

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EXPRESIÓN DE LOS GENES *Sbvp1* Y *SbGA20-
OXIDASA* EN LAS LÍNEAS DE SORGO REDLAND
B2 E IS9530 CULTIVADAS EN MÉXICO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

Biol. Exp. Juan Manuel Villa Hernández

TUTORA:

Dra. LAURA JOSEFINA PÉREZ FLORES

ASESORES:

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández.
Dr. Francisco José Fernández Perrino.

**“EXPRESIÓN DE *Sbvp1* y *SbGA20-*
OXIDASA EN LAS LÍNEAS DE
SORGO REDLAND B2 E IS9530
CULTIVADAS EN MÉXICO”**

T E S I S

QUE PRESENTA EL

Biol. Exp. Juan Manuel Villa Hernández

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

COMITÉ TUTORAL

TUTORA DE TESIS

Dra. Laura J. Pérez Flores
Profesor Titular “C” Tiempo Completo
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
ljpf@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández
Profesor Asociado “C” Tiempo Completo
Departamento de Ecología y Recursos Naturales
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México
osunafer@igo.com.mx

ASESOR

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Profesor Titular “C” Tiempo Completo
Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
fjfp@xanum.uam.mx

El Posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa formó parte del padrón de programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0 y del padrón de programas de PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32; actualmente se encuentra dentro del padrón de programas PNP-CONACYT.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca otorgada por CONACYT con número 176202.

Este proyecto se llevó a cabo con financiamiento de la UAM y de REDES de Cuerpos Académicos PROMEP CA (UAM, UNACH, UC Davis California, EUA).

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Expresión de los genes *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa* en las líneas de sorgo Redland B2 e IS9530**” con fecha

PRESIDENTE

Dr. Francisco José Fernández Perrino

SECRETARIO

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

VOCAL

M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez

AGRADECIMIENTOS

mmm... siempre dije que los iba a escribir hasta el momento que fuera a imprimir la tesis, y qué creen? mañana voy a imprimirla y pues aquí estoy.

Esto es un reflejo del gran apoyo y amor de mis padres y hermanos que siempre han estado conmigo, para ustedes con mucho amor y cariño. Para toda la enorme familia que tengo, gracias!

Un agradecimiento especial para la Dra. Laura Pérez, por el apoyo y la enorme confianza que me ha depositado desde el día que llegue a su cubículo para pedirle si podía integrarme a su equipo de trabajo para iniciar el PDI, con cariño, gracias doctora.

A un gran profesor que me brindo no solo el conocimiento también su amistad, gracias Fer Días de León.

A una persona que siempre me ha ayudado en todo, hasta el día de ayer (9 de diciembre de 2006) y que me ha abierto no solo las puertas de su casa, igual las de su vida, gracias Bety!

Gracias a mis asesores la Dra. Reyna y el Dr. Perrino por la espera para todo esto y por el apoyo y los conocimientos que me impartieron

A todos mis compañeros del laboratorio S-253, Julio, Janeth, Fer Rivera, Xochitl, Lluvia, Saraí, Maribel, Lucy y a los que ya no están, no porque hayan †, que quede claro, simplemente ahora hacen otras cosas.

Y claro que no podía faltar mencionar a mi amigos: Alethia, Cris, Haydeé, Carlos, Paola, Memo, Argelia, Lety, Sonia, Tania, Edgar, Jorge, Iván, gracias!

Y finalmente, gracias a mi, por aguantar todo y porque voy a aguantar lo que falta

“No voy a dejar de hablar sólo porque nadie me esté escuchando. Me gusta escucharme a mí mismo, es uno de mis mayores placeres. A menudo tengo largas conversaciones conmigo mismo, y soy tan inteligente que a veces no entiendo ni una palabra de lo que digo”

Oscar Wilde

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 IMPORTANCIA DE LAS SEMILLAS	6
2.2 DESARROLLO DE LAS SEMILLAS	6
2.3 GERMINACIÓN	7
2.4 LATENCIA DE LAS SEMILLAS.....	10
2.4.1. Latencia endógena	11
2.4.2. Latencia exógena	11
2.5 EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO Y LATENCIA DE LAS SEMILLAS	14
2.6 BROTADO PRE-COSECHA O GERMINACIÓN PREMATURA	16
2.7 PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS VEGETALES EN EL CONTROL DE LA LATENCIA Y BPC	18
2.7.1. Ácido Abscísico	20
2.7.2. Giberelinas	22
2.8 SENSIBILIDAD DIFERENCIAL A LAS HORMONAS EN GRANOS DE SORGO CON DISTINTA SUSCEPTIBILIDAD AL BPC	26
2.9 PARTICIPACIÓN DEL GEN <i>Sbvp1</i> EN LA RESISTENCIA AL BPC	27
2.10 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL BPC	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
HIPÓTESIS	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1 CULTIVO DE SEMILLAS DE SORGO	36
4.1.1. CULTIVO SE SORGO EN CONDICIONES DE INVERNADERO ...	36
4.1.2. CURVA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS CULTIVADAS EN MÉXICO	37
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA ENZIMA GA20- OXIDASA EN DOS LÍNEAS DE SORGO QUE NO EXPRESAN SUSCEPTIBILIDAD AL BPC	37

4.2.1. Extracción de ADN de hojas de plantas de sorgo de ambas líneas	37
4.2.2. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	38
4.2.3. Inactivación de las endonucleasas y purificación del ADN	38
4.2.4. Recircularización del ADN y PCR inversa	39
4.2.5. Amplificación de los productos por PCR inversa	40
4.3 SELECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA LA EXPRESIÓN DE GENES <i>Sbvp1</i> y <i>SbGA20-oxidasa</i>	42
4.3.1. Imbibición de semillas de sorgo de ambas líneas	42
4.3.2. Extracción de ARN total	43
4.3.3. Integridad del ARN por análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes	43
4.3.4. Amplificación RT-PCR de los genes <i>Sbvp1</i> y <i>SbGA20-oxidasa</i> en semillas de sorgo	44
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS CULTIVADAS EN MÉXICO	47
5.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>SbGA20-oxidasa</i> EN SEMILLAS DE SORGO DE LAS LÍNEAS IS9530 Y REDLAND B2	49
5.2.1. Extracción y digestión del ADN	49
5.2.2. Recircularización y purificación del ADN	50
5.2.3. PCR inversa de fragmentos ligados	52
5.3 PUREZA Y RENDIMIENTO DEL ARN DE EMBRIONES DE SEMILLAS DE SORGO QUE NO PRESENTAN BPC	56
5.4 INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL	56
5.5 EXPRESIÓN DEL GEN <i>Sbvp1</i> EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE SORGO DE LAS LÍNEAS IS9530 Y REDLAND B2 PROCEDENTES DE PLANTAS CULTIVADAS EN MÉXICO	57
5.6 EXPRESIÓN DEL GEN <i>SbGA20-OXIDASA</i> EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE SORGO DE LAS LÍNEAS IS9530 Y REDLAND B2 PROCEDENTES DE PLANTAS CULTIVADAS EN MÉXICO	60
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	64
7. BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	75

1. RESUMEN

El Brotado Pre-Cosecha (BPC) es un problema común en cereales. Ocurre durante la maduración de la semilla y se presenta por lo general cuando el periodo de cosecha coincide con condiciones de humedad ambiental muy elevadas. Estudios previos en sorgo han demostrado que la susceptibilidad al BPC depende, entre otros factores, del balance hormonal entre el ácido abscísico, que inhibe la germinación, y las giberelinas, que la promueven. El balance hormonal depende de la sensibilidad de los tejidos a estas hormonas, así como de los niveles endógenos de éstas.

En particular, se han estudiado dos líneas de sorgo que cultivadas en Argentina en condiciones de alta humedad presentan susceptibilidad contrastante al BPC, siendo IS9530 resistente y Redland B2 susceptible. Se ha reportado que las semillas resistentes al BPC (IS9530) tienen un mayor grado de latencia que las semillas susceptibles (Redland B2). Asimismo, se encontró que la latencia está impuesta por la testa, ya que los embriones aislados de ambas líneas germinaron con igual velocidad. Respecto a los niveles endógenos de ácido abscísico, no se reportaron diferencias significativas en las dos líneas estudiadas. Sin embargo, sí se encontraron diferencias en la sensibilidad a esta hormona, siendo diez veces más sensible la línea resistente (IS9530) que la línea susceptible (Redland B2).

A nivel molecular, se ha reportado la expresión de genes regulatorios que participan en la síntesis de giberelinas (*GA 20-oxidasa*) y en la transición maduración-germinación (*Vp1*). Se encontraron diferencias en la expresión del gen de la enzima *GA 20-oxidasa*, con altos niveles de transcripción en los embriones susceptibles al BPC (Redland B2), mientras que casi no se detectó expresión en los embriones resistentes (IS9530). Asimismo, se encontró que el ABA inhibió la expresión del gen de *GA 20-oxidasa* disminuyendo los niveles de las GA's. Por otro lado, la expresión durante la ontogenia del gen homólogo a *Vp1* en ambas líneas de sorgo (*Sbvp1*) fue elevada en embriones. Además, se encontró que durante la imbibición de carióspsides maduros, 40 días postantétesis (DPA), la expresión de este gen es mayor en semillas de la línea

resistente, manteniéndose durante todo el tiempo de imbibición, mientras que en cariósides de la línea susceptible la expresión disminuye a partir de los dos días de imbibición.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se reportó que las condiciones ambientales en que se cultivan las semillas de sorgo y el tiempo de almacenamiento influían en la aparición del brotado precosecha. Al respecto, en este trabajo se observó que las semillas de ambas líneas cultivadas en México no presentaron brotado precosecha y la velocidad de germinación aumentó significativamente en las semillas de la línea IS9530 tanto para las semillas de plantas cultivadas en la UAM como de plantas cultivadas la UNAM. Por otro lado, se observó que las semillas de Redland B2 mostraron una disminución en su velocidad de germinación y su capacidad germinativa, alcanzando porcentajes de germinación por debajo de los alcanzados por IS9530. Este comportamiento es contrario al observado en las semillas de plantas cultivadas en Argentina que presentaron susceptibilidad contrastante al brotado precosecha, y en las que las semillas de la línea Redland B2 germinaban más rápido que las de IS9530 y los granos de 60 DPA de IS9530 no rebasaron el 20% de índice de germinación (Benech-Arnold y col., 2000; Avendaño-Gómez, 2005).

El objetivo general de este trabajo fue analizar la expresión de los genes *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa* en semillas de sorgo de las líneas IS9530 y Redland B2 procedentes de plantas cultivadas en México. Se utilizaron semillas maduras (más de 60 DPA) cosechadas en el año 2003. Los resultados de este trabajo demuestran que las semillas de IS9530, procedentes de plantas cultivadas en México presentaron una velocidad de germinación mayor a la de las semillas Redland B2. Con respecto a los niveles de transcritos del gen *Sbvp1* en los embriones de semillas de IS9530 se observó que permanecen elevados durante todo el periodo de incubación y no correlacionan con la mayor velocidad de germinación de estas semillas. Por otra parte, se encontró que los niveles de los transcritos de *SbGA20-oxidasa* en las semillas de IS9530 se incrementan con respecto a los detectados en estas semillas en Argentina. Estos resultados, conjuntamente con la mayor sensibilidad a las GA's reportada

en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo podrían explicar al menos parcialmente los cambios en la susceptibilidad al BPC y velocidad de germinación observados en estas semillas.

Lo anterior sugiere que la aparición del brotado precosecha está regulada entre otros factores, por las condiciones ambientales, tales como la temperatura y la precipitación pluvial) que estén involucrados en la sensibilidad al BPC.

ABSTRACT

The pre-harvest sprouting behavior is a common problem in cereals. This phenomenon occurs during the ripening of the seed and generally when the period of harvest coincides with conditions of very high environmental humidity is presented. In previous studies with sorghum have shown that the different expression of pre-harvest sprouting behavior depend of the balance between abscisic acid (ABA), this hormone inhibits the germination and gibberellins (GAs) which promotes the seed germination. This hormonal balance depends of the tissues sensitivity and the endogenous levels of the hormones.

Particularly, two lines of sorghum have been studied in Argentina which have been cultivated in high humidity conditions and show different pre-harvest sprouting behavior, IS9530 (sprouting-resistant) and Redland B2 (sprouting-susceptible). It has been reported that sprouting-resistant seeds (IS9530) have a higher dormancy than the sprouting-susceptible seeds (Redland B2). Moreover, the reports demonstrated that the isolated embryos of both lines germinated with equal speed indicated that the dormancy is imposed by the seed coat. In the two lines of sorghum studied no significant differences were observed in the endogenous levels of ABA, but the sensitivity changes in the sorghum lines. The sprouting-resistant seeds (IS9530) are ten times more sensible to this hormone than the sprouting-susceptible seeds (Redland B2).

At molecular level, the expression of regulatory genes in the synthesis of gibberellins (*GA 20-oxidase*) and in the transition maturation-germination (*Vp1*) has been reported. Expression analysis of the gene of enzyme *GA 20-oxidase* indicated that sprouting-susceptible seeds (Redland B2) present high levels of transcription whereas in the sprouting-resistant seeds (IS9530) almost not transcription was detected. Also, the reports indicated that ABA suppresses transcription of the gene of *GA 20-oxidase* and low levels of gibberellins were observed. On the other hand, the expression of the homologous gene of *Vp1* during seed development in both lines of sorghum (*Sbvp1*) was higher in embryos. In addition, the expression of the *Sbvp1* in IS9530 mature caryopses (40 DPA) was higher; this expression was maintained during the all days of

imbibition (four days), whereas in susceptible caryopses the expression diminishes at two of days of imbibition.

In previous studies of our group was reported that the environmental conditions in which the seeds of sorghum are cultivated and the time of storage influenced in the appearance of the pre-harvest sprouting behavior. Particularly, was detected that the seeds of both lines cultivated in Mexico not present pre-harvest sprouting behavior and the speed of germination significantly increased in the seeds of line IS9530 cultivated in the UAM and UNAM. Also, we observed that Redland B2 seeds have a lower speed and capacity of germination in relation whit IS9530. This phenomenon is contradictory whit the observed in seeds cultivated in Argentina. These seeds present in Argentina pre-harvest sprouting behavior and the germination was faster in the Redland B2 seeds more that the IS9530 seeds whit the germination index of the 20%.

The general objective of this work was analyzed the expression of the gene *Sbvp1* and *SbGA20-oxidase* in two lines of sorghum: IS9530 (sprouting-resistant) and Redland B2 (sprouting-susceptible) cultivated in Mexico. The seeds used were cultivated in 2003 and have more the 60 DPA. The results indicated that the IS9530 seeds germinated more faster that Redland B2 seeds. The transcript level of gene *Sbvp1* in IS9530 seeds was increased during incubation period (four days) but was not correspond to the speed of germination. On the other hand, the transcript level of the *SbGA20-oxidase* in IS9530 seeds was higher compared whit the observed in Argentina. These results and the increase observed previously in the sensitivity of gibberellins partially could explain the changes observed in the pre-harvest sprouting behavior and the germination speed. Also, these results suggest that the pre-harvest sprouting behavior is regulated by various factors how the environmental conditions between them temperature and rain involved in the sensitivity at pre-harvest sprouting.

2. ANTECEDENTES.

2.1 IMPORTANCIA DE LAS SEMILLAS

Las semillas son un componente vital de la dieta mundial. Los granos de cereales, que comprenden el 90% de todas las semillas cultivadas, contribuyen a la mitad de abastecimiento de energía por persona.

Las semillas se consideran la unidad básica de dispersión de la planta para su supervivencia. La semilla, que contiene al embrión como una nueva plántula en miniatura, está estructural y fisiológicamente equipada para funcionar como una unidad de dispersión, de tal forma que contiene reservas alimenticias para sostenerse mientras que la plántula en desarrollo se establece como un organismo autótrofo (Bewley, 1997).

2.2 DESARROLLO DE LA SEMILLA.

El proceso de formación de la semilla comienza a partir del término del proceso de polinización en las estructuras reproductoras de la planta. Se pueden distinguir tres fases de desarrollo de la semilla: 1^a) Comienza con el desarrollo del embrión. Después de la fusión sexual, se produce una rápida división celular, y al final de este estado, el embrión, que será el que dará lugar a una nueva planta durante la germinación de la semilla, está casi completamente formado. El contenido de humedad y la actividad respiratoria durante esta etapa son altos. 2^a) Durante esta etapa continúa la acumulación de reservas alimenticias, las cuales se sintetizan en diversas partes de la planta y son transportadas a la semilla en desarrollo. Estas reservas se depositan principalmente en el endospermo de la semilla. En las semillas llamadas no endospermicas, el material de reserva es absorbido por el embrión y almacenado en hojas especiales llamadas cotiledones. Durante esta fase, el contenido de humedad desciende hasta un 50% aproximadamente, y la actividad respiratoria disminuye. Al final de esta etapa, se puede decir que la semilla está estructuralmente completa. 3^a) Etapa de maduración de la semilla.

Durante esta fase, las semillas ortodoxas, prácticamente no aumentan en materia y la humedad baja hasta un 10-20%. Se separa la conexión con la planta madre, provocando que se corte el suministro de agua y se forma un punto de debilidad estructural del que se puede separar fácilmente la semilla madura (Ting, 1982; Bewley y Black, 1994)

Existen variaciones en la duración de cada etapa del desarrollo de una semilla, ya que se requiere de tiempos variables y condiciones particulares que dependen de las especies y de las condiciones ambientales imperantes durante el desarrollo.

2.3 GERMINACIÓN

Para que el embrión de una semilla se establezca como un organismo autótrofo necesita germinar. En términos fisiológicos y bioquímicos la germinación se define como la protrusión del embrión (generalmente la radícula) a través de la testa y comienza con la entrada de agua en la semilla seca. Las condiciones ambientales como la luz, la temperatura y la disponibilidad de agua y oxígeno y factores intrínsecos como la latencia la permeabilidad de la testa al agua y oxígeno están implicados para que una semilla germine o no. Como la mayoría de semillas pasan por un período de desecación durante la maduración, la primera fase de la germinación comienza con la absorción de agua (imbibición), aunque ésta absorción puede tener éxito sólo cuando la temperatura es apropiada. En la mayor parte de los casos también hay necesidad de oxígeno, ya que la respiración oxidativa se activa, aunque algunos autores sugieren que en las etapas tempranas la energía se obtiene a través de la fermentación (Bewley y Black; 1994; Bewley, 1997; Bove y col., 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, el proceso de germinación inicia cuando la semilla se rehidrata. La toma de agua por la semilla madura deshidratada ocurre en tres etapas: en la fase I se lleva a cabo la absorción inicial del agua, la cual es consecuencia principalmente del potencial mátrico de la semilla, debido a las macromoléculas constituyentes de las semillas. Esta etapa ocurre

tanto en las semillas viables como en las semillas no viables. Es independiente de la actividad metabólica de la semilla y se inicia rápidamente al entrar la semilla en contacto con el agua. En la fase II se observa que prácticamente no hay ganancia de peso fresco, no obstante, se trata de un periodo de metabolismo activo que prepara la germinación. Durante esta etapa se reactivan las enzimas y hay un rápido aumento en la actividad respiratoria. Todos los componentes necesarios para el restablecimiento de la síntesis de proteínas durante la imbibición están presentes dentro de las células de los embriones secos maduros, aunque no están ensamblados en los polisomas. Sin embargo, en pocos minutos de rehidratación hay una disminución gradual de los monosomas y subunidades ribosomales, conforme éstos van siendo reclutados para formar complejos de polisomas para la síntesis de proteínas. Esta síntesis inicial es dependiente de los ribosomas y ARN mensajeros preexistentes o almacenados. Sin embargo, en las primeras horas que siguen al ensamblaje inicial de polisomas, nuevos ribosomas y ARN mensajeros son sintetizados y utilizados. Los ribosomas extraídos de las semillas imbibidas son muy activos en la síntesis de proteínas, que requiere gran cantidad de energía, por lo que se activa la respiración (en la cual se utilizan las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas del embrión que contribuyen al crecimiento hasta el establecimiento de la plántula autotrófica). La señal más evidente de que la germinación se ha completado es, en la mayoría de las semillas, la protusión de la radícula. La protusión ocurre entre las fases II y III de la imbibición (Moreno, 1996; Bewley, 1997).

La fase III ocurre después de la germinación y sólo la presentan las semillas viables no latentes. En esta fase la actividad metabólica es alta, e incluye el inicio de la movilización de las reservas almacenadas en el endospermo degradado por las hidrolasas sintetizadas en la capa de aleurona. Este proceso se inicia con la salida de minerales y la secreción de hidrolasas en la capa de aleurona y termina cuando los remanentes de las células son digeridos por las enzimas apoplásticas. Estos eventos subsecuentes a la germinación (posgerminativos) están asociados con el crecimiento y establecimiento de la nueva plántula (Bewley, 1997).

