ZQI2) UPF0497 membrane protein At2g27370 . pl: 8.91, Mw: 24162
183) B EF	8.9	20.81	API7 SOLTU (Q41448) Aspartic protease inhibitor 7 . pl: 8.91, Mw: 20881
184) B EF	8.9	20.13	U4975 ARATH (Q1PFB8) UPF0497 membrane protein At1g79780 . pl: 8.91, Mw: 20011
185) B EF	8.9	17.05	MO10 ARATH (P93275) Uncharacterized mitochondrial protein AtMg00010 . pl: 8.93, Mw: 16759
186) B* R	8.9	14.23	GRP3 ARATH (Q9SL15-2) Isoform 2 of Glycine-rich protein 3 pl: 8.94, Mw: 13656
187) B T	8.9	13.07	SUI1 ORYSI (A6MZM2) Protein translation factor SUI1 homolog . pl: 8.91, Mw: 12732 SUI1 MAIZE (P56330) Protein translation factor SUI1 homolog . pl: 8.91, Mw: 12705
188) B EF	8.93	10.76	GRP1 ORYSJ (A3CG83) Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 . pl: 8.91, Mw: 11382
189) B* M	9.66	53.87	ABAH4 ARATH (Q9LJK2) Abscisic acid 8'-hydroxylase 4 . pl: 9.66, Mw: 53922
190) B*	9.66	36.53	WRK74 ARATH (Q93WU6) Probable WRKY transcription factor 74 . pl: 9.67, Mw: 36514