Se sabe que hay una variedad de factores internos u orgánicos (dadas las características propias de las semillas) y factores físicos y ambientales que controlan la germinación en las semillas (Baskin y Baskin, 1998).

En la figura 1 se muestran los eventos metabólicos durante la germinación de una semilla, desde la fase de inicio (imbibición de la semilla) hasta los eventos postgerminativos y la fase de crecimiento de la plántula.

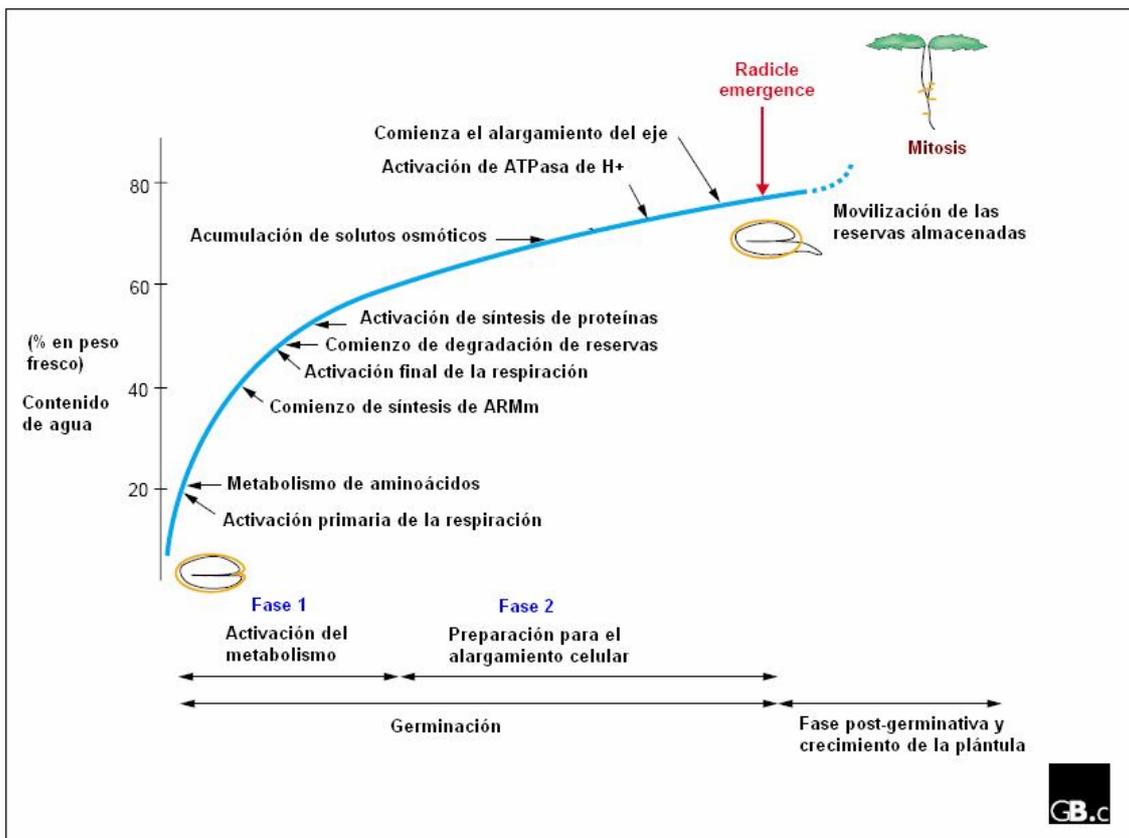


Figura 1. Procesos celulares y metabólicos durante la germinación de una semilla. La germinación inicia con la entrada de agua en la semilla y termina con la protusión de la radícula a través de la testa (Bove y col., 2001).

Gallardo y colaboradores (2001), realizaron un análisis proteómico de semillas de *Arabidopsis* del ecotipo Landsberg erecta durante la germinación. Observaron que cerca de 1300 proteínas se encontraron presentes durante el tiempo de imbibición de las semillas. Muchas de estas proteínas se encontraron presentes desde las semillas quiescentes (semillas secas).

Durante las primeras horas de la germinación, las proteínas presentes son responsables de reactivar el metabolismo y no se lleva a cabo la traducción. Conforme las semillas absorben agua se reactiva la síntesis de proteínas y a las 24 horas de imbibición hay un incremento en los niveles de proteínas que están correlacionadas con la reactivación de la actividad del ciclo celular. Posteriormente, las proteínas que se acumulan están relacionadas con la movilización de las reservas de alimento. Por otro lado, también se observó un incremento en la acumulación de proteínas relacionadas con otras vías metabólicas (como por ejemplo la catalasa, aconitasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa entre otras) (Gallardo y col., 2001).

2.4 LATENCIA DE LAS SEMILLAS.

Con frecuencia puede ocurrir que las semillas no germinen, aún cuando las condiciones ambientales sean adecuadas, lo que se conoce como latencia. La latencia se define como la incapacidad de la semilla viable para completar la germinación bajo condiciones favorables, y permite a las semillas ventajas adaptativas ya que amplía y optimiza la distribución espacio-temporal de la germinación dentro de una población de semillas. (Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 1998).

Se ha observado que las semillas latentes llevan a cabo los eventos de la fase I y II de la imbibición. Sin embargo, no completan la germinación y no entran en la fase III de imbibición. Las funciones celulares y metabólicas, que ocurren antes de que se complete la germinación en semillas sin latencia, también ocurren en aquellas con latencia. Por lo tanto, las semillas latentes pueden realizar la mayoría de los procesos metabólicos para germinar, aunque aún no se conocen por completo las causas por las que el eje embrionario no crece y no completa la germinación (Bewley, 1997).

En la agricultura, la latencia representa un problema para los productores de granos de cereales en cultivos ya que retrasa la germinación o causa en una población de semillas una germinación heterogénea, lo que también produce

problemas en la cosecha. A pesar de estas desventajas de la latencia, en la agricultura intensiva es necesario cierto grado de latencia en las semillas para prevenir la germinación de los granos mientras todavía se encuentran en la planta parental, impidiendo el Brotado Pre-Cosecha (BPC) (Bewley, 1997).

La latencia que resulta de algunas características de las semillas que previenen la germinación se llama latencia orgánica. Se considera que existen dos tipos de latencia orgánica: la endógena y la exógena, que a su vez presentan distintos subtipos.

2.4.1. Latencia endógena

En la latencia endógena alguna(s) característica(s) del embrión previene(n) la germinación (Baskin y Baskin, 1998). Se subdivide en:

- *2.4.1.1. Latencia fisiológica.* Es causada por un mecanismo de inhibición fisiológica del embrión, aunque podrían estar participando la testa, el endospermo y las paredes de los frutos indehiscentes. La latencia fisiológica puede ocurrir en tres niveles: no profunda, intermedia y profunda.
- *2.4.1.2. Latencia morfológica.* Es una inhibición dada por características morfológicas. Está relacionada con la inhibición de la germinación durante la etapa del desarrollo y crecimiento del embrión, lo que se conoce como maduración.
- *2.4.1.3. Latencia morfofisiológica.* Es una combinación de ambas latencias y se presenta en semillas con embriones rudimentarios.

2.4.2. Latencia exógena

En la latencia exógena, alguna(s) característica(s) de las estructuras que cubren al embrión (la testa, el endospermo, el pericarpio, etc.) previene(n) la germinación (Baskin y Baskin, 1998). Se subdivide en:

- 2.4.2.1. *Latencia física*. Esta relacionada con la impermeabilidad de la cubierta de la semilla al agua o gases, ya que es el resultado de la presencia de células lignificadas en la testa.
- 2.4.2.2. *Latencia física y fisiológica*. Existe en algunas semillas que presentan cubiertas impermeables y embriones latentes.
- 2.4.2.3. *Latencia mecánica*. Dada por la presencia de un exocarpo duro y/o leñoso.
- 2.4.2.4. *Latencia química*. Se debe a la presencia de inhibidores sintetizados en, o translocados a la semilla, que bloquean el crecimiento del embrión. Estos inhibidores de la germinación se han encontrado en el embrión, el endospermo, la testa y, en algunas especies, en las estructuras que se dispersan junto con las semillas. Una complicación en el estudio de la latencia química es que puede ser causada por dos factores: que el embrión se vuelva más sensible a los inhibidores de la germinación, o que se dejen de producir sustancias promotoras de la germinación (por ejemplo, las giberelinas). En estudios hechos en semillas de *Corylus avellana* en los que se aplica exógenamente ABA y GA's, se observó que el ABA antagoniza el efecto de las GA's. Por otro lado, se ha observado que las giberelinas superan los efectos inhibitorios del ácido abscísico en cariopsides intactos de *Hordeum vulgare* pero no en embriones aislados (Bradbeer y Pinfield, 1966; Dunwell, 1981).

La latencia se puede perder con el paso del tiempo o mediante diversos estímulos ambientales. Algunas semillas latentes pueden persistir durante muchos años en el suelo antes de germinar (Bewley, 1997).

Wedner y Paprocka (1997) proponen que la latencia de cariopsides de cereales puede estar controlada parcialmente por niveles altos de ácidos fenólicos libres, ya que éstos tienen efectos inhibitorios sobre la germinación y la división celular. Estudios hechos con mutantes de semillas de *Arabidopsis*, las cuales tienen afectada la estructura de la testa, han revelado que de esta forma se reduce la latencia y se incrementa la toma de agua, lo que tiene un efecto

positivo sobre la germinación. Por otro lado, un análisis de un doble mutante en *Arabidopsis* (*rdo1* y *rdo2*, mutantes con alteraciones en la latencia impuesta por el embrión) han demostrado que las proteínas RDO1 y RDO2 están involucradas en vías separadas en el desarrollo de la latencia. Se plantea que el gen *rdo2* controla uno de los pasos en la inducción de la latencia y su expresión es inducida por ácido abscísico (Léon-Kloosterziel y col., 1996; Debeaujon y col., 2000)

Se han realizado estudios en sorgo los cuales indican que estas semillas son latentes durante las primeras etapas de germinación. En trabajos realizados con tres variedades de semillas de sorgo (*Martin*, *Combine Kafir-60* y *Teterta*) Clark y sus colaboradores (1968) propusieron tres mecanismos involucrados en la latencia:

El primero está relacionado con la cantidad de agua inicial de la semilla, ya que cuando se realizó una curva de germinación con semillas recién cosechadas de las tres variedades, sin pasar por un proceso de deshidratación, se observó que todas tuvieron un índice de germinación (IG) bajo. Este comportamiento se debe a que cuando las semillas tienen un alto contenido de humedad, la relación osmótica dentro de éstas puede prevenir que el embrión se imbibiera, evitando que tomen suficiente agua para germinar y disminuyendo así el IG. El impedimento de la entrada de agua al embrión puede deberse al endospermo, ya que si se disectan los embriones se puede promover la germinación. Por lo anterior, se considera que el proceso de deshidratación es necesario ya que llevaría a una pérdida del contenido de agua hasta por debajo del 25%, teniendo como consecuencia cambios en las propiedades del endospermo y generando una relación osmótica favorable para la imbibición del embrión.

El segundo mecanismo está asociado con el crecimiento activo de las semillas y funciona hasta que se completa el crecimiento, alcanzando la acumulación máxima de peso seco.

El tercer mecanismo esta dado por la velocidad de desarrollo de la semilla, ya que se ha observado que el desarrollo acelerado de las semillas está asociado con un mayor grado de latencia.

2.5 EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO Y LATENCIA DE LAS SEMILLAS.

Se ha demostrado que una sola planta puede producir semillas con distintos grados de latencia innata, es decir, que las semillas formadas presentan una distribución discontinúa de los periodos de latencia. En algunos casos, las diferentes características de las semillas producidas por plantas de la misma constitución genética pueden estar relacionadas con las condiciones ambientales a las cuales fue sometida la planta parental durante el periodo de formación y maduración de las semillas (Roberts, 1972).

Se ha reportado que los efectos maternos contribuyen substancialmente al fenotipo de germinación (como la latencia, dispersión y velocidad de germinación). Estos efectos se pueden considerar a tres niveles: 1) los del citoplasma genético, tomando en cuenta que varios organelos (plastidios, mitocondrias, etc.) son transferidos directamente de la planta materna durante la formación y desarrollo del óvulo; 2) los del endospermo nuclear, ya que la formación de éste implica 2 núcleos de origen materno y uno de origen paterno; 3) el fenotipo materno (que implica el genotipo y/o el ambiente, con factores como la temperatura, la humedad, la disponibilidad de nutrientes, la luz, etc.) en el que se encuentran las plantas parentales. La influencia de este último factor puede ocurrir a dos niveles, estructural y fisiológico (Roach y Wulff, 1987; Allen y Meyer, 1998).

Por ejemplo, la latencia de las semillas de avena producidas en plantas crecidas con un fotoperiodo de una hora durante la emergencia de las panículas, es mucho mayor que las producidas en plantas con un fotoperiodo de 18 horas.

De igual forma, en experimentos realizados con distintas variedades de avena, con diferentes lugares de origen y/o características de crecimiento, se determinó que las características morfológicas no se relacionan necesariamente con la fecha de brotado de las panículas o con el grado de latencia, sino que el brotado de las panículas se relaciona con la latitud de origen y la producción de las panículas con los fotoperiodos largos. Se concluyó que la influencia del ambiente en la morfología y la latencia de las semillas depende de la especie y el lugar de origen de éstas (Somody y col., 1984).

Ya se había mencionado también que el nivel de latencia de las semillas es determinado por varios factores que incluyen el origen genético, el ambiente materno, la edad de la planta parental durante la maduración y la posición de la semilla en la planta. Con respecto a esto, las diferentes condiciones durante la estratificación natural causan un mayor o menor grado en el nivel de latencia. Tales condiciones participan en la variación del porcentaje de germinación entre poblaciones, así como en diferencias en la germinación entre semillas cosechadas en diferentes años.

Al realizarse experimentos con semillas de cuatro especies diferentes (*Silene noctiflora*, *Sinapis arvensis*, *Spergula arvensis* y *Thlaspi arvense*), cosechadas en tres zonas (cada una en 1994 y 1995), se observaron variaciones en la latencia de las semillas en todos los niveles. Aunque no se pueden atribuir las diferencias de latencia entre poblaciones a diferentes ecotipos, es posible que a pesar de que las plantas estén cercanas y por lo tanto sometidas a las mismas condiciones ambientales, tengan respuesta distinta o tengan distinta disponibilidad de nutrientes en los suelos. Por otra parte, pequeñas diferencias en el tiempo de desarrollo pueden causar que las semillas maduren a diferentes temperaturas o en diferentes condiciones de humedad.

La variación del grado de latencia entre años de cosecha se explica como una adaptación de las poblaciones a climas desfavorables, lo que sugiere que las poblaciones de ambientes más favorables pero también impredecibles

muestran mayor variación en las características de germinación entre años que aquellas de ambientes extremos pero predecibles (Andersson y Milberg, 1998).

Independientemente del factor que influya en la germinación de las semillas, el destino de las semillas bajo condiciones naturales depende de su capacidad para germinar con la finalidad de que se maximice la sobrevivencia de la plántula.

Romagosa y colaboradores (2001) utilizaron semillas de dos líneas de cebada cosechadas en diferentes condiciones ambientales. Las líneas fueron Triumph y TL43. La línea TL43 presentó una germinación acelerada, una disminución de la latencia y toleraba un incremento de 10 veces más en los niveles de ABA antes de que se inhibiera su germinación; es decir, era 10 veces menos sensible al ABA que la línea Triumph. Ambas líneas fueron cultivadas en ambientes de alta y baja inducción de latencia en los años 1997, 1998 y 1999 en España y 1998, 1999 en Escocia. Las dos líneas presentaron latencia en las dos primeras semanas postantesis, aunque posteriormente TL43 se liberó de la latencia primaria en las primeras etapas de llenado de la semilla. En España, la línea TL43 disminuyó su latencia y las semillas germinaron precozmente durante su desarrollo, en comparación con las de la línea Triumph, y al llegar a la madurez TL43 presentó un mayor porcentaje de germinación. Aunque los autores no definen una relación entre la concentración de ABA y las diferencias en el grado de latencia, la insensibilidad al ABA y la similitud con el fenotipo *abi* (mutantes insensibles al ABA) son parte de un fenómeno común, más que eventos fenotípicos independientes.

2.6 BROTADO PRE-COSECHA O GERMINACIÓN PREMATURA.

El BPC se define como la germinación de las semillas en la planta parental, ocurre generalmente durante la maduración de las semillas y cuando se presentan altos niveles de humedad ambiental (por ejemplo cuando la cosecha coincide con la época de lluvias) (Kermode, 1990).

El brotado precosecha produce grandes pérdidas económicas en la industria agrícola, debido a las siguientes razones:

1. La pérdida de la viabilidad de las semillas como resultado de la desecación subsecuente, cuando el proceso de germinación ha avanzado más allá del “punto de no retorno” (Castor y Frederiksen, 1977)
2. La hidrólisis del almidón en el endospermo, que resulta en la disminución del peso del grano, lo que lleva a una pérdida de rendimiento así como a un aumento en la susceptibilidad al ataque de hongos saprófitos (Castor y Frederiksen, 1977).
3. Acortamiento significativo en la longevidad de las semillas (Benech-Arnold y col., 1995a).

Las bases fisiológicas y moleculares de la resistencia al BPC en semillas de sorgo granífero se han estudiado en dos líneas cultivadas en Argentina que presentan distinta susceptibilidad dependiendo de las condiciones ambientales. Estas líneas son la IS9530, la cual muestra un comportamiento de resistencia al BPC, y la Redland B2, que es susceptible al BPC en condiciones de alta humedad (Benech-Arnold y col.; 1995a, Benech-Arnold y col. 1995b; Benech-Arnold y col., 2000)

Se han realizado estudios de mapeo de QTLs para identificar regiones del genoma que afectan a la latencia y BPC en cereales. También se han aplicado estrategias de genética comparativa con los resultados obtenidos anteriormente, tomando como base la sintenia de cereales (Lijavetzky y col., 2000; Gale y col., 2002; Wilkinson y col., 2002).

Los resultados de estas investigaciones muestran que en estas líneas de sorgo la susceptibilidad al BPC está vinculada con la interrupción prematura de la latencia de las semillas en desarrollo. Es decir, que las semillas de la variedad susceptible presentan altas tasas de germinación mucho antes de alcanzar la madurez fisiológica; el índice de germinación de las semillas de la línea

Redland B2 se incrementa a partir de los 35 DPA en relación con el de las semillas de la línea IS9530, que aumenta a partir de los 55 ó 60 DPA (Benech-Arnold y col., 1995a).

2.7 PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS VEGETALES EN EL CONTROL DE LA LATENCIA Y BPC.

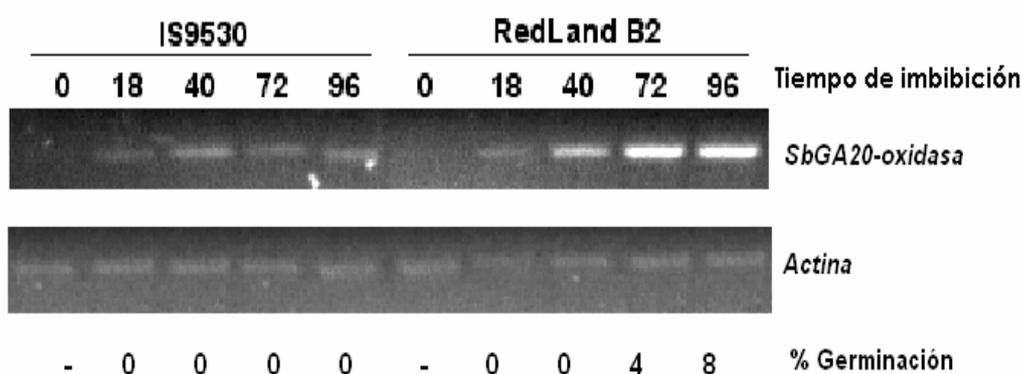
Los resultados de los estudios fisiológicos indican que los procesos bioquímicos involucrados en el control del BPC en sorgo se rigen por el balance entre dos hormonas vegetales: el ácido abscísico (ABA), el cual es un inhibidor de la germinación, y las giberelinas (GA's), las cuales se ha comprobado que promueven la germinación en semillas maduras. En este sentido, el balance hormonal estará determinado por las concentraciones endógenas de estas hormonas y/o por la sensibilidad de los tejidos a estos fitorreguladores, dada por la cantidad de receptores y/o la afinidad de éstos por las hormonas. (Buchanan y col., 2000).

Las diferencias en la susceptibilidad al BPC se han atribuido, en primera instancia, a los niveles de ABA y/o a la sensibilidad de los tejidos a esta hormona vegetal. En estudios previos se observó que no hay diferencias significativas en la cantidad de ABA endógeno presente en las dos líneas, IS9530 (resistente al BPC) y Redland B2 (susceptible al BPC). Sin embargo, sí se encontró diferencia en la sensibilidad al ABA, siendo diez veces más sensible la línea IS9530 que la línea Redland B2. A pesar de esto, la participación del ABA no explica en su totalidad la susceptibilidad al BPC (Benech-Arnold, 1995a).

Recientemente se ha demostrado que el grado de latencia en las semillas en desarrollo de sorgo depende de la capacidad con la que la acción del ABA es contrarrestada por el efecto de las GA's. Existen evidencias que indican la participación de las GA's en el grado de latencia de las semillas. A este respecto Benech-Arnold y colaboradores (1995a), aplicando paclobutrazol (inhibidor de la biosíntesis de GA's) en etapas tempranas (7 DPA) observaron

un alto grado de latencia en cariopses en desarrollo de la línea susceptible al BPC (Redland B2). También existe evidencia de que al aplicar fluridone, un inhibidor de la síntesis de ABA, en etapas tempranas del desarrollo de la semilla se disminuye la latencia en la línea resistente al BPC (IS9530). Además, la aplicación exógena de GA's estimula la germinación de granos en desarrollo latentes. Por todo lo anterior, estos estudios indican que los procesos involucrados en el control del BPC en sorgo, dependen del balance entre estas dos hormonas vegetales.

Se ha observado que la susceptibilidad diferencial al BPC de ambas líneas se pierde cuando se germinan embriones aislados o semillas que se han almacenado por más de 3 años. En concordancia con estos resultados, se detectaron diferencias en la expresión del gen de la GA-20 oxidasa en las semillas de ambas líneas, ya que se encontraron altos niveles de expresión en los embriones de las semillas susceptibles al BPC mientras que casi no se detectaron en los embriones resistentes (Figura 2). Asimismo, se encontró que el ABA inhibe la expresión de este gen, disminuyendo probablemente los niveles de GA's. Estos resultados sugieren que la latencia diferencial de ambas líneas pudiera deberse a la existencia de un factor en la cubierta que regula la expresión de este gen y que pudiera ser, por ejemplo el ABA. Otras causas de la latencia pudieran ser las características de la testa (grosor, presencia de células lignificadas, etc.) (Benech-Arnold y col., 1995b; Pérez-Flores y col, 2003; Avendaño-Gómez, 2005).



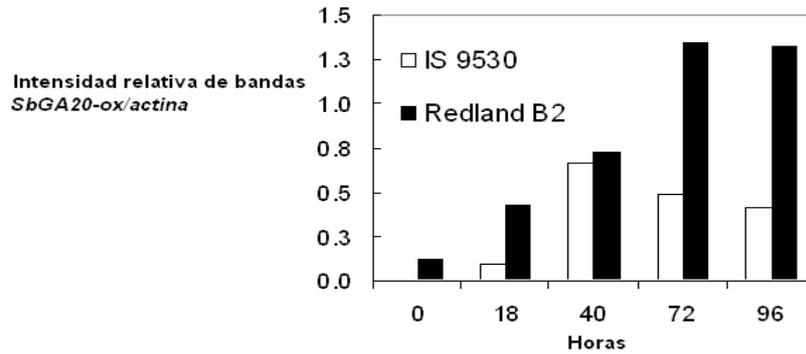


Figura 2. Análisis de Expresión del gen de la enzima GA 20-oxidasa en embriones aislados de cariopses de sorgo de 40 DAP de ambas líneas con susceptibilidad contrastante al BPC (Pérez-Flores y col., 2003).

Se ha observado que la manifestación del BPC depende tanto de factores genéticos como de las condiciones ambientales del cultivo (Benech-Arnold y col., 1995b).

Un estudio reciente en embriones de sorgo de las líneas con un comportamiento contrastante al brotado precosecha ha demostrado que la sensibilidad al ABA en la línea susceptible al BPC (Redland B2) se debe a una funcionalidad diferente en la vía de transducción en respuesta al ABA. Con respecto a esto, Gualano y colaboradores (comunicación personal) demostraron que en embriones de ambas líneas la expresión del gen *rab 17* (un gen que responde a ABA) no responde a cambios en los niveles de ABA en embriones de la línea Redland B2 (no responde a la hormona). Sin embargo para la línea IS 9530 se presenta una disminución en la expresión, es decir, es susceptible a la hormona, y esto puede estar implicado en la latencia de las semillas de esta línea impidiendo que germinen.

2.7.1. Ácido abscísico.

En algunos cereales como el maíz se ha reportado que la latencia de las semillas está controlada principalmente por los niveles y/o sensibilidad al ABA (Jones y col., 1997).

El ABA es un sesquiterpenoide de 15 átomos de carbono, sintetizado en forma parcial en cloroplastos y otros plastidios por la ruta del ácido mevalónico. Esta fitohormona participa en varios procesos dentro de la planta, tales como la respuesta a distintos tipos de estrés (hídrico, salino, térmico, etc.), la inhibición del crecimiento, la inducción de la embriogénesis de las semillas, la inducción de la latencia, la inhibición de la germinación prematura, etc. La acumulación de ABA endógeno en semillas en desarrollo es baja durante las etapas tempranas de la ontogenia, aumenta a la mitad del desarrollo (cuando las reservas de alimento son sintetizadas y el peso seco se incrementa) y disminuye cuando la semilla madura, cuando el contenido de agua decrece. El ABA induce la síntesis de proteínas de almacenamiento en las semillas e inhibe la síntesis de proteínas relacionadas con la movilización de reservas (evento postgerminativo) (Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 1998; Zeiger y Taiz 1998).

El papel que tiene el ABA en la latencia aún no está totalmente claro. En estudios previos se ha reportado que una alta concentración de esta hormona no necesariamente induce la latencia; es decir que el ABA no es necesario para mantener la latencia secundaria, y cuando los niveles de ABA disminuyen no necesariamente se rompe la latencia. Lo anterior indica que los efectos del ABA pueden estar influidos tanto por los niveles de la hormona como por la temperatura de incubación y/o por la variación en la sensibilidad del tejido embrionario al ABA en las distintas etapas del desarrollo (Walker-Simmons, 1987; Welbaum y col., 1990).

Existen evidencias que sugieren que el ABA controla la germinación de las semillas en desarrollo. Respecto a esto, se han realizado estudios con semillas que presentan viviparidad, la cual se caracteriza por la germinación del embrión en la planta parental, e indican que el ABA controla la germinación ya que inhibe la expresión de genes que promueven este proceso (Kermode, 1990).

La causa de la viviparidad puede ser debida a la ausencia del ABA o a la insensibilidad a la hormona durante el desarrollo de la semilla, lo que conlleva a la germinación precoz de las semillas. Se han caracterizado varias mutantes vivíparas en maíz que son deficientes en ABA (*vp5*, *vp2*, *vp7*, *vp9*). Por otro

lado, en *Arabidopsis* se han aislado mutantes tanto deficientes como insensibles al ABA (*abi1*, *abi3*) (Xu y col., 1995; Bewley, 1997).

Uno de los mutantes vivíparos mejor caracterizados en maíz es el mutante *vp1* que presenta una sensibilidad reducida al ABA y un fenotipo de germinación precoz. Estudios realizados con estos mutantes han demostrado que el gen *vp1* codifica para la proteína VP1, un factor de transcripción que junto con el ABA participa en la regulación de la expresión de distintos genes. VP1 y ABA inducen la expresión de genes que están involucrados en la maduración de la semilla, uno de los cuales es el gen *Em*, y por otro lado, inhiben la expresión de genes de germinación o postgerminativos (por ejemplo el gen de la α -amilasa) (White y Rivi, 2000).

2.7.2. Giberelinas.

Las hormonas que promueven la germinación e inducen la movilización de las reservas de las semillas son las GA's. Las GA's son una familia de hormonas vegetales que participan durante todo el ciclo de vida de la planta controlando múltiples procesos de crecimiento y desarrollo, como la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo y la floración, entre otros. Las giberelinas están presentes en muchos tejidos vegetativos y florales en concentraciones bajas (0.1–100 ng g⁻¹ de peso fresco) y sus enzimas biosintéticas también se encuentran en bajas concentraciones (Hedden y Phillips, 2000).

El término “giberelina” fue usado por primera vez en 1935 en Japón para describir una sustancia producida por el hongo *Gibberella fujikuroi* que causaba un síntoma de sobrecrecimiento del arroz (enfermedad conocida como bakanae). Esta sustancia resultó ser una mezcla de GA's que contenía como factores activos GA₁ y GA₃. Se han identificado aproximadamente 100 GA's en plantas, aunque su actividad promotora del crecimiento no se ha demostrado en todos los casos, por lo que se considera que muchas de las GA's identificadas son precursores biosintéticos de GA's activas o productos de su catabolismo (Lange, 1998).

Las giberelinas son ácidos diterpenoides y su vía de biosíntesis se puede dividir en tres etapas secuenciales, de acuerdo con la naturaleza de las enzimas involucradas y con los compartimentos subcelulares en que se localicen. El primer paso involucra la producción de *ent*-kaureno por la ciclación en dos pasos del difosfato de geranilgeranilo (GGDP), que se lleva a cabo por enzimas solubles (terpeno ciclasas) localizadas en plastidios. En la segunda etapa de la vía, el *ent*-kaureno es oxidado por Cit-P450 monooxigenasas asociadas con el retículo endoplásmico para formar GA₁₂-aldehído. Finalmente, la GA₁₂-aldehído es convertida a GA's bioactivas por dioxigenasas citosólicas dependientes de 2-oxoglutarato. Estas últimas enzimas incluyen a la GA 7-oxidasa, la GA 20-oxidasa, y la GA 2-oxidasa. La oxidación y eliminación del C-20 para producir las GA's de C-19, las hormonas biológicamente activas en plantas, es catalizada por la GA 20-oxidasa, y se piensa que éste es un sitio de regulación durante la producción de GA's. Existen evidencias de que la actividad de esta enzima está regulada por las concentraciones de GA's bioactivas en un control por retroalimentación negativa. Eventualmente, la GA 3β-hidroxilasa también participa en la activación de algunas GA's de 19 carbonos inactivas las cuales son posteriormente inactivadas por la 2β-hidroxilasa (Hedden y Croker, 1992; Lange y col., 1994; Phillips y col., 1995; Xu y col., 1995; Martin y col., 1996; Lange, 1998; Yamaguchi y Kamiya, 2000).

La GA 20-oxidasa es una enzima que limita la velocidad en la síntesis de las GA's activas, catalizando los últimos pasos de la biosíntesis en el citosol. Está codificada por una familia de multigenes. En *Arabidopsis* se han caracterizado tres genes que codifican esta enzima (*AtGA20oxi1*, *oxi2* y *oxi3*). Estas enzimas son reguladas por diversas señales, como la calidad de la luz, la duración del día y los niveles endógenos de las mismas GA's (Jones y col., 2000). La figura 3 muestra la vía de biosíntesis de las GA's y los compartimentos celulares involucrados, así como las enzimas regulatorias en la vía.

El papel de las giberelinas (GA's) en la promoción de la germinación de las semillas fue confirmado a partir de la identificación de mutantes de *Arabidopsis* y jitomate deficientes en GA's, cuyas semillas no germinan a menos que sean inducidas en un medio suplementado con GA's exógenas. A partir de estos

resultados, se han propuesto dos procesos a través de los cuales las GA's controlarían la germinación: 1) a través de la disminución de la resistencia mecánica de los tejidos que rodean al embrión y/o 2) a través de la promoción del crecimiento del embrión (Koornneff y Van der Veen, 1980; Groot y Karssen, 1987; Karssen y col., 1989).

En estudios hechos por Karssen y colaboradores (1989) y Nambara y colaboradores (1992) en donde utilizaron inhibidores de la biosíntesis de las GA's (paclobutrazol y tetciclasid, respectivamente) y por lo tanto impidieron la germinación, los resultados indican que es necesaria la síntesis *de novo* de GA's durante la imbibición. Posteriormente, se ha demostrado que los estímulos de la luz sobre la germinación están mediados por cambios en la síntesis de las GA's y en la sensibilidad a las mismas (Yang y col., 1995; Toyomasu y col., 1998).

Por otro lado, no está claro aún si las diferencias en los niveles de latencia de las semillas pueden deberse a una distinta capacidad de síntesis de GA's durante la imbibición. En estudios que sustentan la síntesis *de novo* de GA's como requerimiento para disparar la germinación, se sugiere que además de la existencia de otros eventuales impedimentos para la germinación, las semillas latentes no germinan debido a que la capacidad para sintetizar GA's *de novo* está bloqueada, en comparación con la producción normal de GA's que tendrían las semillas no latentes. Un hecho que sustenta esta propuesta es la observación realizada por Steinbach y col. (1997) de que en las semillas de sorgo latentes se puede inducir la germinación agregando GA's exógenas y que la inhibición de la síntesis de estas hormonas con paclobutrazol durante la ontogenia extiende considerablemente el tiempo de latencia en la línea Redland B2 (susceptible al BPC).

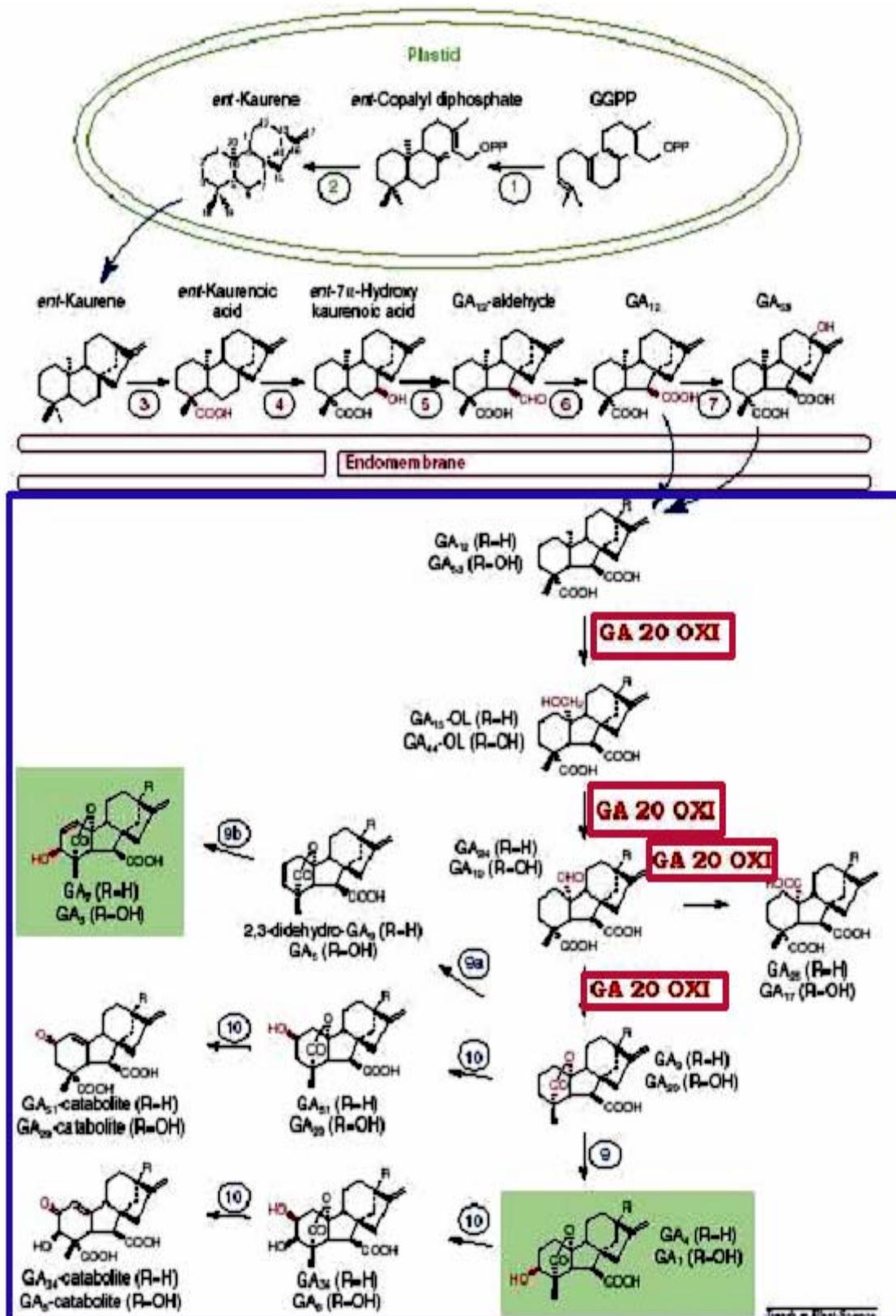


Figura 3. Ruta de la biosíntesis de geberelinas en la cual se muestran las reacciones en las que participa la enzima GA 20-oxidasa (Hedden y Phillips, 2000).

En trabajos previos de nuestro grupo se clonó un fragmento del gen de la enzima GA-20 oxidasa de sorgo y se encontraron evidencias de que la GA 20-oxidasa está involucrada en el control de la producción de GAs para la estimulación de los procesos relacionados con el control del brotado precosecha en sorgo. Al respecto, se observó que el gen de esta enzima se expresa en tiempos más cortos de imbibición en semillas susceptibles al BPC. También se observó que el gen de la enzima GA-20 oxidasa está regulado por el ABA, el cual suprime la expresión de la GA-20 oxidasa en embriones de ambas líneas, por lo menos hasta las 16 horas después de imbibición. Esto indica que los niveles de ABA endógenos pueden interferir directamente con la biosíntesis de las GA's y con la expresión de los genes que son inducidos por las giberelinas (Pérez-Flores y col., 2003).

2.8 SENSIBILIDAD DIFERENCIAL A LAS HORMONAS EN GRANOS DE SORGO CON DISTINTA SUSCEPTIBILIDAD AL BPC.

Se ha reportado que la salida anticipada de la latencia que presentan los genotipos de sorgo granífero susceptibles al BPC (línea Redland B₂) se relaciona con la baja sensibilidad al ABA que presentan sus embriones. Aunque se ha observado que la concentración endógena del ABA es similar en los embriones de ambas variedades, está bien establecido que los embriones de semillas de la línea resistente (IS 9530) son 10 veces más sensibles al ABA, en comparación con los embriones de la línea susceptible (Redland B₂) (Steinbach y col., 1997., Benech-Arnold y col., 2000).

Por otro lado, Visser y col. (1996) concluyeron que la diferente sensibilidad al ABA en embriones de cebada con distinta latencia era debida a una distinta tasa de degradación de esta hormona en las paredes externas del embrión. Debido a que existe un mecanismo similar (distinto grado de latencia) en embriones de sorgo granífero, ésta parece ser una explicación posible para la diferente sensibilidad al ABA encontrada entre líneas con distinto grado de latencia.

2.9 PARTICIPACIÓN DEL GEN *Sbvp1* EN LA RESISTENCIA AL BPC.

Con base en evidencias previas de que la latencia de semillas de maíz está controlada por *vp1*, se han aislado mutantes vivíparos con reducida sensibilidad al ABA, de los cuales, el más extensamente caracterizado es *viviparous-1* (*vp1*). Las plantas de maíz mutantes para este gen no tienen afectada la síntesis de ABA ni su metabolismo, pero muestran una marcada reducción en la sensibilidad a la acción inhibitoria de esta hormona sobre la germinación (Robichaud y col., 1987; Schwechhimer y Bevan, 1998).

El gen *vp1* de maíz fue clonado por mutagénesis de inserción con transposones (“transposon tagging”) y codifica para un activador de la transcripción. Durante el desarrollo embrionario, VP1 actúa como activador transcripcional de los genes *em* (McCarty y col., 1991) y *C1* (Hattori y col., 1992; Kao y col., 1996). El gen *Em* de trigo codifica para una proteína asociada a la maduración de las semillas que se expresa abundantemente durante el desarrollo de las mismas y constituye una de las proteínas marcadoras de este proceso (Williamson y Quatrano, 1988). En el promotor de este gen se han identificado varios sitios blanco para la proteína VP1 (como los elementos RY y Sph), conjuntamente con otros sitios que son blanco de factores de transcripción regulados por ABA, tales como los sitios EM1a y EM1b. Sin embargo, estudios *in vitro* han revelado que el dominio básico de la proteína VP1 posee escasa capacidad de unión al ADN. Estos resultados han llevado a proponer que VP1 potencia la expresión del gen *Em* a través de la unión de otros factores de transcripción regulados por ABA a los sitios EM1a y b (Vasil y col., 1995). Schultz y colaboradores (1998) identificaron, por medio de geles de retardo, en extractos nucleares de cultivos en suspensión de arroz embriogénico y de embriones de maíz, un complejo de proteínas de unión al ADN. Este grupo de trabajo caracterizó una proteína llamada GF14 la cual interactúa con el factor EmBP1 haciendo que se unan específicamente al sitio EM1a y que, junto con VP1, active la transcripción del gen *em*.

Todos los mutantes descritos en maíz para el gen *vp1* se caracterizan, además de tener insensibilidad al ABA, por la disminución en la expresión del gen *C1*.

Dado que este gen está involucrado en la regulación de la síntesis de antocianinas, los granos de dichas mutantes tienen disminuidas las cantidades de pigmentos y son “albinos”. Sin embargo, se han descrito también algunos mutantes *vp1* de maíz que no expresan el gen *C1*, pero no tienen alterada la sensibilidad al ABA, lo cual sugiere que los mecanismos por los cuales VP1 regula la síntesis de pigmentos son distintos de aquellos que median la sensibilidad a esta hormona (Koornneef y col., 1984; Vasil y col., 1995).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 3 loci distintos asociados con la sensibilidad al ABA (*abi1*, *abi2* y *abi3*) (Rohde y col., 1999). Se ha reportado que cuando estos 3 loci se encuentran mutados simultáneamente, las plantas resultan 10 veces menos sensibles a la inhibición de la germinación por ABA que las plantas silvestres. El gen *abi3* fue aislado mediante clonado posicional (Giraudat y col., 1992), mostrando una similitud del 87% con la secuencia de la proteína codificada por el gen *vp1* de maíz. Los dos genes presentan esencialmente la misma organización estructural, constituida por seis exones y una distribución casi idéntica de los intrones. Las regiones de las proteínas codificadas por los exones 2 a 5 comparten una identidad en la secuencia del 95%. En contraste, el primer exón está poco conservado, con solo 25% de identidad. Se han clonado y secuenciado homólogos del gen *Vp1* en distintas especies como arroz (Hattori y col., 1994), tabaco (Phillips y Conrad, 1994), cebada (Hollung y col., 1997), frijol (Bobb y col., 1995) y avena (Jones y col., 1997), mostrando altos niveles de conservación entre sus secuencias y con las de *Arabidopsis* y maíz. Además, las similitudes fenotípicas entre las mutantes *abi3* de *Arabidopsis* y *vp1* de maíz llevaron a proponer que estos genes son funcionalmente homólogos (Nambara y col., 1992).

En estudios hechos con embriones maduros imbibidos procedentes de seis líneas de avena con distinto grado de latencia se encontró que está determinada en primer lugar por el genotipo y en segundo lugar por la historia ambiental previa de las semillas maduras, que actúa sobre el genotipo del embrión. En todas las condiciones estudiadas la expresión del gen homólogo a *Vp1* mostró una correlación positiva con el grado de latencia (Jones y col., 1997). Por otro lado, se ha caracterizado un homólogo de *vp1* en semillas de

trigo (*Tavp1*). A este respecto, estudios hechos en dos cultivares de trigo con distinto grado de latencia (Minamino, muy latente, y Tozan 18, no latente) han demostrado que el nivel de latencia está regulado más por la sensibilidad al ABA que por la concentración endógena de esta hormona que las semillas del cultivar no latente a las que se les añadió ABA exógeno presentaron un porcentaje de germinación del 100% mientras que las semillas latentes no germinan. Además, se presentó un patrón de expresión diferencial en ambos cultivares, siendo mayor la expresión del gen (*Tavp1*) en semillas que presentan mayor grado de latencia que en semillas que no tienen una latencia tan marcada. Estos resultados indican que hay una correlación positiva entre los niveles de latencia de la semilla, el nivel de la sensibilidad al ABA y los niveles de transcrito de *Tavp1* en embriones maduros de trigo (Nakamura y Toyama, 2001).

En contraste con las funciones de activación de los genes previamente mencionadas, VP1 reprime, durante el desarrollo, la expresión de genes como el de α -amilasa (hidrolasas de células de aleurona) que son específicos de etapas postgerminativas. Esta represión ocurre aún cuando los dominios de activación hayan sido mutados, y de hecho se ha demostrado que el dominio de represión de la proteína VP1 es distinto al de activación (Hoecker y col., 1995; y 1999).

En sorgo, los genotipos susceptibles al BPC muestran igual comportamiento frente a la acción inhibitoria del ABA que los mutantes *abi3*. En un trabajo reciente sobre las bases genéticas del BPC en sorgo, se demostró que el BPC presenta variación continua en poblaciones segregantes y se encontraron dos QTLs no ligados entre sí, que en forma conjunta explican más del 80% de la varianza fenotípica observada. Uno de estos QTLs está ligado al marcador RFLP UMC3 que en maíz está ligado al gen *vp1*. Estos resultados apoyan la posible participación del homólogo de *vp1* de sorgo en la resistencia al BPC. (Lijavetzky y col., 2000).

Recientemente, nuestro grupo clonó el homólogo del gen *vp1* en sorgo y obtuvo una sonda específica para este gen (*Sbvp1*). Análisis genéticos usando

QTLs del factor de transcripción *vp1* han demostrado que *Sbvp1* está involucrado en la determinación de los niveles de latencia en las dos variedades (IS9530 y Redland B2). Estudios hechos para medir la expresión del gen *Sbvp1* durante la ontogenia de las semillas de sorgo de ambas líneas indican que el tiempo de expresión es diferente para ambos genotipos, ya que en la variedad susceptible aparecen altos niveles del transcrito durante la embriogenesis, en comparación con la variedad resistente. La figura 4 muestra el comportamiento de la expresión *Sbvp1* en semillas de las líneas IS9530 y Redland B2 a partir de los 10 DPA.

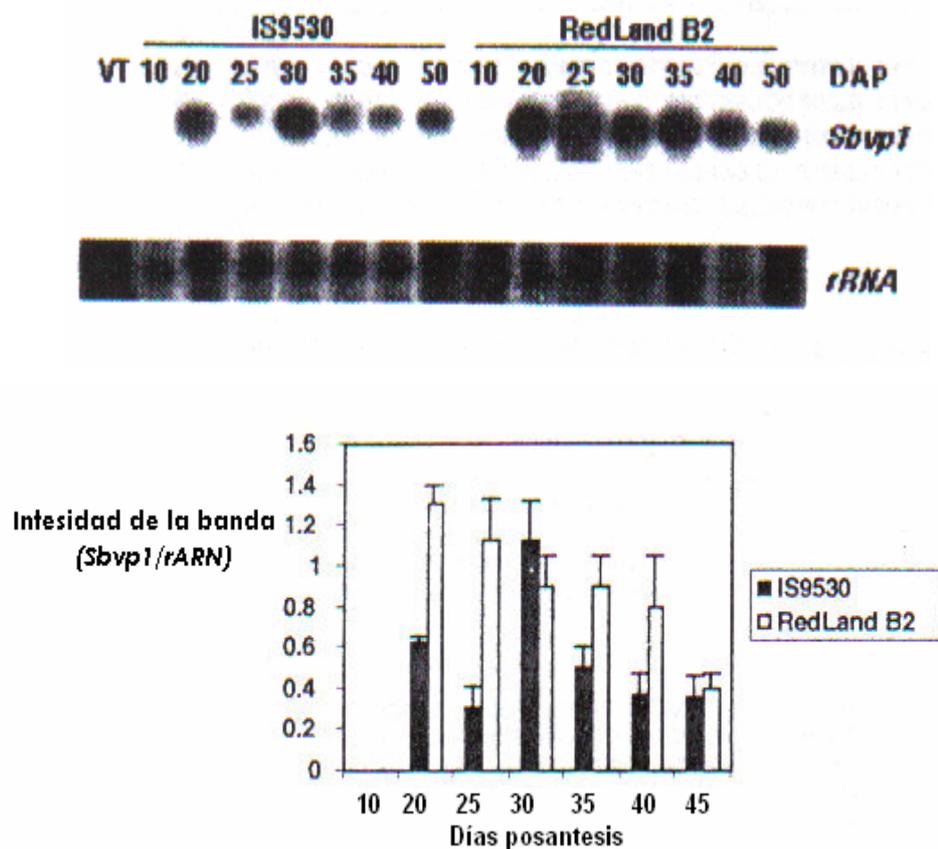


Figura 4. Análisis de expresión del gen *Sbvp1* durante la ontogenia de las semillas de las líneas IS9530 y Redland B2 (Carrari y col., 2001b)

Por otro lado, se encontró que durante la imbibición de cariósides maduros (40 DPA), la expresión de este gen muestra un patrón diferencial, con mayores

niveles del ARNm de *Sbvp1*, que se mantiene durante la imbibición de semillas de la línea resistente (IS9530), mientras que en cariósides de la línea susceptible (Redland B2) disminuye la expresión a partir de los dos días de imbibición. Este patrón de expresión diferencial se correlaciona con el grado de latencia de ambos genotipos (Benech-Arnold y col., 2000., Carrari y col., 2001b).

En la figura 5 se muestra la expresión del gen *Sbvp1* durante la imbibición de semillas de sorgo de ambas líneas.

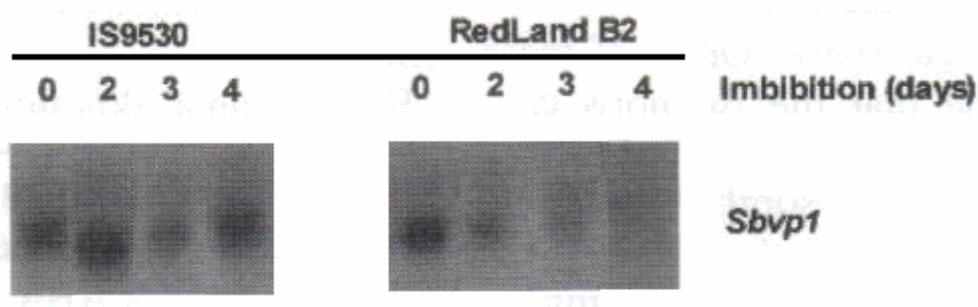


Figura 5. Expresión del gen *Vp1* durante la imbibición de semillas de sorgo con distinta susceptibilidad al BPC cosechadas y almacenadas en Argentina (Carrari y col., 2001b)

La caracterización del promotor del gen que codifica el factor de transcripción *Sbvp1* demostró que carece de la caja TATA y contiene elementos de respuesta a señales endógenas y ambientales. Por otro lado, se identificaron elementos transponibles cortos conocidos como MITEs, que se piensan que funcionan como regiones regulatorias en el inicio de la transcripción (Carrari y col., 2001a).

2.10 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL BPC

Se ha observado que las condiciones ambientales en que se cultivan las semillas, así como el tiempo de almacenamiento de las mismas, son factores que influyen en la expresión del brotado precosecha. En particular, se observó

que las semillas de ambas líneas cultivadas en la ciudad de México (Ciudad Universitaria, UNAM y UAM en el año 2003) no presentaron brotado precosecha debido posiblemente a las diferentes condiciones climáticas entre Buenos Aires, Argentina y la Ciudad de México (mayor temperatura y humedad ambiental en Argentina, diferencias en altitud, latitud, incidencia luminosa, etc.). Se encontró que las semillas cultivadas en Argentina y almacenadas durante tres años en México (refrigeración a 7° C en desecación), las semillas de la línea IS9530, originalmente resistentes al BPC y una germinación más lenta, después del almacenamiento invirtieron su velocidad de germinación, siendo inclusive más rápido que las de Redland B2. Esta última línea se vió afectada por los diferentes tiempos de almacenamiento y por las condiciones en las cuales se desarrollaron los granos en México (Avendaño-Gómez, 2005). Como se mencionó anteriormente, Jones y colaboradores reportaron en 1997 que durante el almacenamiento las semillas de avena presentaban una pérdida de la latencia, como ocurrió en IS9530, además de mostrar una disminución en la expresión de *Vp1* proponiendo que existe una correlación entre los niveles de expresión del gen *Vp1* con el nivel de latencia. Estos antecedentes sugieren que la ausencia de BPC observada en las semillas de ambas líneas cultivadas en México, podría deberse a cambios en la latencia debidas a alteraciones en el balance ABA/GA's. Si en las semillas de ambas líneas con susceptibilidad contrastante al BPC (cultivadas en Argentina) se han reportado diferencias en la expresión de los genes *Sbvp1* y *GA 20-oxidasa* que correlacionan con el nivel de latencia y la susceptibilidad contrastante al BPC se esperaría que en las semillas de estas líneas que no presentan BPC (cultivadas en México), se observen cambios en la expresión de dichos genes que expliquen los cambios observados en la germinación.

Por lo que en el presente trabajo se utilizó como modelo al sorgo granífero (de las líneas IS9530 y Redland B2) cultivadas en México para profundizar en el conocimiento de las bases moleculares tanto del brotado precosecha, como de la latencia. En particular, se propuso caracterizar los promotores del gen de la GA 20-oxidasa en ambas líneas, así como determinar la expresión de los genes *GA 20-oxidasa* y *vp1* en semillas que no presentan BPC.

3. JUSTIFICACIÓN.

El BPC es un problema muy común en cereales como el trigo, el maíz, el sorgo y la cebada. Se presenta sobre todo cuando el periodo de cosecha coincide con las condiciones de humedad ambiental muy elevada, causando grandes pérdidas económicas y agrícolas. Por lo tanto, resulta de gran relevancia profundizar en el conocimiento de las bases moleculares y fisiológicas del BPC, para lograr un mejor manejo del cultivo.

Estudios previos indican que el grado de latencia y por lo tanto la susceptibilidad al BPC en sorgo, depende del balance entre la acción de las hormonas vegetales ABA y GA's. Se considera que el balance hormonal está determinado por las concentraciones endógenas de estas hormonas y/o por la sensibilidad de los tejidos a estos compuestos. Las variaciones en las concentraciones endógenas de estas hormonas pueden ser resultado de la expresión diferencial de alguno(s) de los genes que codifica(n) para alguna(s) enzima(s) regulatoria(s) de la ruta biosintética de estas hormonas, como podría ser el caso de la GA 20 oxidasa para las giberelinas, o que determinan la sensibilidad hormonal, como *Vp1* para ABA.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrán contribuir a profundizar en el conocimiento fisiológico y molecular de los mecanismos de control de la latencia en distintas especies.

OBJETIVO GENERAL.

Profundizar en el conocimiento de la participación de los genes *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa* en el brotado precosecha en semillas de sorgo de las líneas IS9530 y Redland B2 cultivadas en México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y secuenciar el promotor del gen *SbGA20-oxidasa* de semillas de sorgo de las líneas IS9530 y Redland B2 cultivadas en México.
2. Determinar los patrones de expresión del gen del factor de transcripción *Sbvp1* durante la imbibición en las dos líneas de sorgo que no presentan BPC.
3. Determinar los patrones de expresión del gen de la enzima *SbGA20-oxidasa* durante la imbibición en las dos líneas de sorgo que no presentan BPC

HIPÓTESIS.

Dado que en las líneas con susceptibilidad contrastante al BPC hay una correlación directa entre una mayor expresión de *Sbvp1* con una mayor latencia y sensibilidad al ABA en la línea resistente (IS9530), se esperaría que cuando no se manifiesta el BPC disminuya la expresión de *Sbvp1* en IS9530 o que aumente en Redland B2.

En las líneas de sorgo que presentan susceptibilidad contrastante al BPC hay una correlación directa entre una mayor expresión de *SbGA20-oxidasa* con una mayor velocidad de germinación en Redland B2, por lo que se esperaría que cuando no se manifiesta el BPC cambie la expresión de *SbGA20-oxidasa* aumentando en IS9530 y que se correlacione con una mayor germinación en esta línea o disminuyendo en Redland B2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 CULTIVO DE SEMILLAS DE SORGO

Se cultivaron en México las dos líneas de sorgo IS9530 y Redland B2 para determinar la susceptibilidad al BPC y la expresión de los genes *vp1* y *GA 20-oxidasa* en semillas que no expresan la susceptibilidad al brotado precosecha.

4.1.1 Cultivo de sorgo en condiciones de invernadero

Las semillas se cultivaron en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, con temperatura de entre 28°C-32°C y riego automático durante tres a cuatro días por semana en los meses de crecimiento de la planta, que van de marzo a septiembre. Las semillas se sembraron en bolsas con capacidad para 5 kg cada una, se colocaron en promedio cuatro semillas por bolsa y se sembraron 20 bolsas de cada línea.

Una vez crecidas las plantas se fertilizaron con urea (aproximadamente 4.30 g por planta) y micronutrientes (*Miracle-Gro*). Las plantas se mantuvieron libres de maleza. Cuando surgieron las panojas se contaron los días a partir del cual se inició la antesis (DPA), es decir, la apertura de las flores y exposición de los órganos para la polinización. Esta etapa se identifica cuando se observan pequeños filamentos amarillos en más de la mitad de la panoja. Las plantas se rotularon indicando el número de planta, la fecha de antesis y la línea de sorgo a la cual correspondían.

Se colectaron las semillas ya maduras (60 DPA aproximadamente) para la determinación de la expresión del gen *Sbvp1* y de *SbGA20-oxidasa* en ambas líneas.

4.1.2. Curva de germinación de semillas cultivadas en México

Se realizaron pruebas de germinación midiendo el porcentaje de germinación en las semillas cosechadas en México. Para realizar la medición se tomaron 100 semillas al azar de cada línea. Cada grupo de semillas se lavó con etanol al 70% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril (3 veces). Se colocaron en cajas de Petri estériles con papel filtro y 5 mililitros de agua desionizada en una estufa a 25 ± 2 °C. Se contaron las semillas germinadas desde 0 días hasta 12 días.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA ENZIMA GA 20-OXIDASA EN DOS LÍNEAS DE SORGO QUE NO EXPRESAN SUSCEPTIBILIDAD AL BPC.

4.2.1. Extracción de ADN de hojas de plantas de sorgo de ambas líneas.

Se seleccionaron hojas jóvenes de ambas líneas de sorgo, se desinfectaron superficialmente con etanol absoluto y se cortaron en fragmentos pequeños, se congelaron y se molieron con N₂ líquido. El polvo se colocó en un mortero estéril y se homogeneizó con 200 µL de buffer CTAB (bromuro de cetiltrimetilamina). Posteriormente, se agregaron 100 µL más de buffer CTAB y las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles, incubándose a 60°C en baño maría durante 30 minutos. Posterior a este tiempo, se agregaron 300 µL de cloroformo y se mezcló en un vortex. Se centrifugó a 3500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó la fase inferior, y la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo estéril y se le agregó el mismo volumen de isopropanol. El ADN se dejó precipitar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se obtuvo la pastilla de ADN, que se lavó con etanol frío al 70% (v/v). Se centrifugó a 3500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla se secó al aire y el ADN se resuspendió en 25 µL de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) para inactivar

las nucleasas presentes. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría, tomando 1 DO λ (densidad óptica) = 50 μ g de ADN total, a λ = 260nm.

4.2.2. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

Se colocaron en un tubo Eppendorf 10 μ g de ADN y se añadieron 10 μ L de buffer concentrado 10X (el buffer usado depende de la enzima de restricción y lo proporciona el proveedor). Se añadió 1 μ L de ARNasa a una concentración final de 100 μ g/mL y 10 unidades de cada una de las siguientes enzimas de restricción: *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII* (cada enzima tiene condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura de reacción, concentración de sales y condiciones de pH. Tanto la concentración de sales como el pH los proporciona el buffer de reacción). Se agregó agua con DEPC hasta completar un volumen de reacción de 100 μ L. Las muestras se incubaron a 37°C durante 3 horas.

Se verificó que las enzimas utilizadas no tuvieran sitio de reconocimiento de corte en la secuencia conocida del gen *GA 20-oxidasa*. Los sitios de corte de cada enzima son los siguientes:

EcoRI: 3' **G** / **AATTC** 5'

BamHI: 3' **G** / **GATCC** 5'

HindIII: 3' **A** / **AGCTT** 5'

4.2.3. Inactivación de las endonucleasas y purificación del ADN.

La inactivación de las enzimas y la purificación del ADN se llevó a cabo de dos formas, por 1) fenolización y una mezcla de acetato sódico y etanol frío, y 2) con el Kit de purificación DNA UltraClean™ de Promega.

Para el método de fenolización, a 90 μ L de muestra (ADN digerido) se le agregaron 110 μ L de agua para obtener un volumen final de 200 μ L, se adicionaron 200 μ L de fenol neutro (1 volumen), se agitó y se centrifugó a 19

250 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo estéril, y se adicionaron 100 µL de fenol neutro y 100 µL de CIA (cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 24:1), se centrifugó a 19 250 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente (este paso se llevo a cabo dos veces). Se tomó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de CIA (1 volumen), se centrifugó a 19 250 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se adicionaron 20 µL de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 200 µL de etanol frío. El ADN se precipitó a -20°C al menos durante 4 horas. Se centrifugó a 19 250 x g durante 5 minutos, a 4°C. La pastilla se lavó con etanol frío y se centrifugó a 19 250 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en agua libre de ADNAsas.

En el caso de la purificación con el kit, ésta consiste en que el ADN interacciona con una resina (Ultra Bind) con cargas y posteriormente se lava con una solución con etanol (Ultra Wash) hasta obtener el ADN limpio de resina y moléculas contaminantes. Finalmente se resuspende en agua libre de ADNAsas.

4.2.4. Recircularización del ADN y PCR inversa

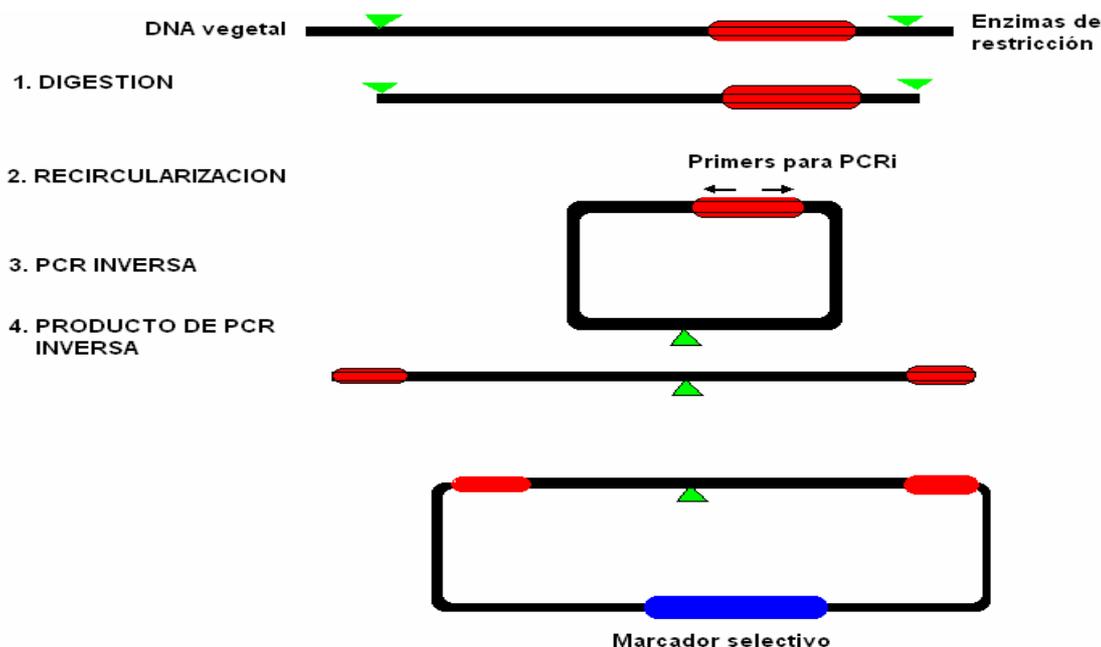
Las muestras se calentaron a 65°C durante 15 segundos, para relajar los extremos de los fragmentos de ADN presentes en las muestras. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo, se añadieron 5 µL de buffer de reacción 5X para la ADN ligasa y se añadieron 10 unidades (2 µL) de ADN ligasa del fago T4. La mezcla de reacción se llevo a un volumen final de 500 µL. Posteriormente, se incubaron a 14°C durante 12 horas. El ADN se purificó con el kit UltraClean® de Promega.

Como control de ligación se puso un plásmido digerido, en las mismas condiciones de ligación que las muestras. El plásmido usado fue el pC43 con un tamaño de 4.9 kpb. Se realizó un análisis electroforético en agarosa al 0.7% p/v en buffer TAE 1X para comprobar la recircularización del plásmido digerido.

4.2.5. Amplificación de los productos por PCR inversa

La reacción en cadena de la polimerasa frecuentemente se usa para amplificar un segmento de ADN que se encuentra entre dos cebadores u oligonucleotidos (secuencia conocida). Este procedimiento se puede usar para amplificar secuencias que se encuentran fuera de la región conocida (en este caso el fragmento del gen *SbGA20-oxidasa*). A este método se le conoce como PCR inversa, ya que permite la rápida amplificación de un segmento no caracterizado del ADN que flanquea inmediatamente la secuencia conocida.

La técnica de PCR inversa consiste en que a partir de una secuencia de ADN recircularizada y el uso de oligonucleotidos complementarios al extremo 5' del fragmento blanco se obtiene, en el producto final de la reacción de amplificación, una molécula de ADN de doble cadena que consiste de un arreglo “**head-to-tail**” (cabeza a cola) de la secuencia flanqueada del ADN blanco original. La unión entre las secuencias “corriente arriba” y “corriente abajo” está marcada por la presencia de un sitio de restricción para la enzima original usada para digerir el ADN (figura 6).



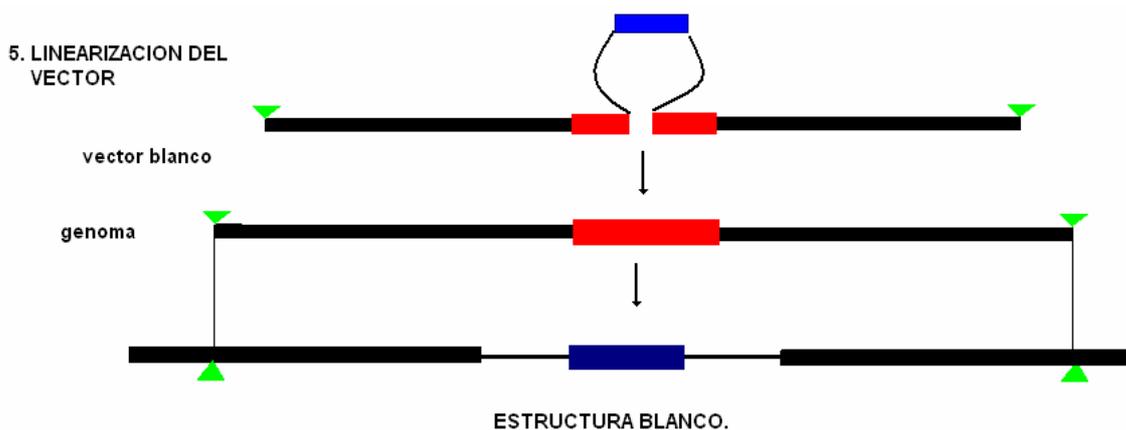


Figura 6. Diagrama representativo de amplificación de la región 5' de un gen por medio de PCR inversa.

Para la amplificación de los fragmentos ligados se diseñaron un par de oligonucleotidos que amplifican una región del gen *GA 20-oxidasa*. A los oligos inversos, denominados **GA388i** y **GA816i** se les adicionó una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción (*Pst*I y *Xba*I) en cada extremo para facilitar la posterior inserción al plásmido. Estos cortes no coinciden con los que se habían hecho previamente al ADN total, y antes de su eyección se comprobó que no estuvieran presentes en el fragmento conocido del gen *GA20-oxidasa*. Con base en las observaciones anteriores, las secuencias adicionales de las enzimas de restricción que se seleccionaron para los extremos de los oligos fueron:

*Pst*I **5' CTGCA / G 3'**
 3' G / ACGTC 5'

*Xba*I **5' T / CTAGA 3'**
 3' AGATC / T 5'

Los oligos utilizados en la amplificación de los fragmentos fueron:

GA 388i 5' ATA CTG CAG TCCACG GCA GCT TGG ACG CGA AGG 3'

GA 816i 5' ACG TCT AGA CGG CGA CAC CTT CAT GGC GCT CTC 3'

Las reacciones de amplificación por PCR inversa para fragmentos largos se realizaron a partir del ADN digerido y recircularizado. La mezcla de reacción contuvo 5 µL de buffer 10X, 5 µL de mezcla de dNTP's 20 mM, 1 µL de oligo en sentido 5' – 3' a una concentración 20 µM, 1 µL de oligo en sentido 3' – 5' en concentración 20 µM, 0.2 µL de ADN polimerasa termoestable (elongasa®, Invitrogen), 3 µg de ADN molde y se llevo a un volumen final de 50 µL con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 44-75°C durante 1 minuto y 72°C durante 5 minutos y, finalmente 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó el análisis electroforético en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X.

4.3 SELECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA LA EXPRESIÓN DE GENES *Sbvp1* Y *SbGA20-oxidasa*.

Se utilizó un lote de 50 semillas de sorgo de cada línea (IS 9530 y Redland B2) con las siguientes características: semillas de más de 60 DAP (maduras), color homogéneo y sin daños físicos aparentes. Las semillas seleccionadas se desinfestaron superficialmente con una solución de etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos. Posteriormente, se enjuagaron 3 veces con agua desionizada estéril.

4.3.1. Imbibición de semillas de sorgo de ambas líneas

Las semillas desinfestadas se imbibieron en cajas de Petri con papel de filtro estéril y humedecido con agua desionizada estéril en las siguientes condiciones.

	Tiempo de imbibición (días)				Temperatura
IS9530	0	2	3	4	25°C

Redland B2	0	2	3	4	25°C
------------	---	---	---	---	------

Posteriormente a la imbibición de las semillas, se disectaron los embriones de ambas líneas para la extracción del ARN total

4.3.2. Extracción de ARN total

Las extracciones de ARN se realizaron con el reactivo Trizol® (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con las siguientes modificaciones. El tejido se molió con N₂ líquido y se homogeneizó con 1 mL/100 mg de tejido con la solución de Trizol® y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C, se realizaron 2 extracciones con cloroformo y se dejó precipitar el ARN durante 10 minutos a temperatura ambiente con 250 µL de isopropanol y 250 µL de la mezcla citrato de Na 0.8 M y NaCl 1.2 M. Se lavó la pastilla con etanol al 75% (v/v) y se resuspendió en 0.10 mL de agua estéril tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría, tomando 1 DO = 40 µg de ARN total a $\lambda = 260$ nm.

4.3.3. Integridad del ARN por análisis electroforético en condiciones desnaturizantes

La integridad del ARN se comprobó evaluando la integridad del ARN ribosomal, tanto en condiciones desnaturizantes como en condiciones no desnaturizantes. Para evaluar la integridad del ARN en condiciones desnaturizantes se corrió un gel de agarosa-formaldehído en buffer MOPS y teñido con EtBr (bromuro de etidio) a una concentración de 5 µg/mL. Para preparar el gel se mezclaron 1 g de agarosa, 5 mL de buffer MOPS 10 X, 18 mL de formaldehído y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua desionizada estéril. En cada pozo del gel se colocó la mezcla con 10 µg de ARN, 2 µL de buffer MOPS 10 X, 3.5 µL de formaldehído al 37% (v/v), 10 µL de formamida, en un volumen final de 20 µL. La mezcla con la muestra fue previamente calentada a 65°C durante 10 minutos e inmediatamente enfriada

en hielo durante 3-5 minutos antes de cargar en el pozo. El gel se corrió a 96 Voltios durante 45 minutos, aproximadamente. Finalmente, el gel se tiñó y la imagen se capturó usando el analizador de imágenes Gel Doc Biorad v 3.1.

Por otro lado, para el análisis de la integridad del ARN en condiciones no desnaturalizantes se corrió otra muestra en un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X. Para esto, 3 µg de cada una de las muestras se mezclaron con 5 µL de glicerol/agua (proporción 2:1) y se colocaron en los pozos. El gel se corrió a 95 Voltios durante 30 minutos. Posteriormente, se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 5 µg/mL y la imagen se capturó usando el analizador de imágenes Gel Doc Biorad v 3.1.

4.3.4. Amplificación por RT-PCR de los genes *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa* de semillas de sorgo

Para la amplificación del gen *vp1* (*Sbvp1*) de sorgo se utilizaron un par de oligonucleótidos reportados por Carrari y col. (2001), los cuales están basados en la secuencia nucleotídica del gen *Sbvp1* de maíz contenida en GenBank (Número de acceso M60214). El par de oligos, denominados Exvp1, corresponden a los primeros 33 y 1435 nucleótidos y flanquean el primer exón del gen. Las secuencias de dichos oligonucleótidos son las siguientes:

Exvp1 U1 5': 5' CACCGTCTCTCTCCTCCCTTTGTC 3'

Exvp1 L1 3': 5' GGA CTTGGAGAGCGGGTTCTGGAC 3'

Para la amplificación del gen *GA 20-oxidasa* se utilizaron oligonucleotidos diseñados con el programa **Primer3 Output** con base en la secuencia conocida del gen. Los oligonucleotidos utilizados fueron:

GA20-OXUPG1: 5' GGG TAG TAG TTG AGG CGC AT 3'

GA20-OLOWG1: 5' CTC TCC AAC GGA CGC TAC AG 3'

Las reacciones de amplificación por PCR para ambos genes se realizaron a partir del ADNc obtenido de ARN total (14 µg) de embriones maduros (60 DPA)

mediante una reacción previa con la transcriptasa reversa (RT). Las reacciones de RT se realizaron utilizando 300 UI de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, WI, USA) en un volumen total de reacción de 20 µL conteniendo en el buffer de reacción 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 U RNAsin (Promega, WI, USA), 10 µM dNTPs y 3.3 mM oligodT (15) (Promega WI, USA) a 35°C, durante 1 hora. La mezcla de reacción fue detenida por inactivación con calor a 95°C durante 5 minutos.

La amplificación por PCR para el gen *Sbvp1* se realizó utilizando 1 UI de Taq ADN polimerasa (PCR core Kit®, Roche Lab. USA) en 50 µL de 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs y 0.25 µM de cada oligonucleotido. Las condiciones fueron las siguientes: 5 minutos de desnaturalización a 95°C, luego 35 ciclos que consistieron en 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineamiento de los oligos a 60°C y 1.5 minutos de alargamiento a 72°C. El último ciclo de alargamiento fue de 10 minutos a 72 °C. Para la amplificación del gen *GA20-oxidasa* las condiciones fueron 1 UI de Taq ADN polimerasa (PCR core Kit®, Roche Lab. USA) en 50 µL de 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs y 0.25 µM de cada oligonucleotido con 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, 30 ciclos que consistieron en 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C. El último ciclo de alargamiento fue de 10 minutos a 72 °C.

Los productos amplificados por PCR de ambos genes se separaron en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X y se visualizaron tras tinción con bromuro de etidio y exposición luz ultravioleta, para determinar el patrón de expresión.

Como sonda de normalización para determinar la expresión de ambos genes en las dos líneas de sorgo se uso la expresión del gen de actina. Para su amplificación, se usaron dos oligonucleotidos cuya secuencia esta basada en el gen de jitomate y fueron:

ACTUP: 5' TGG CAT CAT ACC TTT TAC AC 3'

ACTLOW: 5' TCC GGG CAT CTG AAC CTC TC 3'

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En el presente trabajo se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se utilizó el programa estadístico NCSS para realizar el análisis de varianza (ANOVA). Para determinar las diferencias entre los tratamientos se realizó la prueba estadística de Dunnett (comparación de las medias de tratamientos, semillas imbibidas, contra la media del testigo, semillas secas) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS CULTIVADAS EN MÉXICO.

En estudios previos, Benech-Arnold y colaboradores (1995a) reportaron que las semillas de las dos líneas de sorgo cultivadas en Argentina presentaban susceptibilidad contrastante al brotado precosecha durante la ontogenia. La línea susceptible Redland B2 germina a partir de los 30 DPA, mientras que la línea resistente IS9530 germina a partir de los 55 ó 60 DPA. Por otro lado, se observó que las semillas maduras presentaban diferencias en el índice de germinación, siendo mayor para la línea Redland B2 que para la línea IS9530.

En el presente trabajo se estudió el comportamiento de semillas de las dos líneas antes mencionadas, tras ser cultivadas en México. Se observó que no presentaron BPC durante la ontogenia. En la figura 7 se presenta el porcentaje de germinación de semillas maduras de ambas líneas procedentes de plantas cultivadas en México. Se observa que la línea IS9530 tiene una velocidad de germinación mayor que la línea Redland B2 en los primeros días de imbibición, alcanzando un porcentaje final de germinación significativamente mayor al 95%, en comparación con el 80% obtenido para la línea Redland B2.

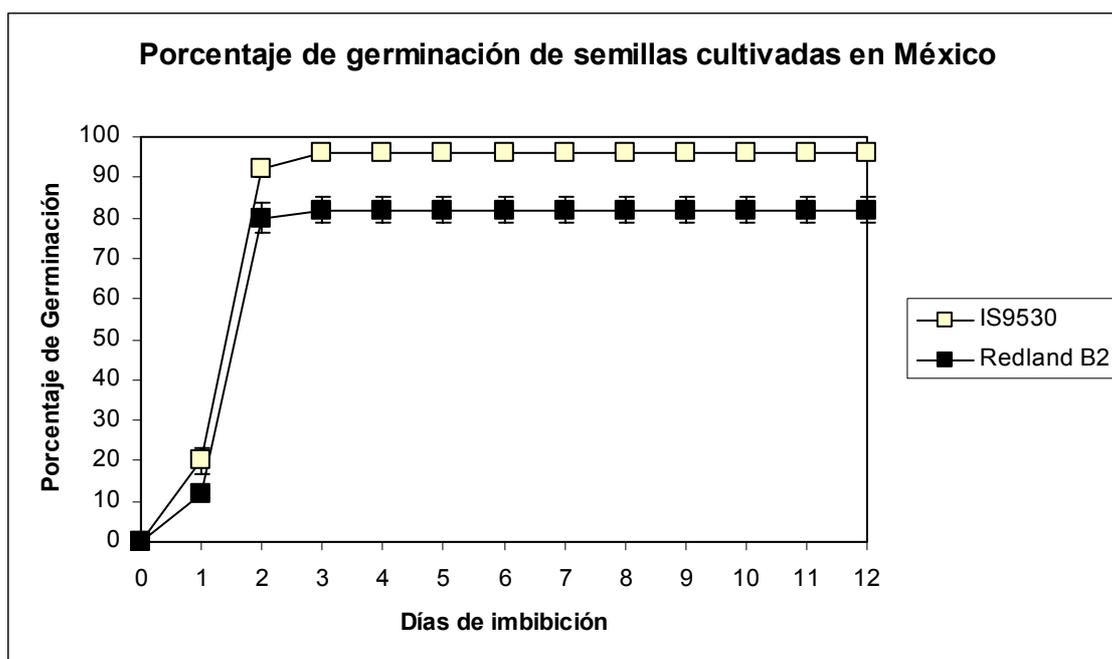


Figura 7. Porcentaje de germinación de semillas maduras (60 DPA) procedentes de plantas de las líneas IS9530 y Redland B2, cultivadas en México.

Estos concuerda con resultados obtenidos respecto al índice de germinación de semillas de las plantas cultivadas en México, ya en trabajos previos de nuestro grupo se había encontrado que la línea IS9530 presentó un índice de germinación superior al de Redland B2 (Avendaño-Gómez, 2005).

Estos resultados son opuestos a los reportados para las semillas procedentes de plantas cultivadas en Argentina, en los que la línea Redland B2 susceptible al BPC presenta un porcentaje de germinación y un índice de germinación superior al de IS9530 (Benech-Arnold y col., 1995b; Steinbach y col., 1997).

5.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN GA20-OXIDASA EN SEMILLAS DE SORGO DE LAS LÍNEAS IS9530 Y REDLAND B2.

5.2.1. Extracción y digestión de ADN de hojas.

Para la caracterización del promotor del gen de la enzima GA20-oxidasa se extrajo el ADN de hojas jóvenes, el cual se trató con las enzimas de restricción mencionadas en el apartado de materiales y métodos. Posteriormente, para verificar la digestión del ADN por las enzimas, se realizó un análisis electroforético de las muestras de ambas líneas de sorgo. La figura 8 presenta el barrido característico generado por la digestión de las endonucleasas en las muestras de ADN. En todos los casos, tanto para la línea IS9530 como para la línea Redland B2, las enzimas utilizadas generaron barridos de bandas.

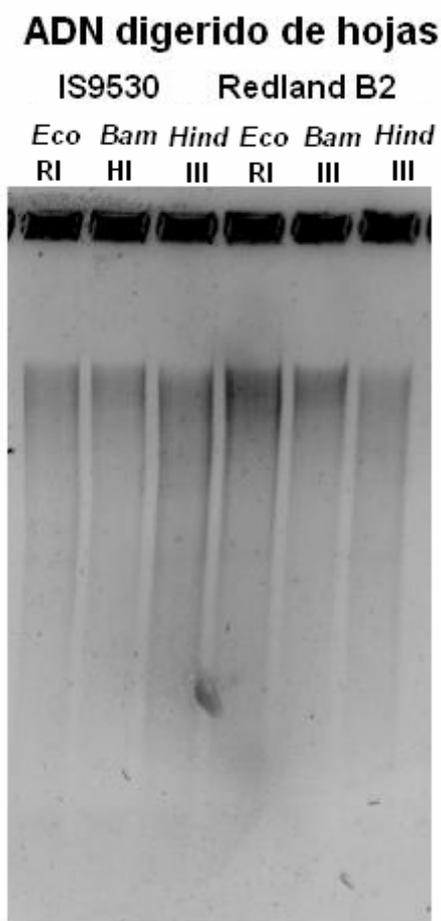


Figura 8. Análisis electroforético del ADN genómico de hojas de plantas de sorgo de la línea 1S9530 y Redland B2 cultivadas en México.

Como control de la digestión se realizó un análisis electroforético con muestras de ADN de ambas líneas sin digerir, la figura 9 muestra el ADN genómico de ambas líneas de sorgo, en donde se observa que la mayoría del ADN extraído de las hojas de plantas se concentra en la parte superior, con lo que se puede concluir que el ADN no se encontraba degradado y el barrido observado en la figura 6 se debe a los cortes realizados por las enzimas de restricción y no a que las muestras se encuentran degradadas o contaminadas.

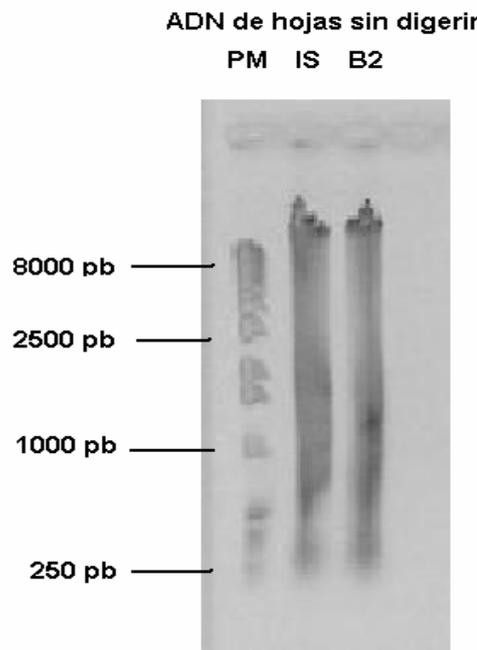


Figura 9. Control positivo del ADN genómico de hojas de sorgo de plantas de ambas líneas cultivadas en México.

5.2.2. Recircularización y purificación del ADN.

La recircularización de las muestras se llevó a cabo en volúmenes grandes para evitar que se ligan más de una molécula entre si (se busco favorecer la ligación intramolecular sobre la intermolecular) con objeto de poder amplificar la región de interés.

La figura 10 muestra el análisis electroforético de las muestras recircularizadas y purificadas, se observa que en todos los casos, tanto para la línea Redland B2, como para la línea IS9530 se obtuvo un barrido, solo que con menor intensidad en comparación con el análisis electroforético de las muestras sin recircularizar. Ésto podría deberse a una pérdida de muestras durante la ligación y purificación de las mismas.

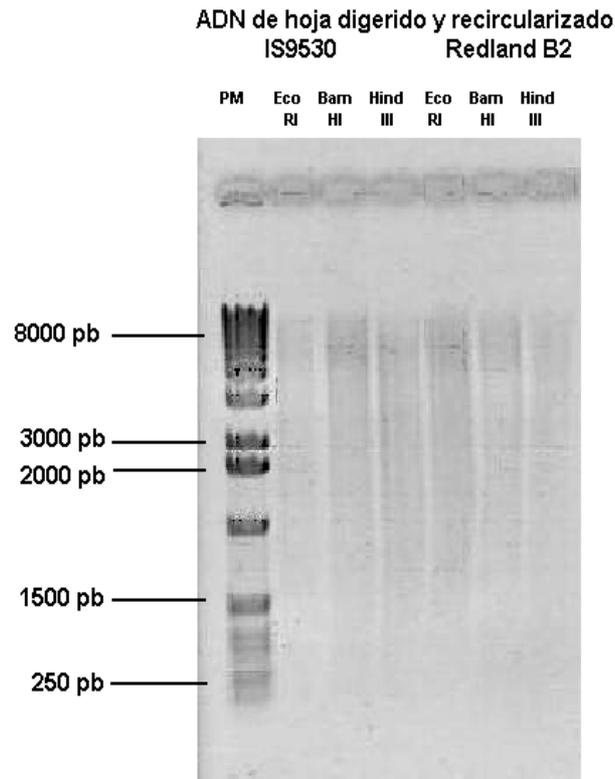


Figura 10. Recircularización y purificación de fragmentos de ADN genómico de hojas de las líneas IS9530 y Redland B2 cultivadas en México.

Como control positivo de la recircularización se puso en las mismas condiciones de ligación el plásmido pC43, el cual tiene un peso de 4.9 kpb. En la figura 11 se muestra el análisis electroforético de ligación del plásmido. En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 5000 pares de bases, la cual corresponde al plásmido sin digerir. En el carril 3 se observan dos bandas de menor intensidad, una banda del mismo peso molecular al plásmido sin digerir y una banda de aproximadamente 10 000 pares de bases, la cual puede tratarse de un dímero. El plásmido ligado se tomó como referencia positiva de

la técnica de ligación. La baja intensidad de las bandas en el carril 3 indican que se tiene bajo rendimiento del ADN ligado.

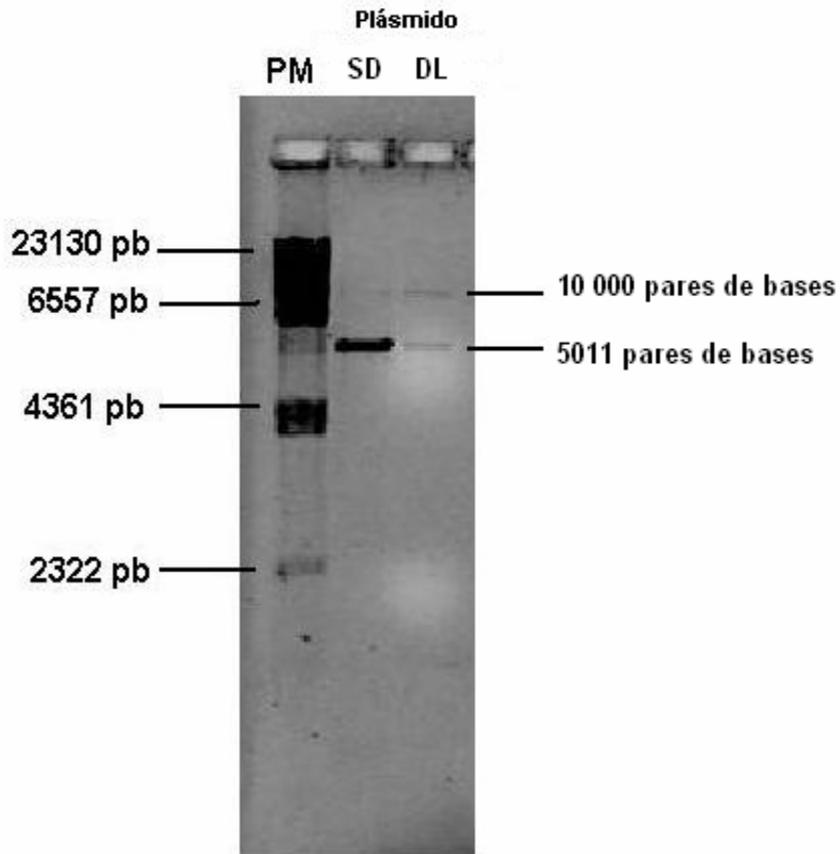


Figura 11. Control positivo de ligación del plásmido pC43 (SD, sin digerir; DL, digerido y ligado). El plásmido pC43 fue digerido y recircularizado en las mismas condiciones de las muestras de ADN genómico de hojas de plantas de sorgo.

5.2.3. PCR inversa de fragmentos de ADN ligados.

Se realizaron varias reacciones de amplificación (PCR inversa) con diferentes temperaturas de hibridación. Se probaron temperaturas desde 50°C a 75°C. En las figuras 12 y 13 se presentan las reacciones de amplificación de las muestras con una temperatura de hibridación de 60°C y 50°C, respectivamente. Solo se presentan estos análisis electroforéticos debido a que básicamente se obtuvieron los mismos resultados con todas las temperaturas

analizadas. En ninguno de los tratamientos realizados (digestiones con: *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*) se obtuvo amplificación.

Como un control positivo de amplificación se realizó una reacción de PCR para un fragmento de ADN que corresponde al gen para el ARNr 18S del hongo filamentoso *Amylomyces rouxii*, (con el objeto de descartar que los reactivos utilizados estuvieran en mal estado). Tanto en la figura 10 como en la figura 11 se observa una banda de 501 pares de bases con una mayor intensidad, que corresponde al gen amplificado del hongo filamentoso (control Ar), aunque en la figura 11 se observa otra banda de mayor intensidad de 316 pares de bases, esto debido al amplio rango de amplificación el cual va de 50 °C a 60 °C, del gen 18S del hongo. Por otro lado, con respecto a las bandas esperadas tanto en la figura 11 como en la 12 se aprecia que no se logró amplificar ningún fragmento. En los dos geles se aprecia amplificación del control positivo, aunque con diferentes tamaños, dependiendo de la temperatura de hibridación utilizada. De cualquier modo, la amplificación es positiva en esas muestras, descartando cualquier duda que se pudiera tener sobre la calidad de la reacción de amplificación.

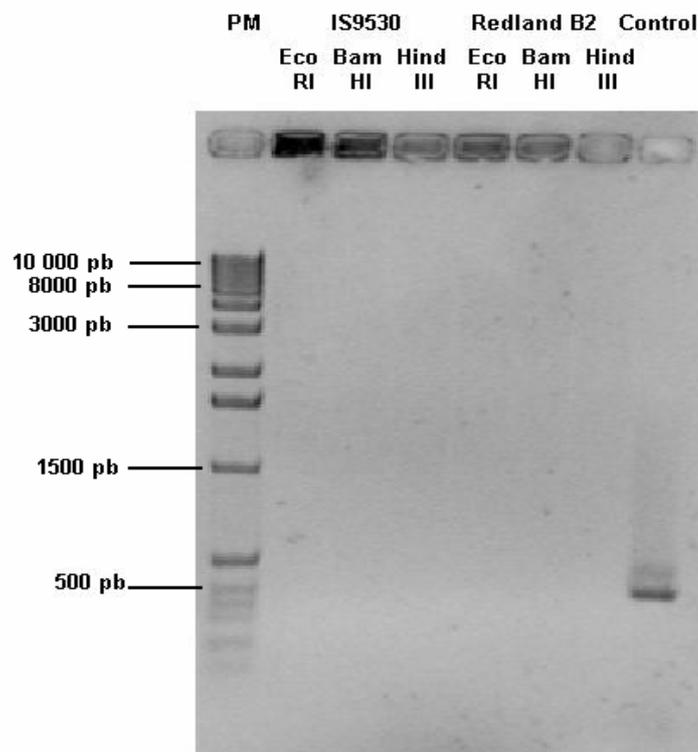


Figura 12. Reacción de PCR inversa a 60 °C de alineamiento de las muestras de hojas de plantas de las de las dos líneas de sorgo tratadas con enzimas de restricción y recircularizadas con la ligasa del fago T4.

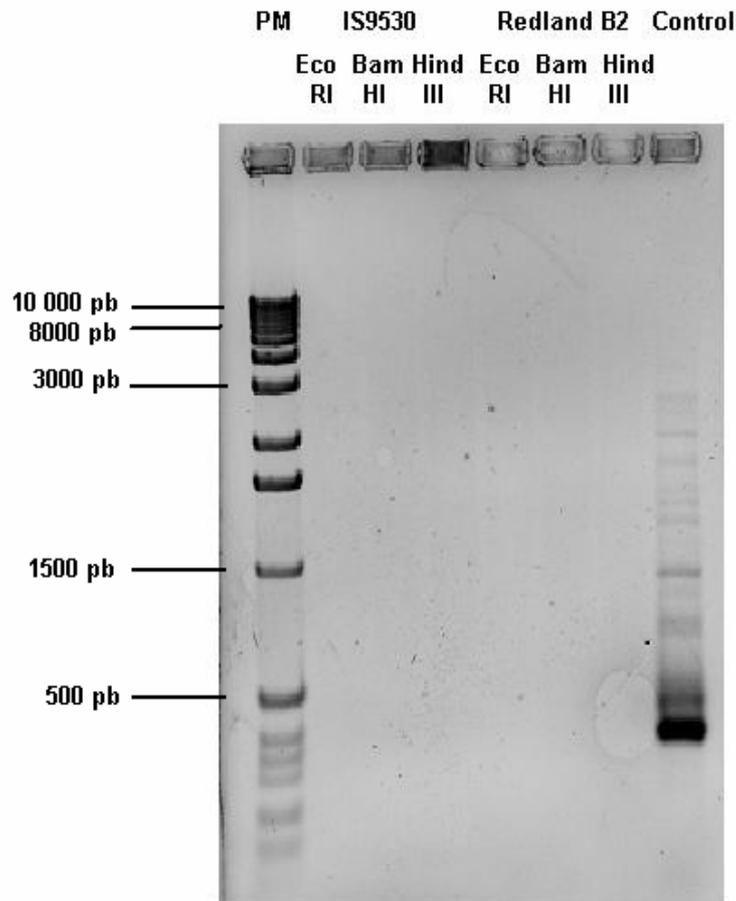


Figura 13. Reacción de PCR inversa a 50 °C de alineamiento de las muestras de hojas de las plantas de las dos líneas de sorgo tratadas con enzimas de restricción y recircularizadas con la ligasa del fago T4.

Como dato adicional y para descartar la posibilidad de que la no amplificación de los fragmentos de ADN de hojas para la caracterización del promotor se debiera a que en ADN de las horas no fuera un molde apropiado, se realizó una amplificación normal de una parte del gen para la GA20-oxidasa con cada muestra tratada con las endonucleasas. En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos de la amplificación, en donde se observa que en todos los casos (excepto en la línea Redland B2 tratada con *Bam*HI) se obtuvo una

banda con el tamaño esperado de 446 pares de bases. Se observó, por lo tanto que las muestras no se encontraban contaminadas o degradadas.

Como se mencionó anteriormente, las endonucleasas no tenían sitio de reconocimiento de corte en la secuencia del gen *SbGA20-oxidasa*, por lo que se propone que uno de los motivos por lo cual no se amplificó banda en la línea Redland B2 tratada con la enzima Bam HI se debió a un error en el manejo de la muestra o algún reactivo utilizado.

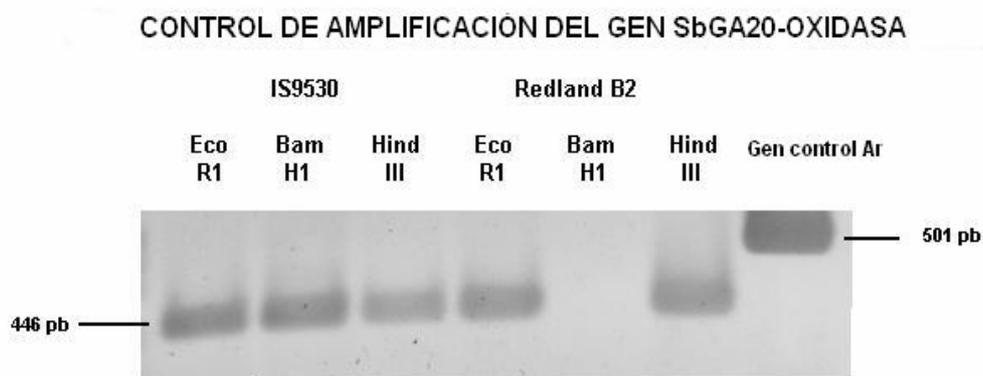


Figura 14. Control de recircularización. Amplificación de un fragmento de ADN del gen *GA20-oxidasa* de sorgo de las líneas IS9530 y Redland B2 de plantas cultivadas en México.

Estos resultados muestran que la técnica utilizada para la clonación del promotor del gen de la *SbGA20-oxidasa* no funcionó en hojas jóvenes de plantas de sorgo. Una razón por la cual no se obtuvieron bandas amplificadas, con base en los resultados obtenidos de la ligación del plásmido (ver figura 11), fue el bajo rendimiento en la recircularización, lo que pudo haber interferido en la reacción de amplificación. Se ha secuenciado y analizado el promotor de *Sbvp1* y entre sus características principales están que tiene elementos de respuesta al ABA y a la luz. La región más cercana al sitio de inicio de la transcripción tiene una homología elevada con su equivalente en el gen de maíz y en general tiene poco homología con el promotor de este gen en *Arabidopsis*.

Es importante caracterizar los promotores de los genes que potencialmente participan en el control del BPC para entender cómo se regula su expresión y profundizar en el conocimiento de las bases moleculares del BPC en sorgo.

Se continuó con la expresión de los genes *Sbvp1* y *GA20-oxidasa* en semillas de plantas cultivadas en México que no presentan brotado precosecha. A continuación se presentan los resultados de obtención de ARN de embriones de semillas de sorgo para analizar los niveles de los transcritos de *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa*.

5.3. Pureza y rendimiento del ARN total de embriones de semillas de sorgo que no presentan BPC.

Para verificar la pureza y el rendimiento de las muestras de ARN total de embriones de semillas de sorgo imbibidas durante diferentes tiempos se obtuvo la relación de absorbancia 260/280. Se observó que en todos los casos se obtuvieron valores cercanos a 2, lo que indica que la pureza de las muestras es alta (es decir la contaminación con proteínas o con otras biomoléculas es baja para ambas líneas y en todos los tiempos de imbibición). La tabla 1 presenta la pureza y el rendimiento, expresado como μg ARN / g de tejido. En el caso de 3 días de imbibición, para ambas líneas se obtuvo el rendimiento más bajo, aunque el grado de pureza es alto.

	IS 9530				Redland B2			
Tiempo de imbibición (días)	0	2	3	4	0	2	3	4
Relación 260/280	2.1	2.2	2.1	2.1	2.1	2.2	2.1	1.9
μg ARN / g de tejido	2240	1948	1113	1834	2075	2343	1212	1698

Tabla 1. Pureza y rendimiento obtenido de las muestras de ARN de semillas de sorgo cultivadas en México imbibidas durante diferentes tiempos.

5.4. INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL.

La integridad del ARN total, se comprobó mediante el análisis electroforético tanto en condiciones desnaturalizantes como no desnaturalizantes. En la figura 15 se presentan los geles de las dos líneas de sorgo donde se observan las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S. En las dos líneas analizadas, a 0 días de imbibición, la intensidad de las bandas de ARN ribosomal es baja. Ésto se podría deber al metabolismo de las semillas, ya que al no haber iniciado la imbibición y, por lo tanto estar secas, la actividad metabólica es baja, lo que se conoce como “semillas quiescentes”. Por lo anterior, se tomó la integridad del ARN ribosomal como aceptable y no degradado. Para los días de imbibición 2, 3 y 4 en ambas líneas se distinguen las dos bandas del ARN ribosomal 28S y 18S.

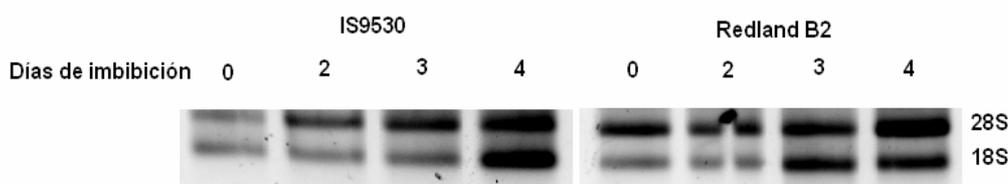


Figura 15. Integridad de ARN total de ejes embrionario de semillas de sorgo de las líneas IS9530 y Redland B2 que no expresan susceptibilidad contrastante al BPC.

5.5. EXPRESIÓN DEL GEN SBVP1 EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE SORGO DE LAS LÍNEAS IS9530 Y REDLAND B2 PROCEDENTES DE PLANTAS CULTIVADAS EN MÉXICO.

Se analizó mediante reacciones de RT-PCR el patrón de expresión del gen *Sbvp1* durante la imbibición de semillas de las líneas de sorgo IS9530 y Redland B2 procedentes de plantas cultivadas en México. En la figura 16 se presentan los resultados de un análisis electroforético representativo de la expresión del gen *Sbvp1* en ambas líneas. El análisis de expresión se realizó en tres muestras independientes con resultados similares. Se observa que los transcritos del gen se encuentran presentes desde los 0 días de imbibición en ambas líneas y que los niveles del transcrito se mantienen elevados en la línea

IS9530 a lo largo del tiempo de imbibición (figura 16A), mientras que en la línea Redland B2 hay un decremento en la expresión del gen después de los 2 días de imbibición (figura 16B).

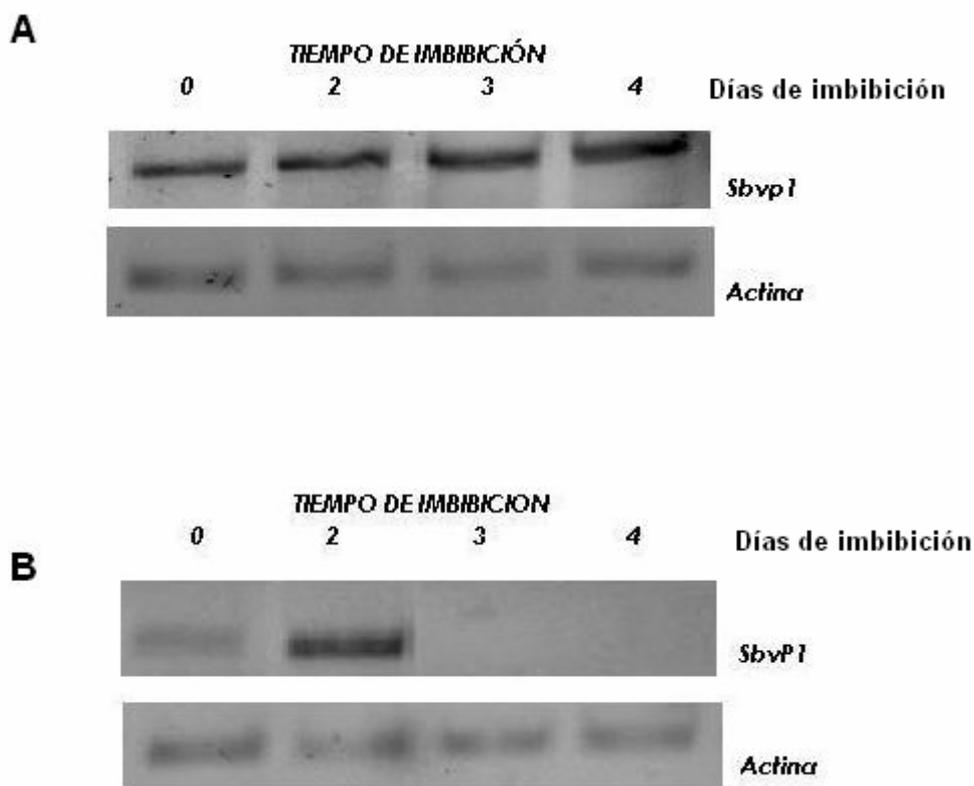


Figura 16. Análisis de expresión del gen *Sbvp1* en embriones de la línea IS9530 (16A) y de la línea Redland B2 (16B) de semillas procedentes de plantas cultivadas en México. El análisis de la expresión se realizó por triplicado.

En la figura 17 se muestra el análisis densitométrico de la expresión del gen *Sbvp1* durante la imbibición, realizado con tres muestras independientes de semillas de sorgo cultivadas en México que no presentan brotado precosecha. Se observa que en la línea IS9530 hay altos niveles de transcritos durante todo el periodo de imbibición, mientras que en la línea Redland B2 sólo se detectan transcritos a los 0 días y 2 días de imbibición. El análisis estadístico de estos resultados demuestra que los niveles de transcritos de *Sbvp1* en Is9530 son

significativamente superiores a los de Redland B2 y no presentan cambios en esta línea durante todo el periodo de imbibición (Anexo 2).

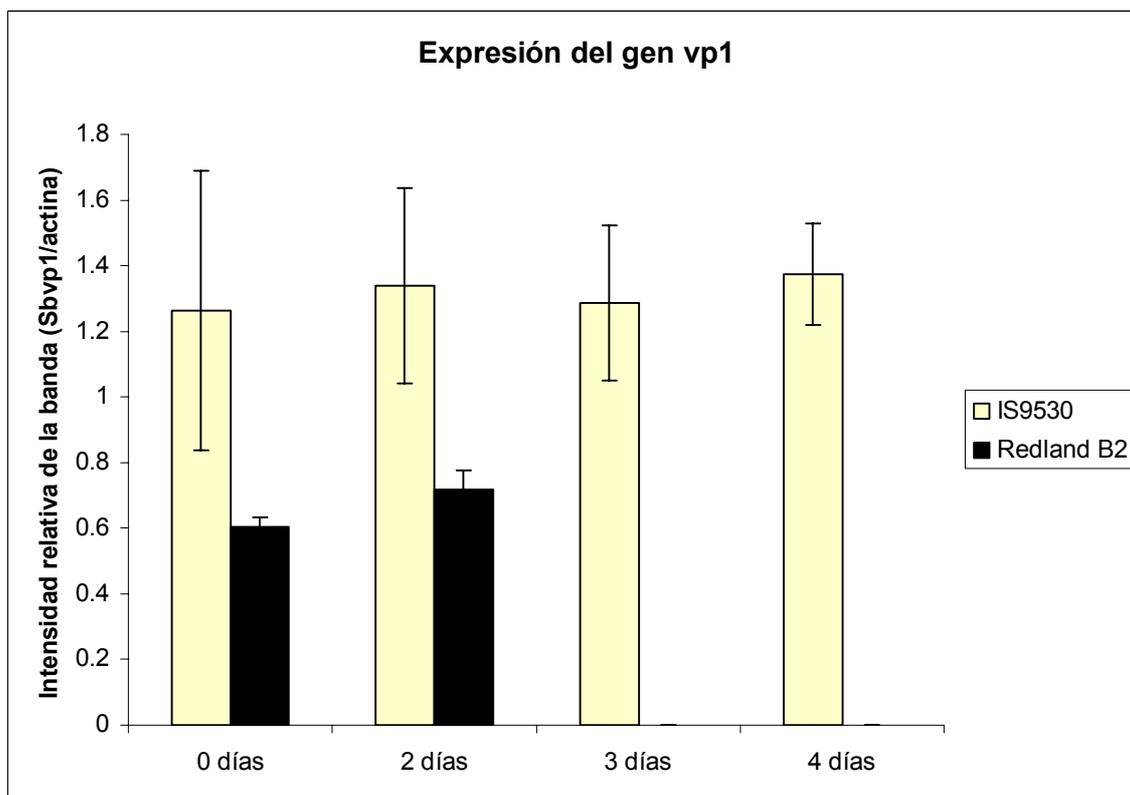


Figura 17. Expresión relativa del ARNm del gen *Sbv1* con respecto al ARNm del gen de actina.

Los niveles de transcritos de *Sbv1* fueron similares a los reportados en semillas cultivadas en Argentina, sin embargo no hubo correlación entre el nivel de latencia de estas semillas y los niveles de transcritos de *Sbv1* lo que contrasta con resultados previos de nuestro grupo con semillas cultivadas en Argentina. Al respecto Carrari y colaboradores (2001b) demostraron que la expresión de este gen en semillas procedentes de plantas cultivadas en Argentina que presentaban susceptibilidad contrastante al brotado precosecha se mantenía a lo largo del tiempo de imbibición en la línea IS9530 (resistente al BPC). En la línea susceptible al BPC, Redland B2, los ARNm del gen *Sbv1* sólo se encontraron a los 0 y 2 días de imbibición. Por otro lado, se observó

que los niveles de transcrito de este gen se encontraba en niveles similares en ambas variedades en semillas no imbibidas. Es decir que en las semillas de plantas cultivadas en Argentina se correlacionaron los niveles de transcritos de *Sbvp1* y el grado de latencia (Carrari y col., 2001b), mientras que en las semillas cultivadas en México la disminución en la latencia de la línea IS9530 pudiera ser debida a las condiciones en las que se desarrollaron las semillas y/o el estado de desarrollo en las que se midió la expresión (60 DPA).

En este mismo sentido, Jones y colaboradores (1997) observaron que los niveles de expresión del gen *Afvp1* en embriones de semillas de *Avena fatua* también correlacionaban con los niveles de latencia, sugiriendo que la expresión de *vp1* regula los niveles de latencia en estas semillas.

Por otro lado, se sabe que *vp1* reprime la expresión de genes de α -amilasa (White y Rivi, 2000). En las semillas cultivadas en Argentina, las cuales presentaban susceptibilidad contrastante al BPC Pagano y colaboradores (1997) observaron diferencias en los niveles de actividad de α -amilasa durante el desarrollo de las semillas. La línea IS9530 presentaron muy baja actividad de α -amilasa durante todo el periodo de desarrollo; en contraste con la línea Redland B2 que mostró una actividad de α -amilasa incrementada cerca de la madurez fisiológica. En las semillas desarrolladas en México no hubo diferencia en la actividad de α -amilasa (Avendaño-Gómez, 2005) posiblemente el incremento en la actividad de α -amilasa en IS9530 que ya no difiere de la línea Redland B2, explique en parte la mayor germinación obtenida en la línea IS9530 (ver figura 7).

5.6. EXPRESIÓN DEL GEN *SBGA20-OXIDASA* EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE SORGO DE LAS LÍNEAS IS9530 Y REDLAND B2 PROCEDENTES DE PLANTAS CULTIVADAS EN MÉXICO.

En las semillas maduras (60 DPA) procedentes de plantas cultivadas en México en el año 2003, la expresión del gen *SbGA20-oxidasa* durante la imbibición presentó cambios en ambas líneas, en comparación con las

semillas cultivadas en Argentina. En ambas líneas, el gen se expresa desde las 0 horas de imbibición (semillas secas) aunque en niveles diferentes, en la línea Redland B2 la expresión es mayor que en la línea IS9530.

La figura 18 muestra el patrón de expresión del gen *SbGA20-oxidasa* en semillas de la línea IS9530 (figura 17A). Se observa que los ARNm del gen se detectan a lo largo de todo el tiempo de imbibición en ambas líneas. En las semillas de la línea Redland B2 (figura 17B) los niveles de transcritos de este gen se detectan a lo largo de todo el periodo de imbibición desde el tiempo 0, con una disminución hacia el final del tiempo de incubación (4 días).

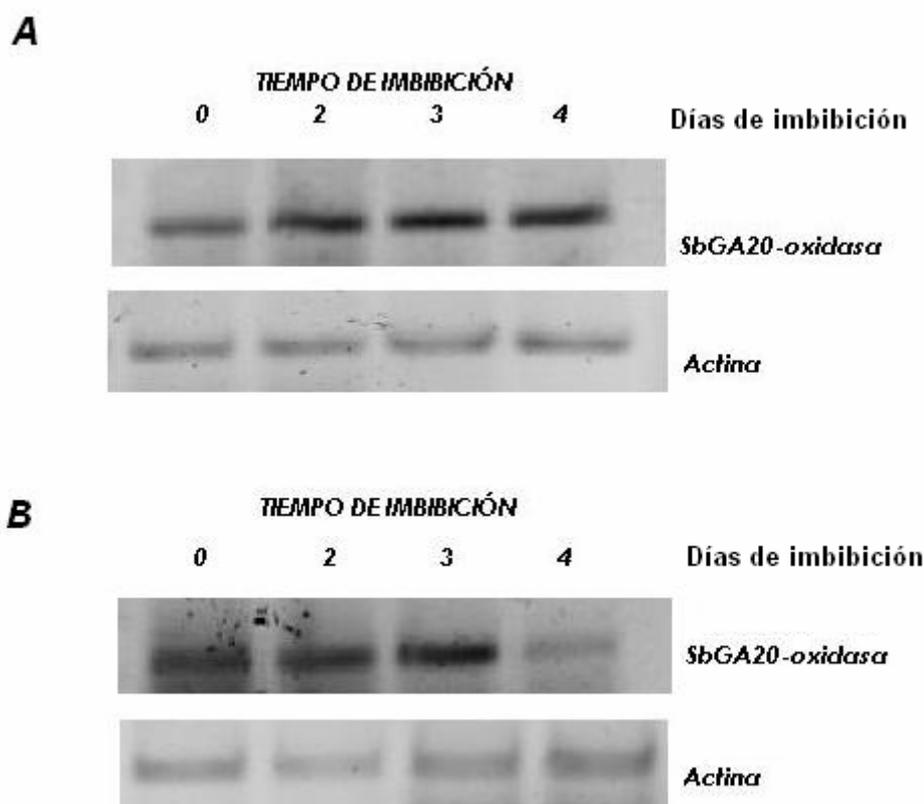


Figura 18 A). Análisis de expresión durante la imbibición de *SbGA20-oxidasa* en embriones de la línea IS9530 (18A) y de la línea (18B) de semillas de 60 DPA cultivadas en México. El análisis de expresión se realizó por triplicado obteniéndose los mismos resultados.

En la figura 19 se muestra el análisis densitométrico de la expresión del gen *SbGA20-oxidasa* durante la imbibición, con tres muestras independientes de semillas de sorgo cultivadas en México que no presentan brotado precosecha. Se observa que en la línea Redland hay altos niveles de transcritos durante todo el periodo de imbibición y disminuyen hacia el final del mismo, mientras que en la línea IS9530 se detectan transcritos desde los 0 días hasta los 4 días de imbibición. El análisis estadístico de estos resultados demuestra que los niveles de transcritos de *SbGA20-oxidasa* en Redland B2 son significativamente mayores que los de IS9530.

En las semillas de plantas cultivadas en Argentina con susceptibilidad contrastante al BPC, se encontró que la expresión del gen *SbGA20-oxidasa* en embriones de 40 DPA de la línea Redland B2 incubados a diferentes tiempos, se detectó desde etapas tempranas de la imbibición (18 horas) y la cantidad del transcrito se fue incrementando hasta las 96 horas (ver figura 1, pagina 15). En cambio, en embriones de la línea IS9530 (resistente al BPC y con velocidad de germinación menor) la cantidad del transcrito de *SbGA 20ox* permaneció baja durante todo el periodo de imbibición, sólo con un ligero aumento a las 40 horas de incubación, aunque posteriormente bajaron nuevamente los niveles (ver figura 1, pagina 15) (Pérez-Flores y col., 2003).

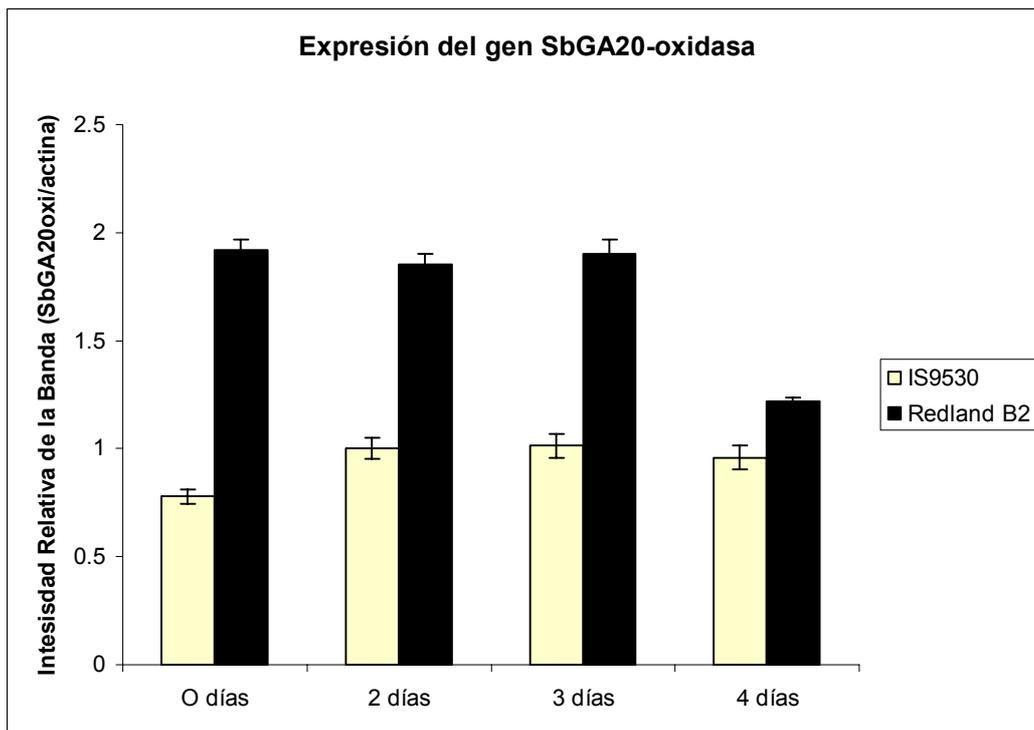


Figura 19. Análisis densitométrico. Expresión relativa del ARNm del gen *SbGA20-oxidasa* con respecto al ARNm del gen de actina.

Aunque los niveles de los transcritos del gen *SbGA20-oxidasa* durante la imbibición de las semillas son superiores en la línea Redland B2 (figura 18), en incremento en los niveles de transcrito en la línea IS9530, respecto a lo observado en semillas de Argentina (ver figura 1), podría explicar la velocidad de germinación superior en IS9530, considerando que Avendaño-Gómez (2005) reportó cambios en la sensibilidad a las GA's en las semillas de las dos líneas de sorgo cultivadas en México con respecto a las semillas cultivadas en Argentina. Las semillas maduras de la línea IS9530 presentaron un incremento en la sensibilidad a GA's y una disminución en la sensibilidad al ABA. Los cambios en la sensibilidad a estas hormonas contribuyen a explicar la mayor velocidad de germinación observadas en estas líneas; aunado a la mayor expresión del gen *SbGA20-oxidasa* en la línea IS9530.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la influencia de las condiciones ambientales en que se desarrollan los cultivos en la manifestación del BPC durante la ontogenia de las semillas y su velocidad de germinación. Al

no darse en México las condiciones ambientales propicias para la expresión del BPC, los mecanismos de regulación de la latencia como la expresión de *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa* y la sensibilidad al ABA y GA's son diferentes, expresándose una mayor sensibilidad a GA's y mayores niveles de *SbGA20-oxidasa* en IS9530 que podrían explicar su mayor velocidad de germinación.

Los niveles de transcritos de *Sbvp1* analizados en el presente trabajo en las semillas cultivadas en México, no correlacionan con la velocidad de germinación observada en ambas líneas ya que IS9530 germinó más que Redland B2 pero no disminuyó la expresión de *Sbvp1*. Sin embargo, respecto al nivel de transcrito de *SbGA20-oxidasa*, aunque en Redland B2 los niveles de transcrito fueron superiores, la mayor sensibilidad a las GA's reportada previamente en IS9530 aunado a una mayor expresión del gen, respecto a las semillas cultivadas en Argentina, permitiría explicar en cierta medida la mayor velocidad de germinación en IS9530 a Redland B2. Sería necesario cuantificar los niveles de giberelinas durante la imbibición.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

- La técnica de PCR inversa utilizada para la caracterización del promotor del gen en hojas de plantas de sorgo de las líneas IS9530 y Redland B2 no generó bandas que pudieran ser secuenciadas, por lo que sería necesario probar otras metodologías para caracterizar el promotor de *SbGA20-oxidasa*. La caracterización del promotor permitiría entender mejor la regulación de la expresión de este gen en las dos líneas de sorgo estudiadas en este trabajo y su participación en el brotado precosecha.
- Las semillas de IS9530 procedentes de plantas cultivadas en México presentaron una mayor velocidad de germinación que las semillas de Redland B2.
- Los niveles de expresión del gen *Sbvp1* en IS9530 se mantienen elevados durante todo el periodo de imbibición, por lo que no correlacionan con el aumento en la velocidad de germinación observado para estas semillas.
- Los niveles de expresión de *SbGA20-oxidasa* en IS9530 incrementaron respecto a los niveles en semillas cultivadas en Argentina, lo cual aunado al incremento a la sensibilidad a GA's reportado previamente podría explicar parcialmente el incremento en la velocidad de germinación de las semillas IS9530 cultivadas en México.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- **Allen, P. y Meyer, S.** (1998). Ecological aspects of seed dormancy loss. *Seed Science Research* **8**: 183-191.
- **Andersson, L. y Milberg, S.** (1998). Variation in seed dormancy loss. *Seed Science Research* **8**: 183-191.
- **Avendaño-Gómez, A.** (2005). Estudios histológicos y bioquímicos del brotado precosecha en sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D. F.
- **Baskin, C. y Baskin, J.** (1998). *Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination.* Ed. Academic Press. New York
- **Bewley, D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.* **9**: 1055-1066.
- **Bewley, D. y Black, M.** (1994). *Seeds. Physiology of development and germination.* Second edition. Plenum Publishing Corporation, New York.
- **Benech-Arnold, R., Enciso, S., Sanchez, R.A., Carrari, F., Perez-Flores, L. Iusem, N, Steinbach, S., Lijavetzhy, D. y Bottíni, R.** (2000). Involvement of ABA and GAs in the regulation of the dormancy in developing sorghum seeds. *Seed Biology: Advances and Applications.* Ed. CABI Publishing 101-111.
- **Benech-Arnold R., Kristof G., Sanchez, R.M, Steinbach, H. y Marcucci-Poltri, S.** (1995a) Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting resistance and susceptible varieties. *Sorghum Seeds. Plant Physiol* **113**: 149-154.

- **Benech-Arnold R., Sanchez R.A., Steinbach H. y Kristof G.** (1995b). Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in sorghum varieties with contrasting pre-harvest sprouting susceptibility. *Journal Experimental of Botany* **46**: 711-717.
- **Bobb, A.J., Eiben, H.G. y Bustos, M.M.** (1995). PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activador enhances gene expression from pahseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant Journal* **8**: 331-343.
- **Bove, J., Jullien, M. y Grappin P.** (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* **3**: 1002.1-1002.5.
- **Bradbeer, J.W. y Pinfield, N.J.** (1966). Studies in seed dormancy: 3. The effects of gibberellin on dormancy seeds of *Corylus avellana* L. *New Phytologist*. **66**: 515-523.
- **Buchanan, Gruissem y Jones.** (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Second Impresion. American Society of Plants Physiology. EUA. 543-586.
- **Carrari, F., Frankel, N., Lijavetzky, D., Benech-Arnold, R., Sanchez, R. y Iusem, N.D.** (2001a). The TATA-less promoter od *VP1*, a plant gene controlling seed germination. *DNA sequence* **12**: 107-114.
- **Carrari, F., Perez-Flores, L., Lijavetzki, D., Iusem, N., Benech-Arnold, R., Sánchez, R. y Hopp, H.** (2001b) Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize *vp1*. Its potential involvemnet in pre-harvest sprouting resistance. *Plant Molecular Biology*. **45**: 631-640.
- **Clark, E., Collier, J. y Langston, R.** (1968). Dormancy in Sorghum bicolor (L.) Moench II. Effect of pericarp and testa. *Crop Science* **8**: 155-158.

- **Castor, L.L. y Fredericksen, R.A.** (1977). Seed moulding grain sorghum caused by *Fusarium* and *Curularia*. Proceedings of the Annual Phytopathology Society **4**: 151-156.
- **Debeaujon, I., León-Kloosterziel K.M. y Koornneef M.** (2000). Influence of the testa on seed germination dormancy, germination and longevity in *Arabidopsis*. Plant Physiology **122**: 403-414.
- **Dunwell, J.M.** (1981). Dormancy and germination in embryo of *Hordeum vulgare* L. Effect of dissection, incubation temperature and hormone application. Annals of Botany **48**: 203-213.
- **Gale, M.D., Flintham. J.E. y Devos, K.M.** (2002). Cereal comparative genetics and prehaust sprouting. Euphytica **126**: 21-25.
- **Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J y Job, D.** (2001). Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. Plant Physiology **126**: 835-848.
- **Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. y Goodman, H.M.** (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 Gene by Positional Cloning. The Plant Cell **4**:1251-1261.
- **Groot, S.P. y Karssen, C.M.** (1987). Gibberellin regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. Planta **171**: 525-531.
- **Gualano, N., Carrari, F., Rodríguez, M.V., Pérez-Flores, L., Sánchez, R., Insem, N. y Benech-Arnold, R.** (2006). Reduced embryo sensitivity to ABA in a Sprouting-susceptible sorghum (*Sorghum bicolor*) variety is associated with an altered ABA signaling. Sometido para su publicación a la revista Annals of Botany

- **Hattori, T., Vasil, V., Rosenkrans, L., Hannah, L.C. y McCarty, D.R.** (1992). The *viviparous-1* gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Development* **6**: 609-618.
- **Hattori, T., Terada, T., Hamasuna, S.T.** (1994). Sequence and functional analyses of the rice gene homologous to the Maize Vp1. *Plant Molecular Biology* **24**: 805-810.
- **Hedden, P. y Croker, S.J.** (1992). Regulation in gibberellins biosynthesis in maize seedlings. *In* Karssen CM, Van Loon LC, Vreugenhil D, eds, *Progress in plant growth regulation*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 534-544.
- **Hedden, P. y Phillips, A.** (2000). Gibberellins metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*. **5**: 523-530.
- **Hoecker, U., Vasil, I.K. y McCarty, D.R.** (1995). Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of Maize. *Genes Development* **9**: 2459-2469.
- **Hoecker, U., Vasil, I.K, McCarty, D.R.** (1999). Signaling from the embryo conditions *Vp1*-mediated repression of α -amylase genes in the aleurone of developing maize seeds. *The Plant Journal* **19**: 371-377.
- **Hollung, K., Espelund, M., Schou, K. y Jakobsen, K.S.** (1997). Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZip transcription factor and Vp1 in barley embryos and embryos-derived suspension cultures. *Plant Molecular Biology* **35**: 561-571.
- **Jones, H.D., Peters, N.C. y Holdsworth, M.J.** (1997). Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of

the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. The Plant Journal **12**: 911-920.

- **Jones, R., Harberd, N. y Kamiya, Y.** (2000). Gibberellin 2000. Trends in Plant Science **5**: 320-321.
- **Kao, C.Y., Cocciolone, S.M., Vasil, I. K. y McCarty, D.R.** (1996). Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS 1, and light activation of the gene of maize. Plant Cell **8**: 1171-1179.
- **Karssen, C.M., Zagorski, S., Kepczynski, J. y Groot, S.P.** (1989). Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. Annual Botanical **63**: 71-80.
- **Kermode, R.** (1990). Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. Critical Reviews In Plant Science **19**: 155-188.
- **Koornneef, M., Reuling, G. y Karssen, C.M.** (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology. **61**: 377-383.
- **Koornneef, M. y Van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitivity mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Theoretical Application Genetic **58**: 257-263.
- **Lange, T.** (1998). Molecular biology of gibberellin synthesis. Planta **204**: 409-419.
- **Lange, T., Schweimer, A., Ward, D.A, Hedden, P. y Graebe, J.E.** (1994). Separation and characterization of three 2-oxoglutarate-

dependent dioxygenases from *Cucurbita maxima* L. endosperm involved in gibberellin biosynthesis. *Planta* **195**: 98-107.

- **Léon-Kloosterziel, K.M., Van de Bunt, GA., Zeevaart, J.A. y Koornneef, M.** (1996). Arabidopsis mutant with a reduced seed dormancy. *Plant Physiology* **110**: 233-240
- **Lijavetzky, D., Martinez, C., Carrari, F. y Hopp, E.** (2000). Pre-harvest sprouting resistance in sorghum is controlled by just two major QTLs showing epistatic effects. *Euphytica* **112**:125-135.
- **Martin, D., Proebsting, W., Dawn-Parks, T., Dougherty, W., Lange, T., Lewis, M., Gaskin, P. y Hedden, P.** (1996). Feedback regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta* **200**: 159-166.
- **McCarty, D.R, Hattori, T., Carson, C.B, Vasil, V., Lazar, M. y Vasil, I.K.** (1991). The viviporous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**: 895-905.
- **Moreno, C.** (1996). Vida y obra de granos y semillas. La ciencia desde México. ED. México, D. F.
- **Nakamura, S. y Toyama, T.** (2001). Isolation of a VP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *Journal Experimental Botany* **52**: 875-876.
- **Nambara, E., Naito, S. y McCourt, P.** (1992). A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *The Plant Journal* **2**: 435-441.

- **Pagano, E., Benech-Arnold, R., Wawrzkievicz, M. Y Steinbach, H.** (1997). α -Amylase activity in developing sorghum caryopses from sprouting resistant and susceptible varieties. The role of ABA and Gas on its regulation. *Annals of Botany* **79**: 13-17.
- **Pérez-Flores, L., Carrari, F., Osuna-Fernández, R., Rodríguez, M., Enciso, S., Stanelloni, R., Sánchez, R., Bottini, R., Iusem, N. y Benech-Arnold, R.** (2003). Expression analysis of a GA 20-oxidase in embryos from two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. *Journal Experimental Botany*. **54**: 2071-2079.
- **Phillips, J. y Conrad, U.** (1994). Genomic sequences from *Nicotiana tabacum* homologous to the Maite transcriptional activator gene *Viviparous 1*. *Journal Plant Physiology* **144**: 760-761
- **Phillips, A.L, Ward, D.A, Uknes, S., Appleford, N.E., Lange, T., Util, A.K., Gaskin, P., Graebe, J.A. y Hedden, P.** (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **108**: 1049-1057.
- **Roach, D. y Wulff, R.** (1987). Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecological Systems* **18**: 209-235
- **Robichaud, C.S, Wong, J. y Sussex, I.M.** (1987). Control *in vitro* growth of *viviparous* embryo mutants of maize by abscisic acid. *Development Genetic* **1**: 325-330.
- **Roberts, H.** (1972). Viability of seeds. Capitulo 11. d. Chapman and Hall Ltd. Londres.

- **Rohde, A., Montagu, M.V. y Boerjan, W.** (1999). The ABSCICIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **22**: 261-270.
- **Romagosa, I., Prada, D., Moraleja, M., Sopena, A., Muñoz, P., Casas, A., Swanson, J. y Molina, J.** (2001). Dormancy, ABA content and sensitivity of a barley mutant to ABA application during seed development and alter ripening. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1499-1506.
- **Schultz, T.F., Medina, J., Hill, A. y Quatrano, R.S.** (1998). 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the *em* promoter and interact with VP1 and EmBP1. *The Plant Cell* **10**: 837-847
- **Schwechhimer, C. y Bevan, M.** (1998). The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in Plant Science*. **3**: 378-383.
- **Somody, C., Nalewaja, J. y Millar, S.** (1984). The response of wild oat (*Avena fatua*) and *Avena sterilis* accessions to the daylight and the temperature. *Weed Science* **32**: 26-213.
- **Steinbach, H., Benech-Arnold, R.L. y Sanchez, R.A.** (1997). Hormonal regulation of dormancy in developing *Shorgum* seeds. *Plant Physiology* **113**: 149-154.
- **Ting, I.** (1982). *Plant Physiology*. Addison-Wesley Publishing Company. 309-314.
- **Toyomasu, T., Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Inoue, Y. y Kamiya, Y.** (1998). Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology* **118**: 1517-1523.

- **Vasil, V., Marcotte, W. R., Rosenkrans, L., Cocciolone, S. M., Vasil, I., Quatrano, R.S. y McCarty, D.R.** (1995). Overlap of *viviparous 1* (*vp1*) and abscisic acid response elements in the Em promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for *vp1* transactivation. *Plant Cell* **7**: 1511-1518.
- **Visser, K., Vissers, P.A., Cagirgan, M.I, Kijne, J.W., Wang, M.** (1996). Rapid germination of a Barley mutant is correlated with a rapid turnover of abscisic acid outside the embryo. *Plant Physiology* **111**: 1127-1133.
- **Walker-Simmons, M.** (1987). ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology* **84**: 61-66.
- **Welbaum, G.E., Tissaoui, T. y Bradford K.J.,** (1990). Water relations of seeds development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). III sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. *Plant Physiology* **92**: 1029-1037.
- **Wedner, S. y Paprocka, J.** (1997). Preharvest sprouting as related to change in concentration of phenolic compounds in cereal grain and embryo sensitivity to phenolic acids during seed development. *In* Proceedings of COST 828 Workgroup 2 Meeting ; Barcelona, November 10, 1997.
- **White, C. y Rivi, C.** (2000). Gibberellins and seed development in maize. II Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signalin in cultivated embryos. *Plant Physiology* **122**: 1089-1097.
- **Wilkinson, M., McKibbin, R.S., Bailey, P.C., Flintham, J.E., Gale, M. D., Lenton, J.R. y Holdsworth, M.J.** (2002). Use of comparative molecular genetics to study pre harvest sprouting in wheat. *Euphytica* **126**: 27-33.

- **Williamson, J. D. y Quatrano R.S.** (1988). ABA regulation of two classes of embryo specific sequences in mature maize embryos. *Plant Physiology* **86**: 208-215.
- **Xu, Y.L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J, Gage, D.A. y Zeevaart, J.A.** (1995). The GAS locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidases molecular cloning and functional expression. *Proceedings of the National Academy Sciences* **92**: 6640-6644.
- **Yamaguchi, S. y Kamiya, Y.** (2000). Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant and Cell Physiology*. **41**: 251 – 257.
- **Yang, Y.Y., Nagatani, A., Zhao, Y.J., Kang, B.J., Kendrick, R.E. y Kamiya, Y.** (1995). Effects of gibberellin on seed germination of phytochrome.deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1205-1211.
- **Zeiger, E. y Taiz, L.** (1998). *Plant Physiology*. 2nd Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc. N. Y., Estados Unidos.

ANEXO 1

Buffer TAE 50X (1 litro)

57.1 mililitros de ácido acético glacial
100 mililitros de EDTA 0.5 M pH 8.0
242 gramos de Tris-base

Buffer de carga 6X

Azul de bromofenol al 0.025% (p/v)
Glicerol al 50% (p/v)
SDS 0.1%
EDTA 0.1M
Xilén cianol al 0.025%

Bromuro de etidio (0.5 mg/ml)

Se pesaron 100 mg de bromuro de etidio y se diluyeron en 10 mililitros de dH₂O, se realizo una dilución para una concentración final de 0.5 mg/ml.

Fenol ácido

Se mezclaron 500 mililitros de fenol sólido con 500 mililitros de agua destilada, se agitó, se dejó reposar y se desechó la parte superior acuosa. Se burbujeo con nitrógeno gaseoso durante 15 minutos y se guardó a 4°C en un recipiente oscuro.

Fenol neutro

Se mezclaron por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantuvo la mezcla en reposo hasta que se separó la fase superior acuosa y la fase inferior fenólica.

Tabla de concentración de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN y ARN.

Concentración de agarosa	Tamaño de los fragmentos a separar
0.3 %	5-60 kpb
0.5%	1-30 kpb
0.7%	0.8-12 kpb
1%	0.5-10 kpb
1.2%	0.4-7 kpb
1.5%	0.2-3 kpb
2.0%	0.05-2 kpb

ANEXO 2

Análisis Estadístico de Curva de Germinación

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A (...)	1	104.1667	104.1667	18.38	0.012772*	
S(A)	4	22.66667	5.666667			
Total (Adjusted)	5	126.8333				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0.05

Dunnett's Two-Sided Multiple-Comparison Test With Control

Response: Dia2B2,Dia2IS
Term A:

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=5.666667 Critical Value=2.7764

If Control Group Is	Count	Mean	Different From Treatment Groups
Dia2B2	3	12	Dia2IS
Dia2IS	3	20.33333	Dia2B2

Dunnett's Lower One-Sided Multiple-Comparison Test With Control

Response: Dia2B2,Dia2IS
Term A:

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=5.666667 Critical Value=2.1318

If Control Group Is	Count	Mean	Different From Treatment Groups
Dia2B2	3	12	
Dia2IS	3	20.33333	Dia2B2

Reporte de Análisis de Variaza

Dunnett's Upper One-Sided Multiple-Comparison Test With Control

Response: Dia2B2,Dia2IS
Term A:

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=5.666667 Critical Value=2.1318

If Control Group	Count	Mean	Different From Groups
Dia2B2	3	12	Dia2IS
Dia2IS	3	20.33333	

Dunnett's Simultaneous Confidence Intervals for Treatment vs. Control

Response: Dia2B2,Dia2IS
Term A:
Control Group: Dia2B2

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=5.666667 Critical Value=2.7764

Treatment Group	Count	Mean	Lower 95.0% Simult.C.I.	Difference With Control	Upper 95.0% Simult.C.I.	Test Result
Dia2IS	3	20.33333	2.936894	8.333333	13.72977	U

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 3 29/11/2006 04:38:40 p.m.

Database

Response Dia2B2,Dia2IS

EXPRESIÓN DE Sbv1 en IS9530

Reporte de análisis de varianza

Dia0, Dia2, Dia3, Dia4

Tabla de análisis de varianza

Term	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A		3	2.216177E-02	7.387255E-03	0.08	0.966541	
S(A)		8	0.6987196	8.733995E-02			
Total (Adjusted)		11	0.7208814				
Total		12					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Standard

	Conteo	Media	Error	Efecto
All	12	1.316207	1.316207	
A:				
Dia0	3	1.264231	0.1706263	-0.0519762
Dia2	3	1.339141	0.1706263	2.293355E-02
Dia3	3	1.287496	0.1706263	-2.871086E-02
Dia4	3	1.37396	0.1706263	5.775351E-02

Intervalos de confianza para el tratamiento vs. control

Response: Dia0, Dia2, Dia3, Dia4

Term A:

Control: Dia0

$\alpha=0.050$ Error Term=S(A) DF=8 MSE=8.733995E-02 Critical Value=2.8797

Treatmento	Conteo	Media	Simult.C.I.	con Control	Lower 95.0% Simult.C.I.	Difference Result	Upper 95.0%
Dia2	3		1.34	-0.62	0.07	0.77	
Dia3	3		1.29	-0.67	0.02	0.72	
Dia4	3		1.37	-0.59	0.11	0.80	

EXPRESIÓN DE Sbp1 en Redland B2

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 08/11/2006 06:18:51 p.m.

Database

Response Dia0,Dia2,Dia3,Dia4

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A (...)	3	1.328489	0.4428295	405.64	0.000000*	
S(A)	8	8.733375E-03	1.091672E-03			
Total (Adjusted)	11	1.337222				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	12	0.3303182		
A:				
Dia0	3	0.6041163	1.907592E-02	
		0.2737981		
Dia2	3	0.7171565	1.907592E-02	
		0.3868383		
Dia3	3	0	1.907592E-02	-
		0.3303182		
Dia4	3	0	1.907592E-02	-
		0.3303182		

Dunnett's Simultaneous Confidence Intervals for Treatment vs. Control

Response: Dia0,Dia2,Dia3,Dia4

Term A:

Control Group: Dia0

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=1.091672E-03 Critical Value=2.8797

Treatment Group	Count	Mean	Lower 95.0% Simult.C.I. With Control	Difference Simult.C.I.	Upper 95.0% Simult.C.I. Result	Test
Dia2	3	0.72	0.04	0.11	0.19	U
Dia3	3	0.00	-0.68	-0.60	-0.53	L
Dia4	3	0.00	-0.68	-0.60	-0.53	L

EXPRESIÓN DE GA20-oxidasa en IS9530

Page/Date/Time 1 08/11/2006 05:45:22 p.m.

Database

Response Dia0,Dia2,Dia3,Dia4

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A (...)	3	0.1061024 0.994899	3.536748E-02	14.90	0.001225*	
S(A)	8	1.899169E-02	2.373962E-03			
Total (Adjusted)	11	0.1250941				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	12	0.9378506		
A: Dia0 0.1589981	3	0.7788525	2.813042E-02	-
Dia2	3	1.000195 6.234453E-02	2.813042E-02	
Dia3	3	1.013829 7.597887E-02	2.813042E-02	
Dia4	3	0.9585254 2.067474E-02	2.813042E-02	

Dunnett's Simultaneous Confidence Intervals for Treatment vs. Control

Response: Dia0,Dia2,Dia3,Dia4

Term A:

Control Group: Dia0

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=2.373962E-03 Critical Value=2.8797

Tratamiento Grupo	Count	Lower 95.0% Mean Simult.C.I.	Difference With Control	Upper 95.0% Simult.C.I.	Test Result
Dia2	3	1.00 0.11	0.22	0.34	U
Dia3	3	1.01 0.12	0.23	0.35	U
Dia4	3	0.96 0.07	0.18	0.29	U

EXPRESIÓN DE GA20-oxidasa en Redland B2

Dia0, Dia2, Dia3, Dia4

Tabla de análisis de varianza

Source	Sum of	Mean	Prob	Power	Level	(Alpha=0.05)
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio		
A	3	1.03348	0.3444935	149.26	0.000000*	1.000000
S(A)	8	1.846358E-02	2.307948E-03			
Total (Adjusted)	11		1.051944			
Total			12			

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Error	Standard Effect
All	12	1.723651	1.723651	
A:				
Dia0	3	1.920123	2.773655E-02	0.1964718
Dia2	3	1.854357	2.773655E-02	0.1307054
Dia3	3	1.903054	2.773655E-02	0.1794026
Dia4	3	1.217072	2.773655E-02	-0.5065798

Dunnett's Simultaneous Confidence Intervals for Treatment vs. Control

Response: Dia0, Dia2, Dia3, Dia4

Term A:

Control: Dia0

$\alpha=0.050$ Error Term=S(A) DF=8 MSE=2.307948E-03 Critical Value=2.8797

Tratamiento	Grupo	Count	Mean	Lower 95.0% Simult.C.I.	Difference With Control	Upper 95.0% Simult.C.I.	Test Result
	Dia2	3	1.85	-0.18	-0.07	0.05	
	Dia3	3	1.90	-0.13	-0.02	0.10	
	Dia4	3	1.22	-0.82	-0.70	-0.59	L

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "**Expresión de los genes *Sbvp1* y *SbGA20-oxidasa* en las líneas de sorgo Redland B2 e IS9530**" con fecha

PRESIDENTE

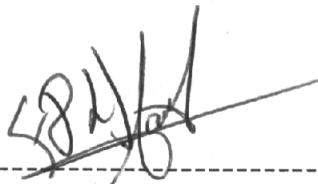


Dr. Francisco José Fernández Perrino

SECRETARIO

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

VOCAL



M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez