



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EXPRESIÓN GÉNICA DEL COMPLEJO
MOLECULAR LECTINA (CCL)-
β-GLUCOSIDASA EN MAÍZ**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Esther Adriana Ceniceros Ojeda

La Paz, B.C.S. Julio de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del 19 de junio del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

EXPRESIÓN GÉNICA DEL COMPLEJO MOLECULAR LECTINA (CCL)- β -GLUCOSIDASA EN MAÍZ

Presentada por la alumna:

ESTHER ADRIANA CENICEROS OJEDA

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGIA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Dra. GRACIA A. GÓMEZ ANDURO
DIRECTOR DE TESIS



Dr. AXEL TIESSEN FAVIER
CO-TUTOR



Dr. BERNARDO MURILLO AMADOR
CO-TUTOR



Dra. ELISA SERVIERE ZARAGOZA
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez† Director de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro. Directora de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Axel Tiessen Favier Co-Tutor	Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados-IPN Campus Irapuato
Dr. Bernardo Murillo Amador Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

COMITÉ REVISOR

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Directora de tesis

Dr. Axel Tiessen Favier
Co-Tutor

Dr. Bernardo Murillo Amador
Co-Tutor

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Directora de tesis: **Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro**

Co-Tutor: **Dr. Bernardo Murillo Amador**

Suplente: **Dra. Norma Y. Hernández Saavedra**

Suplente: **Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**

RESUMEN

En el 2004, se encontró en coleoptilo de maíz un complejo molecular formado por una lectina (*ccl*) y la enzima β -glucosidasa (*glu1* y *glu2*). Este complejo a causado asombro por su singularidad, ya que la β -glucosidasa por si sola tiene funciones altamente relevantes plantas como es la activación de fitohormonas y de toxinas que le sirven a la planta para defensa contra insectos, y por otro lado, la lectina al hacer un análisis bioinformático, utilizando los 5 peptidos reportados (Molina *et al.* 2004), encontramos que esta conformada por dos dominios funcionales completamente diferentes, un dominio “lectina tipo-Jacalina” y el otro dominio “dirigente” relacionado a enfermedades. Los estudios que existen con respecto a este complejo, es solo a nivel proteico. Por lo que, nosotros, para poder aportar información novedosa que ayude a elucidar la posible función de este complejo molecular, caracterizamos el gen que codifica para la lectina (*ccl*) y cuantificamos la expresión de los genes que codifican para cada uno sus componentes, analizamos regiones reguladoras (promotores transcripcionales), además evaluamos su respuesta en estrés salino y daño mecánico. Dentro de nuestros resultados encontramos una alta correlación en la expresión de los genes *ccl* y *glu2* en los dos estresores probados, mientras que la expresión de *glu1* no es afectada cuando se causa daño mecánico. Además por las diferencias encontradas entre la expresión del gen y la actividad enzimática en estrés salino podemos sugerir que la β -glucosidasa tiene una posible regulación a nivel postraducciona, en respuesta a este estresor.

ABSTRACT

In 2004, it was found a lectin (*ccl*) and enzyme β -glucosidase (*glu1* y *glu2*) molecular complex in maize coleoptiles. This complex has gained great interest, since β -glucosidase plays extremely relevant roles in plants, like the activation of phytohormones and toxins which provide defense mechanisms against insects. On the other hand, when making a bioinformatical analysis for lectin and using the five peptides reported to date (Molina *et al.* 2004), it was found that it is constituted by two totally different functional domains: a 'jacalin-like' lectin domain and a 'dirigent' domain which in turn is associated to a disease condition. To date, the studies of this complex have been mainly focused to protein characterization. For that reason, we have characterized the gene coding for lectin and quantified the expression levels of the genes coding for each of its components as well, in order to generate novel information that assist the elucidation of the putative function of this molecular complex. In addition to that, we analyzed the regulating regions (transcriptional promoters), and evaluated their response to saline stress and mechanical damage. Our results show that the expression of genes *ccl* and *glu2* keep a co-relation in the stressors evaluated, meanwhile the expression of *glu1* is not affected by mechanical damage inflicted to the plant. Differences between β -glucosidase gene expression and enzymatic activity found in saline stress, suggest a possible post-translational regulation in response to this stressor.

Dedicatoria

*Brillantes investigadores que me enseñaron que
la ciencia, es un hermoso pasatiempo...*

*Dr. Félix Córdoba Alva
Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez*

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial, **Dra. Gracia Gómez**, **Dr. Axel Tiessen** y **Dr. Bernardo Murillo** por su paciencia y disposición.

A la **Dra. Norma Hernández Saavedra** por aceptar ser parte de del jurado del examen.

Al **CONACYT** por la beca otorgada.

Al **proyecto SEP-CONACyT** clave: 25996, Estudio del Complejo Molecular Lectina- β -glucosidasa en Germinados de Maíz Sometidos a Estrés Salino.

Al **Laboratorio de Patogénesis Microbiana** dirigido por el **Dr. Felipe Ascencio Valle** y el **Laboratorio de Biología Molecular de Plantas**, por las facilidades para la realización de este trabajo.

A mi **Madre** por todo su cariño, fortaleza, dedicación y por su constante lucha por nuestro bienestar.

A **Lydia** mi hermanita, que es el regalo más grande que pudieron hacerme mis padres.

A toda mi **Familia**: mis tíos, Ofelia, Guadalupe, Cruz, Francisco, José, a mi abuelo Ramón y a José Antonio.

A la **Dra. Gracia A. Gómez Anduro** por haber aceptado el reto de dirigir esta tesis, además por su cariño, por darme la libertad de pensar, de hacer, de equivocarme y ayudarme a levantar, y porque ha tenido más confianza en mí, que yo misma.

A mis compañeros y amigos de la Patobanda: **Esthercita**, **Rosario** (Ros), **Tania** (Tanisha), **Carlos** (Kalin), **Marthita**, **Irasema**, **Norma**, **Masso**, **Gorette** y a mis "hermanitos" los Saladitos, **Diana**, **Mario** y el buen **Julio**, gracias a TODOS ustedes por las asesorías, los consejos y por las tantas horas amenas que pasamos en los desayunitos y las tardes de café.

A **Dianita**, mi gran amiga y compañera, por estar conmigo en las buenas y en las malas, compartimos tristezas, pero también muchos momentos muy agradables y divertidos (mas con sus dianadas).

A los técnicos **María de Jesús Romero Geraldo** (chula) y a **Julio A. Hernández González** (julito) por su compañía y por su invaluable ayuda.

A **Yssel**, por su amistad, cariño y por compartir conmigo, lo bueno que es vivir...

A mis queridas amigas **Esmeralda Beltran** (Esme) y **Mayela Ornelas** (Maye) (Lab. Metabolomica de Plantas, CINVESTAV), que con su buen sentido del humor y hospitalidad me hicieron disfrutar mas mis estancias allí. Y a **Crystabel López** (Cryss, mi veranita) por su grata compañía, y locuras que hacían el trabajo más divertido, y su ayuda en la parte experimental.

A la **Dra. Jimena Carrillo** (Lab. de Virología, CINVESTAV), por su tiempo, paciencia y consejos.

MUCHAS GRACIAS...

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Lectinas	3
Lectinas Tipo Jacalina o Lectinas Relacionadas a Jacalina (LRJ)	3
β -Glucosidasa.....	3
Descubrimiento del Complejo Lectina- β -glucosidasa en Maíz	4
Posibles Funciones del Complejo	6
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO.....	8
OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
CCL: Caracterización Bioinformática del gen, ADNc y proteína.....	9
Caracterización de la región reguladora de <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i>	10
Evaluación de la Expresión de los Genes de <i>ccl</i> y β -Glucosidasa Bajo Estrés Salino y Daño Mecánico.....	10
<i>Diseño de Oligonucleótidos (Primers)</i>	10
<i>Ensayos Biológicos</i>	11
<i>Bioensayo Preliminar</i>	11
<i>Estrés Salino</i>	11
<i>Daño Mecánico</i>	12
<i>Evaluación de la Expresión por PCR Semicuantitativo</i>	12
<i>Determinación de la Temperatura Media (Tm) Óptima</i>	13
<i>Determinación del Número de Ciclos Óptimo para el Análisis Semicuantitativo</i>	13
<i>Análisis de PCR Semicuantitativo de las Muestras de los Bioensayos</i>	14
RESULTADOS.....	14
CCL: Caracterización Bioinformática del Gen, ADNc y Proteína	14
Expresión Espacio Temporal de los Genes <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i>	20
Comparación de las Regiones Reguladoras de los Genes <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i>	22
Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Estrés Salino.	23
Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Daño Mecánico al Coleoptilo.....	26
DISCUSIÓN	29

CCL: Caracterización Bioinformática del Gen, ADNc y Proteína	29
Expresión Espacio Temporal de los Genes <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i>	32
Comparación de las Regiones Reguladoras de los Genes <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i>	33
Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Estrés Salino.	33
Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Daño Mecánico al Coleoptilo.....	34
CONCLUSIÓN	36
REFERENCIAS.....	37

Índice de Tablas

Tabla I. Análisis del alineamiento local (BLAST) de <i>ccl</i>	6
Tabla II. Secuencia de aminoácidos de los péptidos de CCL.....	9
Tabla III. Reactivos usados para la síntesis del cADN.....	13
Tabla IV. Reactivos usados para la PCR.	13
Tabla V. Secuencia de los Primers.	14
Tabla VI. Comparación de los posibles promotores encontrados en el análisis de las regiones reguladoras de los genes <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i>	22

Índice de Figuras

Figura 1. Secuencia nucleotídica del gen de CCL.	17
Figura 2. Posible estructura terciaria de CCL. Dominio “dirigente” (izquierda) y dominio Lectina “tipo Jacalina” (derecha).....	18
Figura 3. Dendograma mostrando las relaciones filogenéticas de CCL con proteínas inducidas por jasmonatos.....	19

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Intensidad relativa de los genes <i>ccl</i> , <i>glu1</i> y <i>glu2</i> a diferentes días de germinación y tejidos (T) tallo y (H) hoja.	20
Gráfica 2. Correlación de la expresión especio temporal de los genes <i>ccl</i> y <i>glu1</i>	21
Gráfica 3. Correlación de la expresión especio temporal de los genes <i>ccl</i> y <i>glu2</i>	21
Gráfica 4. Intensidad relativa de la expresión de los genes A) <i>glu1</i> , B) <i>glu2</i> y C) <i>ccl</i> , en respuesta al estrés salino.....	24
Gráfica 5. Correlación de la expresión de los genes <i>ccl</i> y <i>glu1</i> en estrés salino.....	25
Gráfica 6. Correlación de la expresión de los genes <i>ccl</i> y <i>glu2</i> en estrés salino.....	25
Gráfica 7. Actividad específica de la β -glucosidasa en extractos crudos de coleoptilos sometidos a 300 mM de NaCl, a diferentes tiempos..	26
Gráfica 8. Intensidad relativa de la expresión de los genes A) <i>glu1</i> , B) <i>glu2</i> y C) <i>ccl</i> , en respuesta a daño mecánico.....	27
Gráfica 9. Correlación de la expresión de los genes <i>ccl</i> y <i>glu1</i> , en daño mecánico.	28
Gráfica 10. Correlación de la expresión de los genes <i>ccl</i> y <i>glu2</i> , en daño mecánico.	28

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos que no pueden moverse para huir de sus depredadores (animales e insectos herbívoros), además que están expuestas a condiciones climáticas cambiantes (calor, frío, sequía, alta concentración de sales en los suelos, etc.) y al ataque de patógenos (bacterias y hongos). Para sobrevivir a tan diversos factores, las plantas, han evolucionado al grado de considerarse como “fabricas bioquímicas” por excelencia. Lo anterior, debido a su capacidad de sintetizar centenares de compuestos diferentes para protegerse, como toxinas, osmolitos, fitohormonas y compuestos antimicrobianos. Estos compuestos son generados y almacenados en compartimentos específicos de las células. La manera de almacenarlos es en su forma no reactiva, es decir, la planta los sintetiza, los inactiva y los guarda. Una forma de inactivar esos compuestos es a través de la glicosilación, que se lleva a cabo por medio del grupo de enzimas glicosiltransferasas, las cuales agregan una unidad de glucosa a la molécula haciéndola más soluble, para que el compuesto se pueda transportar y acumular en los subcompartimentos celulares específicos. El enlace glicosídico estabiliza la estructura de la molécula en su forma no reactiva (Jones P. y Vogt T., 2001).

Cuando la planta es sometida a estrés, para sobrevivir, necesita generar una respuesta inmediata por lo que utiliza los compuestos que almacenó en forma inactiva o menos reactiva, activándolos por medio de la enzima **β -glucosidasa** (β -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21). Esta enzima hidroliza el enlace β - glicosídico entre la glucosa y el compuesto (Esen A. y Blanchard D., 2000; Blanchard *et al.* 2001).

En el maíz, la β -glucosidasa se encuentra asociada de forma específica (unida como antígeno - anticuerpo, por enlace no covalente) a una **lectina quimérica** denominada CCL (del inglés; Corn Coleptile Lectin: lectina de coleoptilo de maíz) por Molina y colaboradores en 2004. Esta lectina cuenta con dos dominios funcionales diferentes, uno de **lectina tipo jacalina** y el otro **dirigente**, relacionado a enfermedades, y se ha observado que este tipo de lectinas quiméricas están presentes únicamente en los cereales, en donde se ha visto que se inducen por ataque de insectos, salinidad, sequía e infecciones por hongos

(Gorlach *et al.* 1996; Williams *et al.* 2000; Lee *et al.* 1996; Li *et al.* 2005; Wang y Ma, 2005).

Lo anterior toma gran relevancia, pues se creía que la expresión de lectinas era constitutiva y no inducible, lo que da un nuevo enfoque a la regulación génica de las mismas. Ante esto, surgen algunas preguntas como, ¿CCL es una lectina “clásica” o “no clásica”? ¿Qué ventajas le confiere al maíz la formación del complejo molecular CCL- β -glucosidasa? ¿Los genes que codifican para CCL y la β -glucosidasa, estarán regulados de forma similar? ¿Se expresan cumpliendo una proporción estequiométrica? Preguntas a las cuales se pretende aportar información en éste trabajo, para contribuir a dilucidarlas.

ANTECEDENTES

Lectinas

Las lectinas (latín *legere*; sig. **seleccionar o elegir**) son un grupo de proteínas de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas (Sharon y Lis, 2004). Las lectinas se pueden clasificar según su estructura tridimensional en: lectinas leguminosas, lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina, lectinas de monocotiledóneas manosa específicas, lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas, lectinas tipo amaranto y **lectinas tipo jacalina** (Van Damme *et al.* 1998).

Lectinas Tipo Jacalina o Lectinas Relacionadas a Jacalina (LRJ)

En la actualidad, este término se utiliza para referirse a todas las lectinas que son estructuralmente relacionadas a la lectina **Jacalina** de *Artocarpus integrifolia* (“jack fruit”). El grupo de las LRJs se divide en dos subgrupos que difieren en su especificidad por los carbohidratos: el primer subgrupo es **galactosa** específica (LRJg) y el segundo es **manosa** específica (LRJm). Otra principal diferencia entre LRJg y LRJm es su biosíntesis y procesamiento. Por ejemplo, las LRJg sufren modificaciones pos-traduccionales de una cadena polipeptídica precursora, se forma una cadena pesada α y una cadena ligera β . En contraste, las LRJm no sufren modificaciones pos-traduccionales (Van Damme *et al.* 1998).

β -Glucosidasa

La enzima β -glucosidasa (β -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) cataliza la hidrólisis de aril y alquil β -D-glucósidos y se encuentra en los tres dominios de los organismos vivos (Eukarya, Archaea y Bacteria). Esta enzima se involucra en varias funciones importantes en las plantas, por ejemplo en el metabolismo del ácido abscísico (ABA), en la hidrólisis del conjugados de giberelinas, en la conversión de citoquininas inactivas a formas activas, en el metabolismo del estrés y en la resistencia de algunos fitopatógenos y herbívoros (Esen y Blanchard, 2000).

En maíz (*Zea mays L.*) la β -glucosidasa se localiza en los plastidios de la célula (Esen y Stetler, 1993) y se encuentra abundantemente en las partes jóvenes de la planta, como por ejemplo en coleóptilo, raíces, mesócotilo, nódulos, hojas primordiales, óvulos, etc. El maíz contiene dos isozimas de la β -glucosidasa Glu1 y Glu2. La Glu1 es codificada por el locus *Glu1* en el cromosoma 10 y muestra múltiples alelos (polimorfismo). El polimorfismo del locus *Glu1* (> 30 alelos) supera por mucho el de otros locus de enzimas estudiadas en maíz o en otros organismos (Goodman y Stuber, 1983). El cDNA y la región genómica correspondiente al gen *glu1* ya han sido secuenciadas (Brzobohaty *et al.* 1993; GenBank num. de acceso U44773). Estos datos muestran que el gen *glu1* tiene un tamaño de 5kb y está conformado por 12 exones y 11 intrones. La Glu2 muestra el 90 % de la secuencia idéntica a la codificada por *glu1* (Brzobohaty *et al.* 1993). El gen *glu2* es expresado en niveles bajos y solo en hojas iniciando 6 días después de la germinación (Esen y Blanchard, 2000) y este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 2.

Descubrimiento del Complejo Lectina- β -glucosidasa en Maíz

Esen y Blanchard (2000) trabajando con maíz *cultivar K55*, que después denominaron como *fenotipo "nulo"*, encontraron a la enzima β -glucosidasa formando parte de un complejo proteico de > 16000kDa, al aislar los componentes, observaron que una proteína de 32 kDa era aparentemente la responsable de la agregación de la enzima, por lo cual, a esta proteína la denominaron como Factor de Agregación de la β -Glucosidasa (BGAF). Por otro lado, Molina y colaboradores en el 2004, trabajando con maíz *fenotipo silvestre* encontraron actividad β -glucosidasa en un complejo molecular de 80 kDa. Al disociar este complejo se observaron 2 bandas, la banda correspondiente a 60kDa tenía actividad β -glucosidasa y la segunda correspondía a una molécula de 30 kDa. Al hacer ensayos de hemaglutinación, se observó que este complejo molecular tenía la capacidad de aglutinar eritrocitos, y sabiendo que la molécula de 60kDa era la β -glucosidasa, le atribuyeron esta actividad de lectina (galactosa específica), a la molécula de 30kDa, la cual denominaron como CCL (del inglés, Corn Coleoptile Lectin; Lectina de Coleoptilo de Maíz) (Molina *et al.* 2004). Un análisis bioinformático de los péptidos secuenciados de la proteína pura de CCL, mostró una alta similitud con BGAF y se observó que ambas

proteínas estaban compuestas por dos dominios funcionales diferentes, un dominio Lectina tipo jacalina y un dominio dirigente relacionado con respuesta a enfermedades. Además, el análisis mostró que existe similitud con otras proteínas que son expresadas en respuesta al ataque por patógenos (Tabla I). Por ejemplo, la expresión del gen *Wci-1*, fue inducida mediante el tratamiento con benzotiadiazol, el cual induce resistencia sistémica adquirida. Su expresión se correlacionó con la resistencia al ataque por hongos (Gorlach *et al.* 1996). Otros ejemplos son la expresión del gen *Hfr-1* del trigo, el cual se indujo por la infestación con larvas de la mosquita blanca, sugiriendo que el producto de este gen juega un papel en la defensa de la planta (Williams *et al.* 2000). En cebada, dos genes similares se indujeron por ácido jasmónico, el cual se sabe que induce la activación transcripcional de genes de defensa de las plantas (en respuesta a heridas y al ataque de patógenos) (Lee *et al.* 1996). En plantas de *Agrostis stolonifera*, el gen *Crs-1* también fue inducible y se expresó a altos niveles en muestras de campo después de la inoculación con el hongo patógeno *Sclerotinia homoeocarpa* (Li *et al.* 2005). En trigo, la proteína JRP-32 también es inducida por ácido jasmónico, sugiriendo un posible papel en respuesta al estrés (Wang y Ma, 2005).

Una proteína inducida por estrés salino, desecación y fito-hormonas (ácido jasmónico y ácido abscísico), se identificó en arroz (*Oryza sativa*) desde hace 15 años (Claes *et al.* 1990) y se demostró que es una lectina inducible por sal (SalT). Esta lectina consiste de dos subunidades idénticas de 15kDa asociadas no covalentemente, que presentan alta similitud en secuencia con lectinas “clásicas” de plantas pertenecientes a la familia de lectinas relacionadas a jacalina. A pesar de esta similitud, la lectina de arroz, SalT, difiere fundamentalmente de las lectinas clásicas en la regulación de su expresión ya que ésta no es constitutiva sino que se induce en condiciones de estrés salino (Zhang *et al.* 2000; de Souza Filho *et al.* 2003). La proteína SalT de 15kDa presenta considerable homología con la mitad carboxilo de las proteínas BGAF, WCI-1, Hfr-1, Crs-1, JRP-32 (todas de aproximadamente 30 kDa), es decir, con el dominio carboxilo de lectinas.

Tabla I. Análisis del alineamiento local (BLAST) de *ccl*.

GEN	ORGANISMO	INDUCIDO POR	LECTINA	REFERENCIA
<i>ccl</i>	<i>Zea mays</i> Cultivar desconocido	¿Salinidad? ¿Daño Mecánico? Datos a analizar en este estudio	SI	Molina <i>et al.</i> (2004)
<i>bgaf</i>	<i>Zea mays</i> Cultivar K55	No Determinado	SI	Kittur <i>et al.</i> (2007)
<i>crs-1</i>	<i>Agrostis stolonifera</i>	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	ND	Li <i>et al.</i> (2005)
<i>hfr-1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Mayetiola destructor</i> (mosquito del trigo)	SI	Williams <i>et al.</i> (2000)
<i>wci-1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Hongos	ND	Gorlach <i>et al.</i> (1996)
<i>ta-ja1</i>	<i>Triticum aestivum L</i>	Ácido jasmónico	ND	Wang y Ma., (2005)
<i>salt</i>	<i>Oryza sativa</i> , Var. <i>Indica</i>	Salinidad	SI	de Souza Filho <i>et al.</i> (2003)

Posibles Funciones del Complejo

En maíz, la β -glucosidasa hidroliza glucósidos de ácido hidroxámico, liberando agliconas, las cuales son tóxicas para algunos insectos. La BGAF se une a β -glucosidasa pero no afecta su actividad enzimática. Esta unión podría servir para proteger a la β -glucosidasa de la degradación proteolítica (Blanchard *et al.* 2001). Los análisis de secuencia y modelación de estructura de todas estas proteínas relacionadas a CCL (BGAF, WCI-1, HFR-1, CRS-1, JRP-32) indican que se tratan de lectinas quiméricas o “quimerolectinas” que contienen dos regiones con funciones potenciales, un dominio N-terminal de respuesta a enfermedades, fusionado a un dominio carboxilo de lectinas relacionadas a jacalina. Esta pequeña familia de proteínas pudo haber evolucionado a partir de lectinas relacionadas a jacalina, mediante la inclusión de un dominio de respuesta a enfermedades para ampliar la funcionalidad de estas proteínas.

Nagano *et al.* (2005) trabajando con *Arabidopsis thaliana* encontraron una mutante que no producía cuerpos del retículo endoplásmico (ER-body), estos cuerpos son inducidos por heridas y con metil jasmonato, y pueden ser responsables de la defensa sistémica. La mutante carecía del gen *nail1* (que codifica para un factor de transcripción del tipo Basic-

Helix-Loop-Helix) y mostró que los niveles de dos proteínas PYK10 (β -glucosidasa) y PBP1 (Proteína unida a PYK10 - 1: At3g16420) decrecían. La PYK10 estaba localizada en los cuerpos del ER, mientras que la PBP1 se encontraba distribuida en el citosol. Se encontraron dos formas de la proteína PYK10; una forma activa y una inactiva, la forma activa era insoluble mientras que la forma inactiva era soluble. Esto sugiere que para su activación la PYK10 necesita polimerizarse y la PBP1 puede actuar como una chaperona molecular que facilite la correcta polimerización en los tejidos que son dañados y su estructura subcelular es destruida por patógenos. Todo esto sugiere que posiblemente los dos genes PYK10 y PBP1, estén regulados de forma similar.

Es posible que al igual que el complejo formado por PYK10 y PBP1 en *Arabidopsis*, el complejo de la β -glucosidasa y CCL encontrado en maíz sea también inducido por estrés, es decir, la formación de este pudiera estar involucrado directamente en la respuesta de la planta al estrés, además, los datos obtenidos por Nagano y colaboradores (2005) sugieren que la expresión de estos genes es regulada por los mismos factores de transcripción, por lo que es posible que ésta guarde una proporción estequiométrica.

HIPÓTESIS

Los genes *ccl* y *glu1* son inducidos por estrés salino y/o daño mecánico y la expresión de ambos genes guarda una proporción estequiométrica.

OBJETIVO

Cuantificar la expresión génica del complejo molecular Lectina (CCL) – β -glucosidasa en coleoptilos de maíz en respuesta a estrés salino y daño mecánico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el gen que codifica para CCL de maíz cultivar B73.
2. Realizar un análisis bioinformático de la región reguladora de los genes que codifican para CCL y β -glucosidasa.
3. Analizar la co-expresión de CCL y β -glucosidasa bajo estrés salino.
4. Analizar la co-expresión de CCL y β -glucosidasa después de dañar mecánicamente al coleoptilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

CCL: Caracterización Bioinformática del gen, ADNc y proteína

Para caracterizar el gen de CCL se utilizaron las secuencias de los péptidos de CCL, obtenidos por Molina *et al.* (2004) los cuales se muestran en la tabla II.

Tabla II. Secuencia de aminoácidos de los péptidos de CCL

BANDA 2 (30KDa)	SECUENCIA aminoácidos	OBSERVACIONES
PEPTIDO 25	KFHEQR	NO IDENTIDAD
PEPTIDO 89	VGPWGGSGGSPVDITAEPQR	95% IDENTIDAD CON PROMOTOR BGAF
PEPTIDO 96	SAFTEWNEK	90% IDENTIDAD PEPTIDO SEÑAL BGAF
PEPTIDO 119 (A)	TYGPFGA	100% IDENTIDAD CON LA PROTEINA MADURA BGAF
PEPTIDO 119 (B)	FEGLYLFHTPLGSGAN	81% IDENTIDAD CON LA PROTEINA MADURA BGAF

Para identificar y caracterizar el gen de CCL, se realizó un análisis bioinformático en la base de datos, **DFCI Maize Gene Index** (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=maize>), gracias a las facilidades proporcionadas por el Dr. Axel Tiessen Favier, en el Laboratorio de Bioquímica y Metabolómica de Plantas, en el CINVESTAV-IPN, campus Guanajuato. Para seleccionar el marco de lectura abierto que da origen a la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína de CCL, se utilizó el software **CLC Main Workbench** (<http://www.clcbio.com/index.php?id=92>). La confirmación de la identidad de la secuencia de los péptidos publicados por Molina (Molina *et al.* 2004) y la secuencia deducida de aminoácidos obtenida en éste trabajo, se realizó mediante una alineación utilizando el programa **tcoffee** (<http://www.tcoffee.org/>). La obtención de la secuencia nucleotídica completa de CCL se realizó mediante el alineamiento local de esta con las secuencias encontradas en la base de datos **The Maize Genome Browser** (<http://www.maizesequence.org/index.html>).

Se alineo la secuencia del cADN de CCL contra la genómica usando el programa **SIM4** (<http://www.bioinfo.org.cn/relative/SIM4>) para localizar los intrones.

De la secuencia de aminoácidos de CCL, se obtuvo la estructura secundaria y terciaria de la proteína, utilizando los programas **JPRED3** (www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/), **ESyPred3D** (www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/) y **CPHmodels 2.0 Server**, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>). La identificación de los posibles dominios se realizó con **NCBI Conserved Domains** (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), la predicción de regiones hidrofóbicas, mediante el programa **ProtScale** (www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl), la exploración del péptido señal con el programa **SignalP 3.0** (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) y los sitios de glicosilación se buscaron utilizando el programa **NetOGlyc 3.1** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

Caracterización de la región reguladora de *ccl*, *glu1* y *glu2*

Para la caracterización bioinformática de las regiones reguladoras se analizaron 1000 nucleótidos (nt) corriente abajo del gen de *ccl*, 1000 nt de *glu1* y 1000 nt del gen *glu2*. La región reguladora se analizó con los siguientes softwares:

Promoter Scan (<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) predice regiones promotoras basado en la homología de las regiones promotoras de la polimerasa II (eucariota).

Tfsitescan (<http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>) predice posibles sitios de unión de factores de transcripción.

PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) Busca elementos *CIS*, previamente reportados en plantas.

Evaluación de la Expresión de los Genes de *ccl* y β -Glucosidasa Bajo Estrés Salino y Daño Mecánico

Diseño de Oligonucleótidos (Primers)

Para realizar las evaluaciones de la expresión de genes, se diseñaron primers específicos para *ccl*, β -glucosidasa y *ubiquitina* como gen constitutivo. El diseño de *glu1*,

glu2 y *ubi*, se realizó en base a las secuencias disponibles en GenBank ([NM_001111984](#), [U44087](#), [S94464](#), respectivamente). Los primers para *ccl* se diseñaron en base a una alineación entre el cADN encontrado con mayor similitud a *ccl* contra la secuencia genómica del maíz B73. Para el diseño de los primers se utilizaron los programas **Blast-Primer** ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi? LINKLOC=Blast Home](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINKLOC=Blast+Home)), **DNA calculador** (www.sigma-geosys.com/calc/DNACalc.asp) y **PRIMER3** (frodo.wi.mit.edu/).

Ensayos Biológicos

Para cada uno de los bioensayos, se seleccionaron visualmente (por estructura y tamaño) 200 semillas de maíz cultivar B73, las cuales se incubaron con una solución al 10% de cloro comercial (Cloralex) por 5 min. Al finalizar la incubación, se procedió a eliminar el exceso de cloro, enjuagando 3 veces con 50ml de agua destilada. Las semillas se mantuvieron en incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Bioensayo Preliminar

Para determinar el día de la aplicación de los dos bioensayos, se evaluó previamente la respuesta de la expresión de los genes a diferentes tiempos de germinación; para ello se muestrearon coleoptilo y raíces a los 3, 4, 5, 6, 7 y 10 días, congelando inmediatamente los tejidos con nitrógeno líquido, para posteriormente almacenarlos a -80°C . Se extrajo ARN total con TRIzol Reagent (siguiendo las recomendaciones del proveedor, Invitrogen) y se trató con DNasa I (Invitrogen). La síntesis de cADN se realizó utilizando 5 μg de ARN, oligo dT (*Sigma*) y la enzima Superscript II (Invitrogen).

Posteriormente se realizó una mezcla de cADN para la estandarización del PCR semicuantitativo, obteniendo con ello el número de ciclos y la temperatura (T_m) óptimos para hacer la evaluación simultánea.

Estrés Salino

A los cinco días después de la emergencia, se les añadió 200 ml de una solución salina con una concentración de 300 mM de NaCl y se muestrearon 5 coleoptilos por

duplicado, a las 0, ½, 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Los tejidos se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C.

Daño Mecánico

A las plántulas con cinco días de emergidas, se les hicieron tres cortes alrededor del coleoptilo, para simular el estrés biótico producido por *Ostrinia nubilalis*, tomando cinco coleoptilos por duplicado a las 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Los tejidos se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C.

Evaluación de la Expresión por PCR Semicuantitativo

Las muestras de coleoptilo se maceraron con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, tomándose 100 µg de coleoptilo pulverizado y se extrajo el ARN utilizando TRIzol (Invitrogen) mediante las recomendaciones del proveedor. La integridad del ARN se verificó por electroforesis en geles de agarosa formaldehído al 1%. Para evitar contaminación por ADN genómico, se trataron todas las extracciones de ARN con DNasa I (Invitrogen) y se sintetizó el cADN utilizando la transcriptasa reversa IMPROM (Promega) y oligo dT. La reacción de cADN, se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, utilizando 5 µg de ARN total, los reactivos utilizados se encuentran en la tabla III, se incubó el ARN con el oligo dT a 70°C/5min, al finalizar esta incubación se le agregó el resto de los reactivos. Para alineamiento de los primers se incubó a 25°C/10min, extensión 45°C/60min y 70°C/15min para inactivación de la enzima, se almacenó a -20°C. La calidad del cADN fue verificada por PCR utilizando los primers específicos para ubiquitina de maíz, ver reactivos y el volumen usado en la tabla IV. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial 94°C/ 3min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30s, 61°C/30s, 72°C/30s, para terminar con una extensión final 72°C/5min. Las muestras se guardaron a 4°C hasta su uso.

Determinación de la Temperatura Media (T_m) Óptima

Para la determinación de la T_m óptima para los cuatro juegos de primers, se tomó un pool de cADN y se hizo una PCR de gradiente de temperatura, usando los reactivos y

los volúmenes de la tabla IV, utilizando los primers (Tabla V) y las condiciones, desnaturalización inicial 94° C/3 min, seguido de 30 ciclos de 94° C/1.0 min, **55, 57, 59, 61 y 63° C/1.0 min**, 72° C/1.0 min, para terminar con una extensión final de 72° C/5 min. Se cargaron 9.0 µl de la reacción a un gel al 1.5 % de agarosa y se corrió a 70 V/60 min.

Tabla III. Reactivos usados para la síntesis del cADN.

Reactivos	Concentración	Volumen
Agua DEPC		Aforar a 20µl
Buffer Para Improm II	5X	4.0µl
MgCl ₂	25mM	2.4µl
dNTPs	10mM	1.0µl
RNAsin	40U/µl	0.5µl
IMPROM II		1.0µl
ARN total	5µg	
Primer oligo dT	20mM	1.0µl
Volumen Final		20 µl

Tabla IV. Reactivos usados para la PCR.

Reactivos	Concentración	Volumen
Agua MilliQ		5.4µl
Buffer Taq	10X	1 µl
MgCl ₂	50mM	0.6 µl
dNTPs	2.5mM	0.52 µl
Primer Fw	10mM	0.8 µl
Primer Rv	10mM	0.8 µl
Taq polimerasa (Invitrogen)	5U/µl	0.08 µl
cADN		0.8 µl
Volumen Final		10 µl

Determinación del Número de Ciclos Óptimo para el Análisis Semicuantitativo

Para determinar el ciclo óptimo, se tomo un pool de cADN y se hizo una PCR usando los reactivos y los volúmenes de la tabla IV, utilizando los primers de la tabla V, y las condiciones: desnaturalización inicial 94°C/ 3min, seguido de **20, 22, 24, 26, 28 y 30 ciclos** de 94°C/1.0min, 59°C/1.0min, 72°C/30s, para terminar con una extensión final 72°C/5min. Se cargaron 9.0µl de la reacción a un gel al 1.5% de agarosa y se corrió a 70V/60min.

Tabla V. Secuencia de los Primers.

Nombre	Gen	Secuencia	Tamaño del Fragmento Amplificado
ZmUBIF2	UBIQUITINA NM_001111984	CACCCTTCACCTTGTTCTTCC	88pb
ZmUBIR1		CCTCCAGGGTTATGGTTTTTCC	
ZmCCLF4	Obtenido en éste estudio	ATCTCCAAGAAGTTCCATGAGC	156pb
ZmCCLR4		CTCTGCCGTGATGTCCAC	
Bglu1F	B-GLUCOSIDASA1 U44087	TTAGGAGCCACCTAGTAG	192pb
Bglu1R		CGTGTAGTAAAGCTAAGGTTAC	
ZmGLU2F3	B-GLUCOSIDASA2 S94464	TACTGCCTAAGGGAACGGTC	149pb
ZmGLU2R3		TTCTCTTCTTAGTGCTTGAGGG	

Análisis de PCR Semicuantitativo de las Muestras de los Bioensayos

Para el PCR Semicuantitativo se utilizaron los reactivos y volúmenes de la tabla IV y los primers (tabla V) con las condiciones: desnaturalización inicial 94°C/ 3min, seguido de 27 ciclos de 94°C/1.0min, 59°C/1.0min, 72°C/30s, y una extensión final 72°C/5min. Se cargaron 9.0µl de la reacción y se corrió en un gel al 1.5% de agarosa, 70V/60min. La imagen del gel fue analizada utilizando el software GelPro Analyzer (Media Cybernetics).

RESULTADOS

CCL: Caracterización Bioinformática del Gen, ADNc y Proteína

Para la obtención de la secuencia del ADNc y del gen de *ccl*, se utilizaron los péptidos de CCL publicados por Molina y colaboradores en 2004. Actualmente se pueden utilizar varias estrategias para obtener la secuencia completa de un gen a partir de fragmentos cortos de una proteína o de regiones conservadas. Algunas de estas son: PCR inversa, bibliotecas de cDNA, bibliotecas genómicas, 3'– 5' RACE (**R**apid **A**mplification **c**DNA **E**nds), entre otras. Pero todos los procedimientos anteriores requieren de un trabajo experimental considerable, por lo tanto, se decidió entonces buscar los péptidos para ver si los genes estaban públicamente disponibles en las diversas bases de datos de los proyectos de maíz en Estados Unidos. Para ello se realizó una búsqueda bioinformática en la base de datos, *DFCI Maize Gene Index*, donde se encontró la secuencia BT041020 que mostro

94.9% de identidad con los péptidos de CCL. Al comparar ésta secuencia contra la base de datos: “*The Maize Genome Browser*”, se logró ubicar dentro del cromosoma 7, mas específicamente en la clona AC202163.3-Contig16, que tiene un tamaño de 65,284pb.

Para la caracterización del ADNc, se realizó un alineamiento codón por codón entre la secuencia genómica y BT041020 y se ubicó el ADNc completo, dentro de la secuencia genómica (marcado en letras mayúsculas en la figura 1). El codón de inicio se encontró en la posición 37,212pb y el codón de parada en la posición 38,489pb. Con este análisis se obtuvo la secuencia nucleotídica de *ccl*, así como 37,211pb río arriba y 26,795pb río abajo del gen.

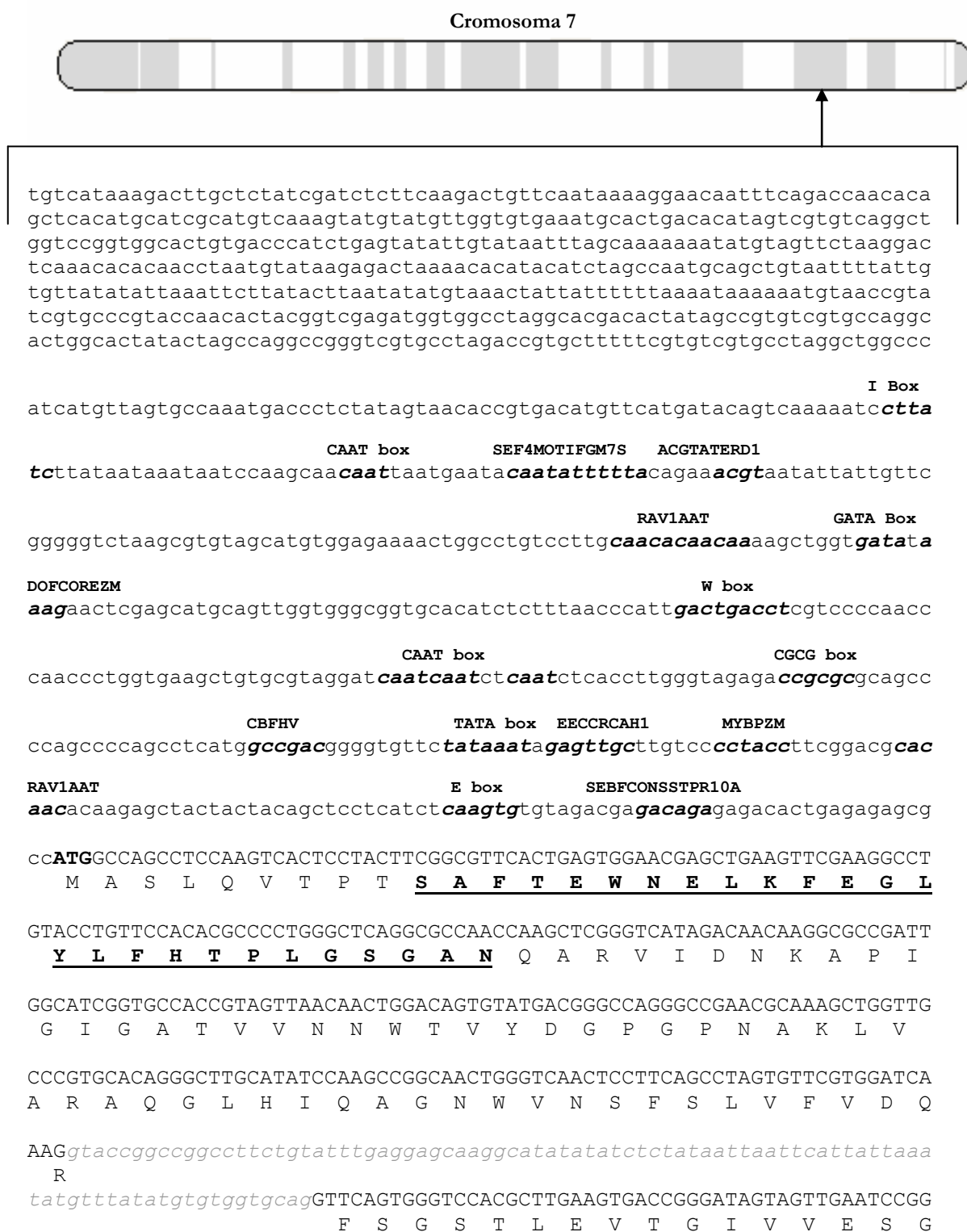
La región codificante de *ccl* consiste de 921 nucleótidos, compuesto de 4 exones de 281, 190, 201 y 249 pb, que codifican para una proteína de 306 aminoácidos, masa molecular de 31.96 kDa y se predice un punto isoeléctrico de 5.58. El porcentaje de G y C en las regiones de exón fueron de 58, 53.1, 65.7 y 63 %, lo cual corresponde a secuencias con potencial de ser codificantes.

El análisis de la secuencia genómica constó de la búsqueda de elementos *cis* (región promotora) y *trans* (sitios de unión de factores de transcripción) dentro de la misma. Dentro de los elementos *cis* se identificaron la región promotora (caja TATA) de *ccl*, las cajas CGCG, CAAT y GATA, analizando 1000 pb río arriba de la secuencia (ver tabla IV).

La secuencia del ADNc de *ccl* en el genoma, no es una secuencia continua, está interrumpida por 3 intrones de 89pb, 183pb y 86pb (representados en minúsculas y cursivas en la figura 1), localizados en la posiciones +282, +561 y +945, respectivamente, tomando como 1 a la adenina del codón de inicio. Los intrones I y II presentan una secuencia pobre de GC, teniendo porcentajes de 30 y 16.9 %, respectivamente.

Para la caracterización de la proteína de CCL, se tradujo la secuencia de ADNc, producto del análisis bioinformático de la secuencia genómica. Se logró localizar los péptidos de CCL, con una similitud del 100 % (Tabla II y Figura 1), lo cual demuestra que la secuencia del gen encontrado, se traducirá en la proteína publicada por Molina y colaboradores en el 2004. Para conocer la estructura terciaria de CCL, se realizó la modelación, utilizando la secuencia deducida de aminoácidos. El modelo (Figura 2)

muestra perfectamente definidos el dominio de lectina “tipo jacalina” y parte del dominio “dirigente”.



GGAGTGGGCTATTGTTGGGGGCACCGGTCAGTTTGCCATGGCAAACGGTGTCATCTTCAAGAAGTTCCAT
E W A I V G G T G Q F A M A N G V I S K **K F H**
GAGCAGAGAAGCGAAGGGAACATCATACTCACCATCCATGCTTCTGTCCGGTGCTCGGACCGAGAA
E Q R S E G N I I Q L T I H A F C P V L G P T

AGgcaagatatagatatagatatagacacaataaaaaactaaatatatacatatacatatacatatgtttc
K

ttataatttttttgagggaggatatgatataatataatataatataatataatataatataatataatataat
atataatataataaagttaccatattcatatgcatatataatgtagCGCTCGGCCGAAAAGTTGGACCGT
R S A A K **V G P**

GGGGTGGGAGCGGCGGGTCTCCGGTGGACATCACGGCAGAGCCCCAGCGTCTGAAGAGCATCACCGTTGC
W G G S G G S P V D I T A E P Q R L K S I T V A

TACTGGCATCGCCGTGACCTCGATTGCCCTTCTCTACGTCGACTCCGCCGGCCAAAACCAATCTGCTGGT
T G I A V T S I A F S Y V D S A G Q T Q S A G

CGCTGGGGCGGTTCCGGTGGAGAACTGAGCCGGTGgtaagtggacacgcacgcaaagtgcattattagta
R W G G S G G E T E P V

tatgctcagctcgcgacggacggactctgaaattcctgcacgccccgcagATCCAGCTCGGCGACTCCG
I Q L G D S

AGGTGCTCACGGAGCTGTCCGGGACGATCGGCAACGTCGACGGCCACACCGTCATAACCTCCATCAAGTT
E V L T E L S G T I G N V D G L T V I T S I K F

CGTCACAAGCCTCAAGACCTACGGCCCTTTCGGAGCATGGGGGACGGGAGTGACACTCCGTTTCGCGATC
V T S L K **T Y G P F G A** W G D G S D T P F T I

CCCGTGCAGCAAGGGAGTGCCATCGTTGGCTTCTTCGCACGAGCTGGGGTCTACCTCGACGCCCTTGGCG
P V Q Q G S A I V G F F A R A G I Y L D A L G

TTTACGTGCGATCCCTGTGAatgagactctcacgagagggggcagctagctgctctgctagctccaccgct
V Y V R S L *

Señal de poliA

ttcatcgcgtcaccctccgttttatattcctactgctacttgtgtgtcttg**aataat**ttcgataaataaa
ggactccgagagattggcacttgaatcgatccataaatgcttgtgtgaattagtgcttcaagttcca
actccattaattgtccattagattacaacactgtgtccaaccgagctatatataatataatataatataat
atatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataat
gcacctgggtgcatttctctatattgaatgcacccaggggtgcaataaacacccccgagcagcctccccataa
gagcacgccct

Figura 1. Secuencia nucleotídica del gen de CCL. En mayúscula se presentan las regiones de exón. En minúsculas y cursivas se encuentran los intrones. En negrita y subrayados se encuentran los péptidos de Molina (2004) y en negrita y cursivas los intrones. El asterisco representa el codón de parada.

Al analizar la estructura terciaria de CCL, se encontró un posible sitio de unión a manosa (residuos Gly¹⁶⁴, Gly²⁸⁷ y Asp²⁹⁷), el cual se encuentra altamente conservado en CCL, BGAF y Ta-JA1. Estos tres aminoácidos están localizados en diferentes posiciones

dentro de la cadena, pero en el plegamiento (estructura terciaria) se encuentran juntos, formando así el posible sitio de unión a manosa (Wang *et al.*, 2005), lo cual sugiere que CCL es una lectina tipo Jacalina con especificidad a manosa, aunque en los análisis de inhibición de la hemaglutinación se encontró que ésta era inhibida fuertemente por galactosa (Molina *et al.* 2004).

Cabe señalar que no fue posible la modelación completa del dominio dirigente, debido a limitaciones de la bioinformática, pues para realizar un modelo completo, se requiere como molde la información de una secuencia cuya estructura esté confirmada por cristalografía. Es decir, en la base de datos de estructuras terciarias de proteínas, no se encuentra ninguna con dominio dirigente. Por otro lado, la modelación del dominio de lectinas se realizó puesto que éstas son un grupo muy estudiado desde hace más de 100 años (Sharon *et al.*, 2004) y se encuentran cerca de 345 estructuras registradas (base de datos PFAM; www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/).

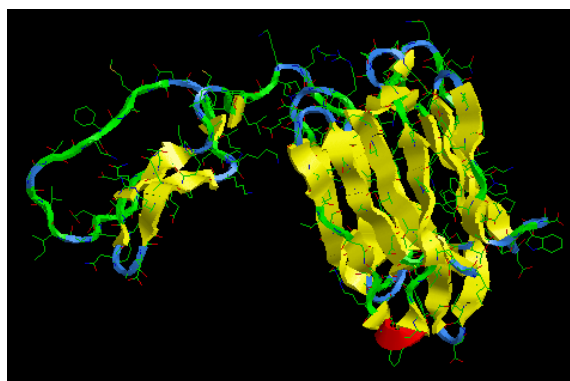


Figura 2. Posible estructura terciaria de CCL. Dominio “dirigente” (izquierda) y dominio Lectina “tipo Jacalina” (derecha).

Para conocer la distribución de CCL en otras especies, se realizó un análisis bioinformático, que mostró que CCL tiene similitud a proteínas inducidas por jasmonatos como lo son: ACG37700.1 jasmonate-induced protein [*Zea mays*], AAR20919.1 jasmonate-induced protein [*Triticum aestivum*], NP_001066367.1 Os12g0198700 jasmonate-induced protein [*Oryza sativa*], AAA87041.1, putative 32.6 kDa jasmonate-induced protein [*Hordeum vulgare*], ACG31498.1, jasmonate-induced protein [*Zea mays*].

De éstas, las cuatro primeras son lectinas quiméricas al igual que CCL, pero lo interesante es que la proteína ACG31498.1 (jasmonate-induced protein) de maíz, tiene un dominio único de lectina tipo jacalina, el cuál tiene una identidad del 96% con el dominio C-terminal de CCL (Figura 3).

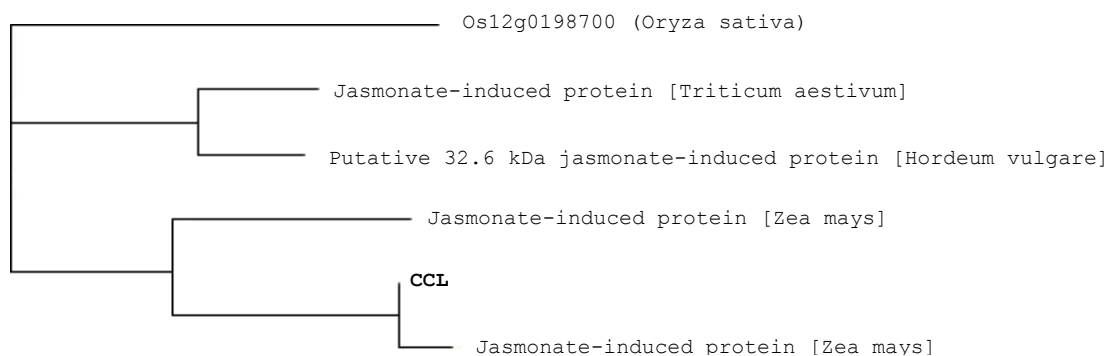


Figura 3. Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas de CCL con proteínas inducidas por jasmonatos.

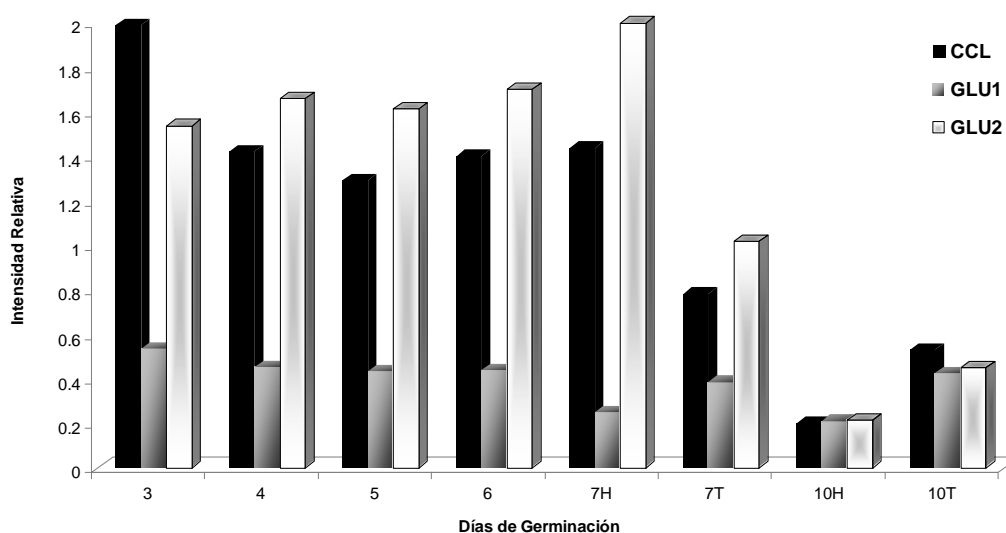
Para tratar de predecir la ubicación de CCL dentro de la célula, se analizó la secuencia aminolítica en el programa PSORT, el cual sugiere con una probabilidad del 74.8%, que CCL está localizada en microcuerpos. Lo anterior también fue descrito por Wang *et al.* (2005), quienes utilizando el mismo programa, indicaron que BGAF, Ta-JA1, Hfr-1 y WCI-1, tienen una alta posibilidad de localizarse en microcuerpos. Sin embargo, recientemente Kittur y colaboradores (2008) mencionan que según el software Signal P, no predice la presencia de algún péptido señal, por lo que indican que la lectina quimérica BGAF es una proteína citosólica.

BGAF y CCL tienen un 93 % de identidad, por lo que, aunque Molina *et al.* (2004) aislaron un complejo molecular entre CCL y GLU1, se han realizado estudios donde se ha observado que BGAF puede unirse específicamente tanto a GLU1 como a GLU2 (Blanchard *et al.* 2001), por lo que existe la posibilidad de que CCL también pueda unirse a GLU2.

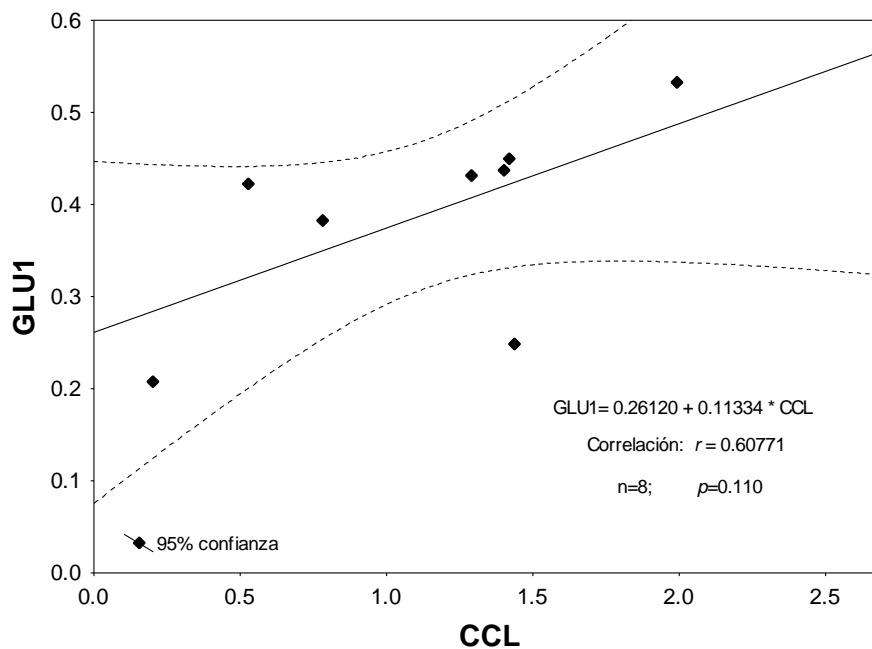
Expresión Espacio Temporal de los Genes *ccl*, *glu1* y *glu2*

Se evaluó la expresión de los genes *ccl*, *glu1* y *glu2*, los días 3, 4, 5, 6, en el coleoptilo y los días 7 y 10 en tallo (t) y hoja (h), encontrándose expresión de los tres genes en todos los días evaluados (Gráfica 1).

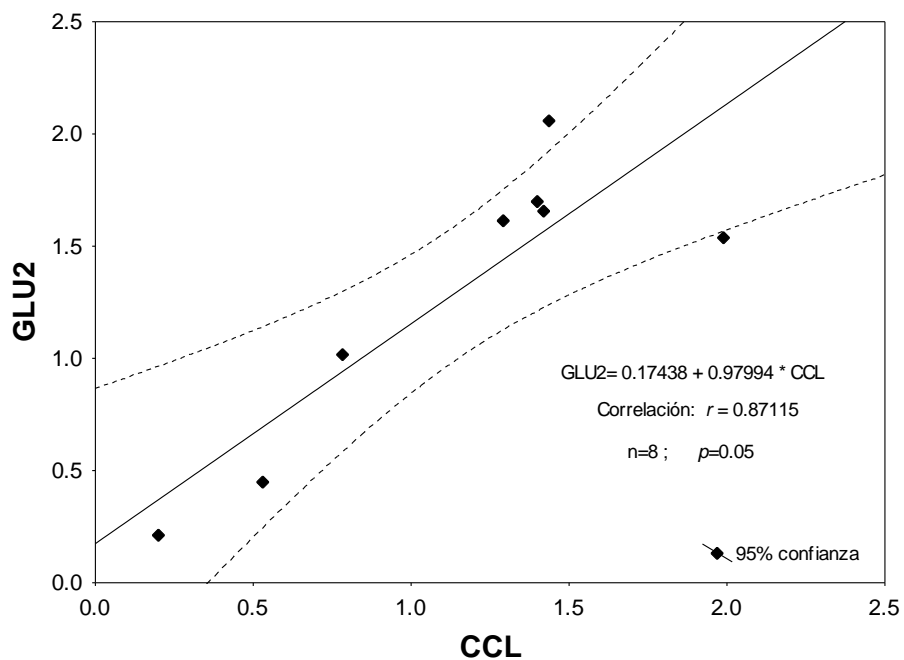
La concentración de transcritos de *ccl* resultó ser más alta en el día 3 de germinación y se redujo 30 % para el día 4, de allí se mantuvo constante los días 5 y 6, pero al analizar la expresión de este gen en hoja y tallo en los días 7 y 10, se observó que en el día 7, hay 84 % más transcritos en hoja que en tallo, a diferencia de lo encontrado en el día 10, donde hubo 62.3 % menos transcritos en hoja que en tallo (Gráfica 1). La expresión de *glu1* se mantiene constante desde el día 3 hasta el día 6 mientras que en el tallo, de los días 7 y 10 (Gráfica 1), observándose que la expresión de este gen disminuye alrededor de un 50 % en hojas en los días 7 y 10. El transcripto que codifica para GLU2 se encuentra presente desde el día 3 (Gráfica 1). Al hacer el análisis de correlación entre *ccl* y *glu1* se obtuvo una *r* igual a **0.6770** (Gráfica 2), mientras que para *ccl* y *glu2* *r* fue igual a **0.87115** (Gráfica 3).



Gráfica 1. Intensidad relativa de los genes *ccl*, *glu1* y *glu2* a diferentes días de germinación y tejidos (T) tallo y (H) hoja.



Gráfica 2. Correlación de la expresión espacio temporal de los genes *ccl* y *glu1*.



Gráfica 3. Correlación de la expresión espacio temporal de los genes *ccl* y *glu2*.

Comparación de las Regiones Reguladoras de los Genes *ccl*, *glu1* y *glu2*

El análisis de las regiones reguladoras de los genes *ccl*, *glu1* y *glu2*, arrojó 14 posibles promotores, de los cuales se describe su función en la tabla VI. Se encontraron 6 sitios de unión a factores de transcripción para la región reguladora de los tres genes, cuatro de ellos están directamente relacionados al estrés.

Tabla VI. Comparación de los posibles promotores encontrados en el análisis de las regiones reguladoras de los genes *ccl*, *glu1* y *glu2*.

Promotor	Función	Gen (número de veces que se encontró ese motivo y posición)		
		<i>ccl</i>	<i>glu1</i>	<i>glu2</i>
TATABOX2	El sitio de unión de las TBP (proteínas de unión a caja TATA), la unión de esta proteína es el primer paso para la formación del aparato de transcripción basal.	1	1	1
MYCCONSUSAT	Sitio encontrado en los promotores de los genes <i>rd22</i> en respuesta a deshidratación y reprime la expresión de los genes CBF a bajas temperaturas (Hartmann <i>et al.</i> 2005)	7 -926, -839, -736 -496, -351, -284 -57	8 -683, -662, -428 -370, -298, -289 -254, -67	4 -635, -605, -500 -58
ARFAT	Factor de respuesta a auxina (Goda <i>et al.</i> 2004)	2 -44, -36	1 -148	1 -476
WRKY7IOS	Sitio de unión de factores de transcripción tipo WRKY, los cuales inducen la expresión de genes en respuesta a ataque por patógenos (Eulgem <i>et al.</i> 1999)	10 -998, -912, -881 -867, -844, -492 -471, -453, -250 -246	7 -851, -819, -797 -783, -572, -558 -386	7 -979, -706, -590 -571, -505, -837 -802
WBOXNTERF3	Sitio de unión del factor NtWRKYs que induce la expresión de genes en respuesta a daño en hojas de tabaco (Nishiuchi <i>et al.</i> 2004)	5 -844, -492, -250 -246, -454	5 -558, -386, -820 -784, -573	6 -979, -706, -590 -571, -505, -837
MYBCORE	Sitio de unión para MYB, estos regulan la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico en <i>Arabidopsis</i> (Urao <i>et al.</i> 1993)	2 -284, -657	3 -662, -562, -468	1 -533
MYCATERD1	Sitio de reconocimiento para el factor MYC y es necesario para la expresión de genes de respuesta temprana a estrés hídrico (Tran <i>et al.</i> 2004)	2 -351, -926	1 -370	-
WBOXNTCHN48	Se ha encontrado en promotores del grupo de genes NtWRKYs, en respuesta a elicitores en tabaco (Yamamoto <i>et al.</i> 2004)	1 -247	1 -387	-
LTRECOREATCOR15	Encontrado en los promotores de los genes <i>cor15a</i> y <i>BN115</i> inducidos en respuesta al frío y sequía (Kim <i>et al.</i> 2002)	1 -141	1 -922	-
MYCATRD22	Sitio de unión de un factor de transcripción del tipo zipper de leucina que induce la expresión de genes en respuesta a estrés hídrico y ácido abscísico (Busk y Pages, 1998)	2 -926, -351	1 -370	-
QELEMENTZMZM13	Elemento potenciador de la expresión de genes en maíz y tomate (Hamilton <i>et al.</i> 1998)	1 -246	-	2 -838, -979
SEBFCONSSTPR10A	Represor transcripcional encontrado en promotores de genes inducidos por patógenos (Boyle y Brisson, 2001)	1 -44	-	1 -477

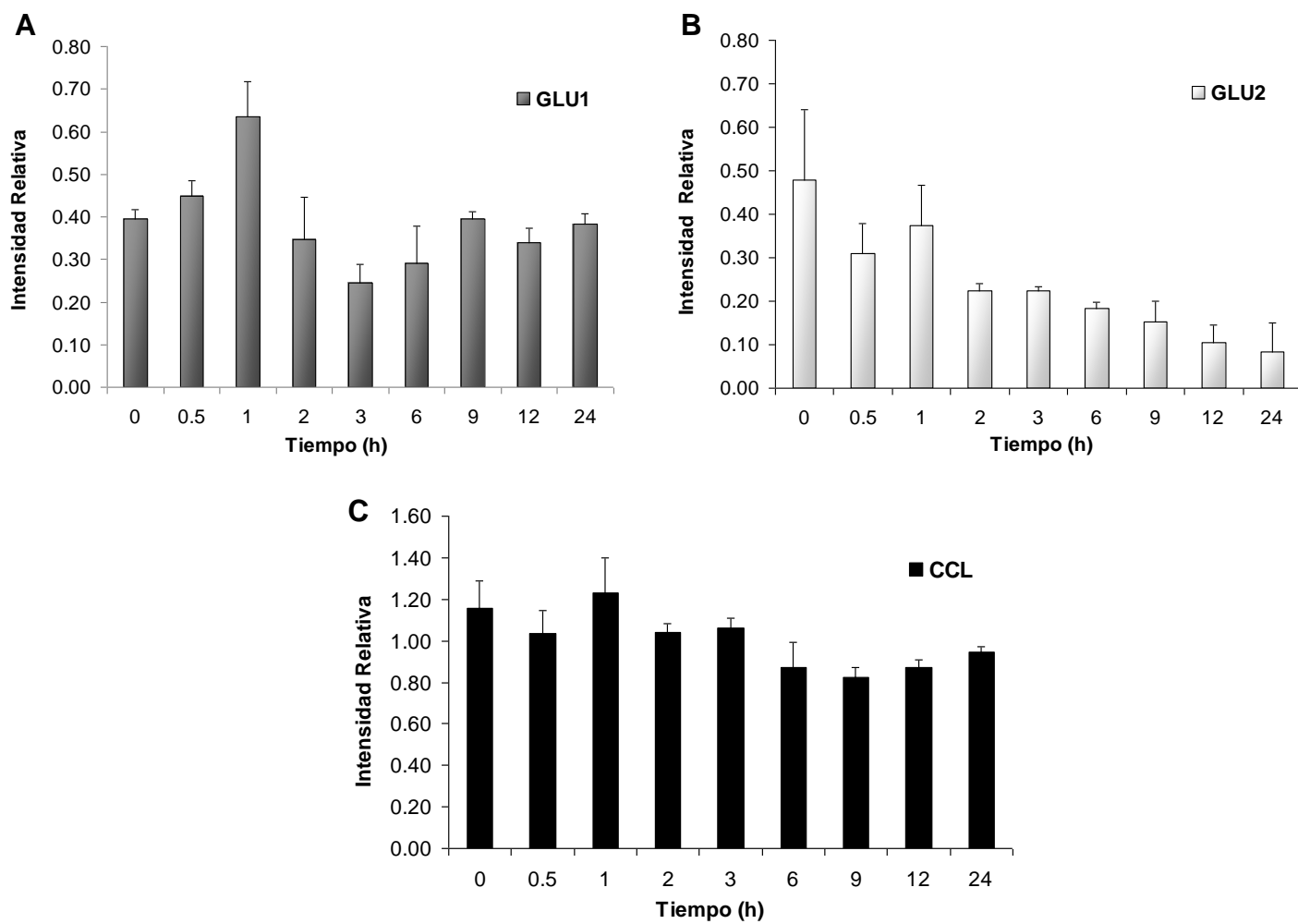
DPBFCOREDCDC3	Se ha encontrado en genes <i>dc3</i> en zanahoria inducidos por ácido abscísico (López-Molina <i>et al.</i> , 2000)	2 -88, -57	-	2 -437, -55
DRECRTCOREAT	Elemento en respuesta a deshidratación (Díaz-Martín <i>et al.</i> , 2005)	1 -142	-	-

Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Estrés Salino.

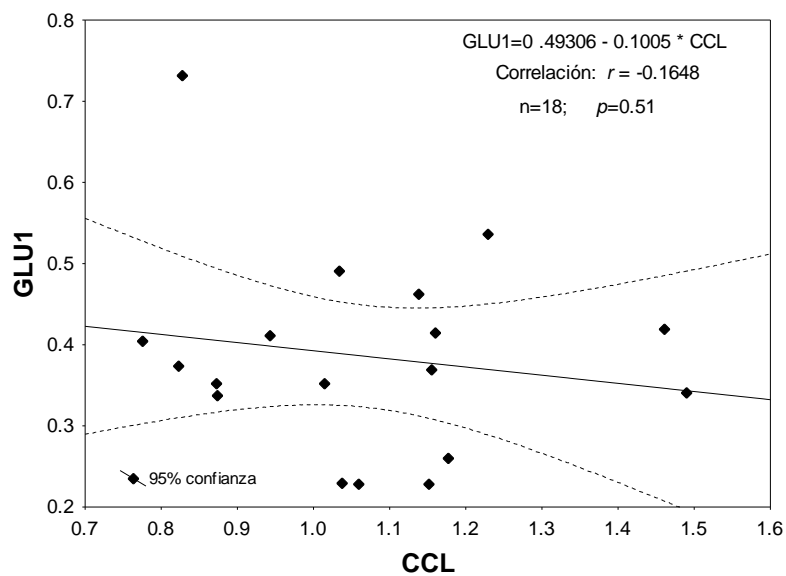
La determinación semicuantitativa de la expresión del gen *ccl* muestra que éste se mantiene constante desde el tiempo 0 hasta las 3 h después de aplicada la solución de 300mM NaCl, teniendo un ligero descenso (24 %) en el número de transcritos de la 6 a 24 h (Gráfica 4C). Este es el primer reporte del perfil de expresión de un gen que codifica para una lectina asociada con la β -glucosidasa en estrés salino.

La expresión de *glu1* aumenta hasta alcanzar el máximo número de transcritos a la 1h, después de la 2h en su expresión desciende alrededor de un 45 % y un 60 % a la 3h comparado a 1h después de aplicar el estrés (Gráfica 4B). Los niveles de transcritos del *glu2* tienden a descender desde los 30 min después de aplicar el estrés salino y continúa con esa tendencia hasta las 24h (Gráfica 4B). Al hacer el análisis de correlación entre *ccl* y *glu1* se obtuvo una r igual a -0.1648 (Gráfica 5), mientras que para *ccl* y *glu2* r fue igual a 0.49721 (Gráfica 6).

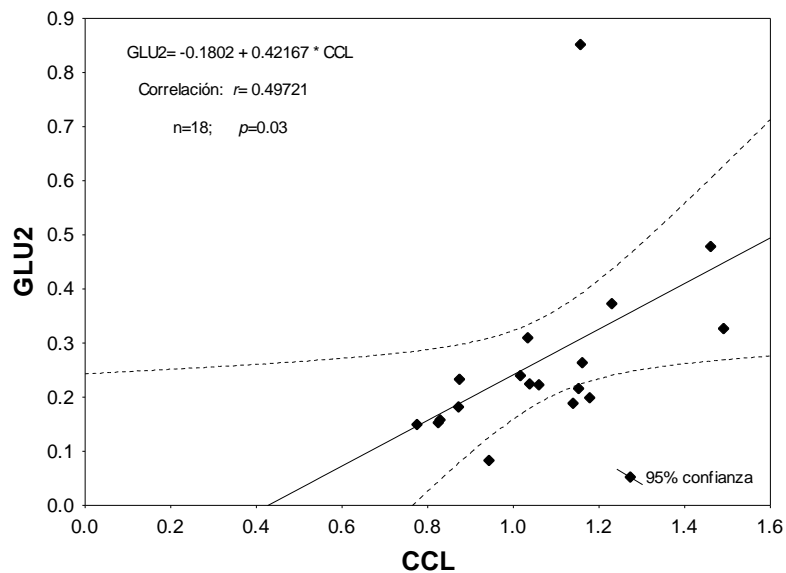
En el presente estudio se cuantificó la actividad enzimática a los mismos tiempos y con el mismo tejido que se utilizó para la extracción de ARN, observándose que hay una 3 veces más actividad a los 30 min que en el tiempo 0 (Gráfica 6), mientras que se no observó la misma relación a nivel de transcritos ya que solo hubo un aumento del 5 % a los 30 min sobre el tiempo 0 (Gráfica 4B).



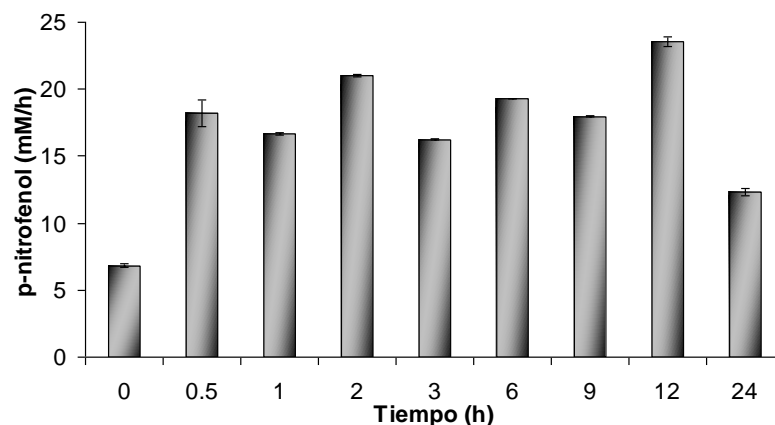
Gráfica 4. Intensidad relativa de la expresión de los genes A) *glu1*, B) *glu2* y C) *ccl*, en respuesta al estrés salino. Barras de error estándar.



Gráfica 5. Correlación de la expresión de los genes *ccl* y *glu1* en estrés salino.



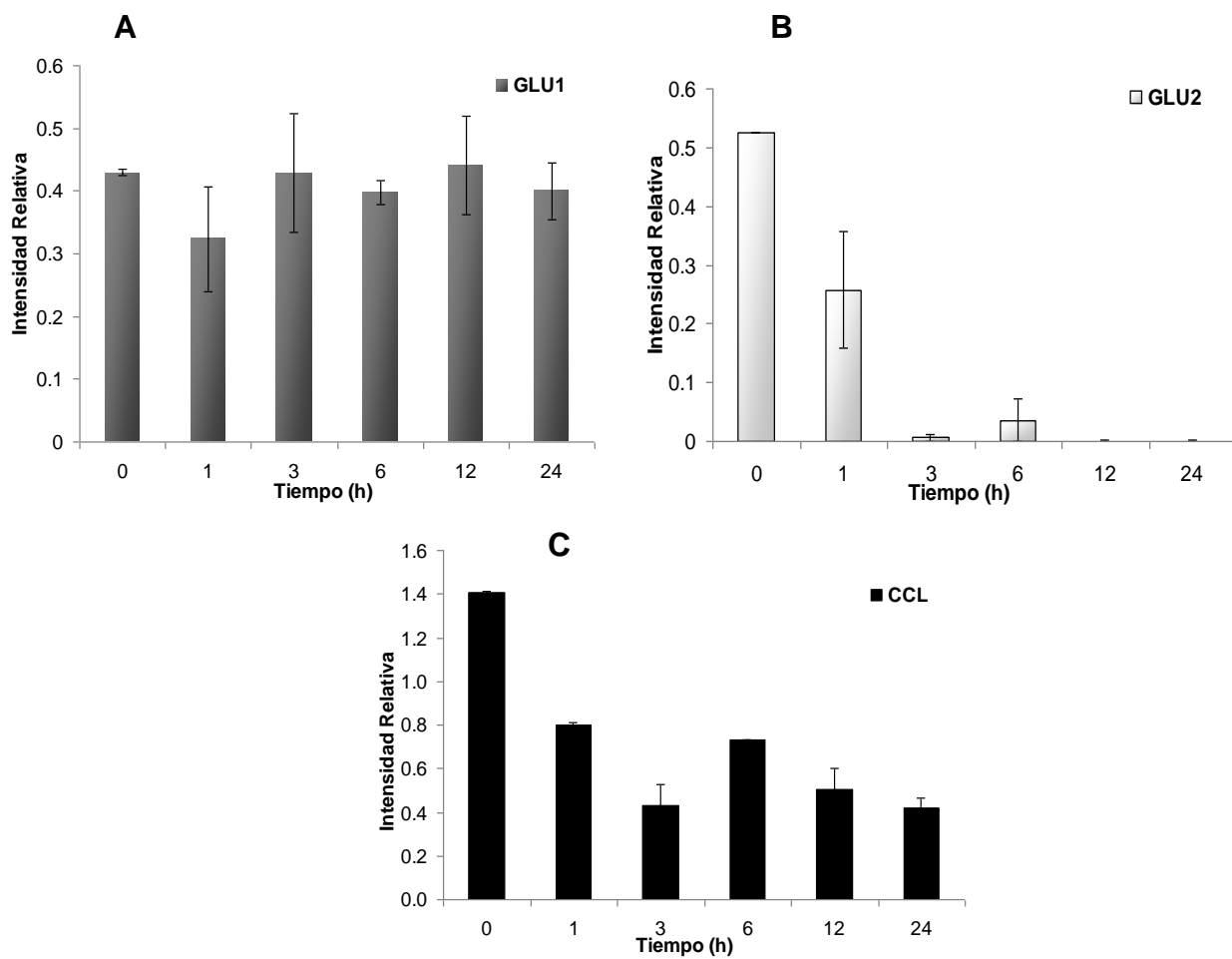
Gráfica 6. Correlación de la expresión de los genes *ccl* y *glu2* en estrés salino.



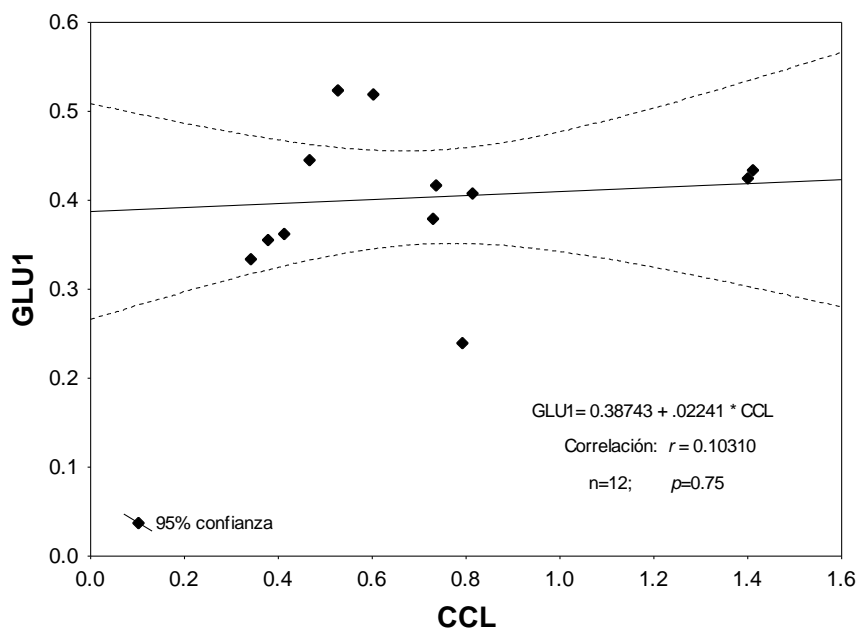
Gráfica 7. Actividad específica de la β -glucosidasa en extractos crudos de coleoptilos sometidos a 300 mM de NaCl, a diferentes tiempos. Barras de Desviación Estándar.

Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Daño Mecánico al Coleoptilo

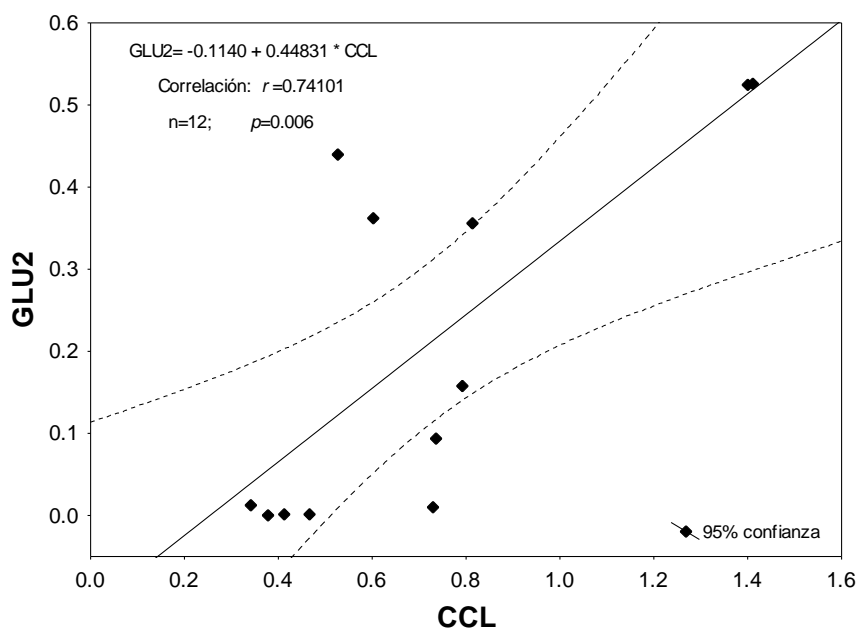
La expresión del gen *ccl* se redujo un 43 % después de 1h de aplicado el daño mecánico y 70% después de 3h. Posteriormente se detectó un ligero aumento en su expresión a la 6h post-estimulo, sin embargo la expresión disminuyó después de las 12h (Gráfica 8C), al igual que con *glu2*. La evaluación semicuantitativa del gen *glu1* mostró que la diferencia entre el tiempo de muestreo no fue significativa (Gráfica 8A), por lo que el daño mecánico causado en este estudio no induce su expresión. En cuanto a la evaluación de la expresión de *glu2* por efecto de daño mecánico, se observó una reducción de 51 % de transcritos a 1h después de provocado el daño al coleoptilo, posterior a ello (3 h a 24 h) se redujo hasta un 98 %, comparado con el tiempo 0 (Gráfica 8B). Al hacer el análisis de correlación entre *ccl* y *glu1* se obtuvo una r igual a **0.10310** (Gráfica 9), mientras que para *ccl* y *glu2* r fue igual a **0.74101** (Gráfica 10).



Gráfica 8. Intensidad relativa de la expresión de los genes A) glu1, B) glu2 y C) ccl, en respuesta a daño mecánico. Barras de error estándar.



Gráfica 9. Correlación de la expresión de los genes *ccl* y *glu1*, en daño mecánico.



Gráfica 10. Correlación de la expresión de los genes *ccl* y *glu2*, en daño mecánico.

DISCUSIÓN

CCL: Caracterización Bioinformática del Gen, ADNc y Proteína

En el análisis bioinformático de la región reguladora de *ccl*, la **caja TATA**, se ubicó a -110 bases (tomando como 1 la adenina del codón de inicio). Ésta es una secuencia altamente conservada y, es el sitio de unión de las TBP (proteínas de unión a caja TATA). La unión de esta proteína es el primer paso para la formación del aparato de transcripción basal. Se ha observado que tanto la secuencia que flanquea la caja TATA, como su ubicación, es importante para la eficiencia en la transcripción (Grace *et al.* 2003). A -153 bases se encuentra la secuencia *ccgcgc* conocida como la **caja CGCG**, que fue encontrada río arriba de genes de respuesta a factores bióticos y abióticos. Además, se ha descubierto que este elemento *cis* es reconocido por proteínas llamadas AtSR, mismas que también cuentan con un dominio de unión a calmodulina, por lo que se ha propuesto que las AtSR reguladas por calmodulina puede ser uno de los centros iniciadores de la cascada de señalización por respuesta diferencial a estímulos externos (Yang *et al.* 2002). De -184 a -170 bases encontramos la **caja CAAT (CAAT box)**, a este sitio se une un complejo de tres proteínas de unión a CAAT box (CBF). En *Arabidopsis thaliana* se encontró este elemento *cis* como parte del promotor de la subunidad γ (gamma) de la ATP sintasa, los estudios mostraron que la expresión de este gen es regulada fuertemente por la luz, citoquinina y el estado de los plastidios (Kusnetsov *et al.* 1999). A -285 bases se encuentra la **GATA Box**, éste es un sitio de unión de un factor de transcripción dedo de Zinc tipo 4, en *Arabidopsis* se ha visto que la unión de este factor de transcripción con la GATA box está implicado en la respuesta a luz (Reyes *et al.* 2004).

El análisis de factores *trans* mostró la presencia de 11 sitios de unión a factores de transcripción. A -125 bases se encontró la secuencia *gccgac* (motivo **CBFHV**) que es un posible sitio de unión a un factor de transcripción tipo AP2. En cebada, éste factor de transcripción activa genes en respuesta a bajas temperaturas (Gang-Ping X, 2002). A -102 pb se encuentra la secuencia *gagttgc* (motivo **EECCRAH1**), que es un sitio de unión de un factor de transcripción tipo Myb, en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, éste

factor de transcripción regula la expresión de tres genes inducibles a bajas concentraciones de CO₂ (Yoshioka *et al*, 2004). La secuencia *cctacc* (motivo **MYBPZM**) se encuentra ubicada a -89 bases, éste es un posible sitio de unión de un factor de transcripción homólogo a Myb encontrado en maíz. Este factor de transcripción regula la expresión de genes involucrados directamente en la biosíntesis de flavonoides, pero esta regulación solo es efectiva en presencia de un co-activador, una proteína del tipo basic-helix-loop-helix (bHLH). Lo anterior indica que homólogos a Myb pueden regular la expresión diferencial de genes por su unión a diferentes secuencias de ADN y su interacción combinatorial con otros factores (Grotewold *et al*, 1994). La secuencia *cacaac* (motivo **RAV1AAT**), se encuentra a -75 bases que es un posible sitio de unión del factor de transcripción RAV1 encontrado en *Arabidopsis*, el cual está compuesto por dos dominios, uno tipo AP2 y el otro tipo B3, cada uno de estos dominios puede reconocer un motivo diferente, esto sugiere que éste puede regular un set de genes (Kagaya *et al*, 1999). A -43 bases está la secuencia *caagtg* conocida como **caja E (E box)** o **motivo MYCCONSENSUSAT**, éste es un sitio de unión del factor de transcripción MYP15, del tipo R2R3MYB, encontrado en *Arabidopsis*. Este factor ejerce una regulación negativa en la expresión de los tres genes CBF (se ha comprobado que estos genes otorgan tolerancia al congelamiento en *Arabidopsis*), es decir, MYP15 reprime la expresión de estos genes cuando la planta es sometida a bajas temperaturas (Agarwal *et al*, 2006). A -25 bases se ubica la secuencia *gacaga* (motivo **SEBFCONSSTPR10A**), en *Solanum tuberosum* éste se encontró entre -57 y -27 pb de la región promotora del gen PR-10a, el cual es activado en respuesta al ataque por patógenos, siendo además, sitio de unión de un factor de transcripción conocido como SEBF (silencing element binding factor) un represor transcripcional (Boyle B y Brisson N, 2001). A -232 bases se ubica la secuencia *gactgacct* conocida como **W Box**, que es el sitio de unión a un factor de transcripción de la familia WRKY. En plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), se encontró que el factor de transcripción NtWRKY1 interacciona específicamente con el motivo W box del gen ERF3, activando su expresión en hojas dañadas (Nishiuchi *et al*, 2004). A -279 se encuentra la secuencia *aaag* (motivo **DOFCOREZM**), éste es un sitio de unión a factores de transcripción conocidos como DOF, del tipo zipper de leucina, los cuales solo han sido encontrados en plantas. En maíz,

estos factores de transcripción se encuentran regulando genes involucrados en el metabolismo del carbono (Yanagisawa, 2000). A -367 bases se encuentra la secuencia *acgt* (**CGTATERD1**), en *Arabidopsis*, este elemento *cis* se ha reportado como el responsable de la expresión del gen *erd1* durante la deshidratación y etiolación (Simpson *et al.*, 2003). A -382 bases se encuentra la secuencia *caatatatttta* (motivo **SEF4MOTIFGM7S**), que es el sitio de unión a factores de transcripción conocidos como **SEF**, los cuales modulan la expresión de los genes involucrados en el desarrollo embrionario (Lessard *et al.*, 1991). A -426 bases se encuentra la secuencia *cttate* conocida como **I Box**, elemento *cis* que fue identificado en tomate como un activador transcripcional de los genes RBCS (Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa) (Rose *et al.*, 1999). El presente análisis muestra que las características de su región reguladora, corresponden a las de un gen inducible y altamente regulado, lo que indica que *ccl* posiblemente es de gran importancia para la célula.

En el análisis de la secuencia del gen se encontró el exón uno (codón de arginina (R)) interrumpido por el intrón uno, éste tipo de interrupción de la secuencia del codón, es un indicativo de la precisión que debe existir en el mecanismo de corte y empalme (splicing) durante la eliminación de intrones en la maduración del ARN mensajero (Tomita *et al.* 1996). El intrón II presenta una región repetida 27 veces de *at* (tandem sequences), éste puede ser un indicativo de la funcionalidad de éste intrón como receptor de mutaciones o de retrotransposones. Extrañamente, el intron III, mostró un porcentaje elevado de G y C en la secuencia (51.1 %), así como las secuencias GT en el extremo 5' y AG en el extremo 3'. Éste tipo de secuencias son características de los intrones tipo II, los cuáles se presentan en células eucariotas y requieren la presencia de spliceosoma para ser eliminados y producir el mensaje maduro que dará producto a la proteína (Duhrsen *et al.*, 1995).

Los análisis de la secuencia aminolítica indican que CCL pertenece a una lectina quimérica, es decir, está conformada por dos dominios funcionales completamente diferentes, un dominio N-terminal "Dirigente" relacionado a enfermedades y un dominio C-terminal lectina "Tipo Jacalina". Curiosamente estas lectinas quiméricas, hasta ahora, solo han sido encontradas en la familia *Poaceae* como por ejemplo arroz, trigo, sorgo y maíz (Esen *et al.* 2000; Williams *et al.* 2002; Yu *et al.* 2005; Kittur *et al.* 2008). Algunas de estas proteínas quiméricas son BGAF (*Zea mays*, cultivar K55), Ta-JA1 (*Triticum aestivum*),

WCL-1 (*Triticum aestivum*), Crs-1 (*Agrostis stolonifera*). La función específica de estas proteínas dentro de la célula aun no ha sido descubierta, pero es destacable resaltar que al realizar un análisis bioinformático en la secuencia genómica del cultivar B73 de maíz, se encontraron 5 lectinas quiméricas, dos de ellas con una alta identidad a CCL. Ésta duplicación genética puede ser un indicativo de la relevancia que tiene este tipo de quimerolectinas para la célula.

Expresión Espacio Temporal de los Genes *ccl*, *glu1* y *glu2*

Los niveles encontrados de transcritos de la lectina nos sugieren que CCL es importante para la germinación y el desarrollo de los tejidos jóvenes de la planta. En el caso de *glu1*, algunos estudios muestran que la β -glucosidasa está implicada en la activación de citoquininas durante la germinación (Smith y van Staden, 1978), mientras que otros muestran que la principal función de esta enzima es defender las partes jóvenes de la planta de las plagas, mediante la activación de ácidos hidroxámicos (Esen y Blanchart, 2000), lo cual se evidencia en el descenso en la expresión de este gen al pasar los días de germinación. El gen que codifica para GLU2 se encuentra presente desde el día 3 (Gráfica 1), contrario a lo reportado por Esen (2000), quien menciona que el gen *glu2* se expresa en bajos niveles y solo en hojas, iniciando el 6 día después de la germinación; sin embargo, este autor no muestra los datos que prueben esa aseveración, por lo que es posible que el cultivar de maíz utilizado para hacer esa medición fuera el H95 (null). Por otro lado, Feldwisch y colaboradores (1994) trabajando con *Zea mays* cultivar mutin 240, detectaron dos β -glucosidasas activas en coleoptilos de 3 días después de la germinación, mientras que Esen (1992) utilizando el cultivar K55, encontró las dos isozimas (GLU1 y GLU2) en coleoptilos de 5 a 6 días de germinación, lo que sugiere que posiblemente GLU2 en el cultivar H95, sea regulado de forma diferente a los otros cultivares (B73, mutin 240 y K55). Además los resultados muestran que la máxima expresión de *glu2* fue en las hojas del día 7, lo cual indica que este gen es importante en el desarrollo de la plántula.

Se observó que existe una correlación en la expresión de los genes *ccl-glu2*, ya que cuando la intensidad relativa de *ccl* aumenta también lo hace *glu2* (Gráfica 3) y cuando disminuye *ccl* también lo hace *glu2*. Esta relación se esperaba que fuera entre los genes *ccl* y *glu1*, sin embargo, el valor del coeficiente de correlación (R o r) fue muy bajo (Gráfica2).

Comparación de las Regiones Regulatoras de los Genes *ccl*, *glu1* y *glu2*

De los 6 sitios de unión a factores de transcripción encontrados para la región reguladora de los tres genes, cuatro están directamente involucrados en respuesta a factores bióticos y abióticos, dos de ellos el MYCCONSENSUSAT y MYBCORE, son inductores de la expresión de genes relacionados directamente a la respuesta de la planta a estrés hídrico, y las regiones WRKY71OS y WBOXNTERF3, son sitios de reconocimiento para factores que inducen la expresión de genes en respuesta a ataque por patógenos. Además, se encontraron 4 sitios de posibles promotores en las regiones reguladoras de los genes *ccl* y *glu1*, tres de ellos (MYCATERD1, LTRECOREATCOR15 y MYCATRD22) están directamente relacionados en respuesta al estrés hídrico. El análisis también mostró tres posibles promotores para las regiones reguladoras de *ccl* y *glu2*, uno de ellos fue el sitio SEBFCONSSTPR10A, que se ha definido como un fuerte represor transcripcional.

Este análisis sugiere que los genes *ccl*, *glu1* y *glu2*, son regulados posiblemente por factores externos y, pueden en un momento dado, ser expresados independientemente o en conjunto, lo cual indica que se encuentran involucrados en la respuesta de la planta a diversos estresores.

Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Estrés Salino.

Los datos reportados hasta ahora, sobre la evaluación de la β -glucosidasa en maíz en estrés salino, solo son a nivel proteico. Zorh y colaboradores (2004) encontraron un aumento significativo en la concentración de la β -glucosidasa al someter plántulas de maíz a estrés salino (200 mM NaCl). En 2006, trabajando con plántulas de maíz germinadas a diferentes concentraciones de NaCl (de 0 a 220 mM) se encontró un aumento directamente

proporcional en la actividad de la β -glucosidasa y la concentración de NaCl en el agua de riego, lo cual también fue observado por Dietz y colaboradores (2000) quienes trabajando con plántulas de cebada, las sometieron a diferentes concentraciones de NaCl (de 25 mM a 200 mM) y encontraron 7 veces más actividad de β -glucosidasa en extractos de hojas de plántulas regadas con 200 mM que el control. Cabe señalar que en los casos anteriores solo se tomó muestra en un solo tiempo. Al comparar nuestros resultados obtenidos entre el número de transcritos de *glu1* contra la actividad enzimática de la β -glucosidasa a diferentes tiempos, podemos sugerir que esta enzima es regulada a nivel postraduccional, este tipo de regulación es también sugerido por Hee Lee y colaboradores (2006), quienes trabajando con plántulas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por deshidratación, encontraron que este tipo de estrés genera una rápida polimerización de la β -glucosidasa y esto da como resultado un incremento de cuatro veces más actividad enzimática.

Además, al graficar la intensidad relativa de los genes *ccl* y *glu1* (Gráfica 5) se encontró una R menor que la obtenida al graficar la intensidad relativa de los genes *ccl* y *glu2* (Gráfica 6), lo cual reitera lo encontrado al evaluarlos a diferentes días de germinación, es decir, existe mayor relación a nivel transcripcional entre los genes *ccl* y *glu2*, que entre *ccl* y *glu1*.

Evaluación de la Co-Expresión de CCL y β -Glucosidasa en Respuesta a Daño Mecánico al Coleoptilo

La variación en la expresión del gen *ccl* en respuesta a daño mecánico, es similar a la reportada en las MBPs (Myrosinase Binding Proteins; Proteínas de Unión a Mirosinasa), la expresión de estas MBPs difiere significativamente en la respuesta local y sistémica. Pontoppidan (2005) midió la expresión de los genes que codifican para las proteínas de unión a mirosinasa, en respuesta a daño mecánico a las 0, 45 min, 1.5 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h y, observó que la respuesta a nivel local y sistémico era significativamente diferente, es decir, registró niveles bajos y constantes de transcritos a nivel sistémico, pero a nivel

local estos genes eran fuertemente inducidos, lo cual sugiere que *ccl*, posiblemente este actuando a nivel local.

La evaluación semicuantitativa del gen *glu1* mostró que la diferencia entre el tiempo de muestreo no fue significativa (Gráfica 8A), por lo que el daño mecánico causado en este estudio no induce su expresión. Este mismo efecto fue observado por Pontoppidan y col. (2005) en plántulas de canola (*Brassica napus*), en donde la hoja fue dañada utilizando tijeras, al medir la expresión de la mirosinasa (β -tioglucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.147). La mirosinasa es una enzima que similar a la β -glucosidasa, hidroliza glucosinolatos (Rask *et al.* 2000). En estos estudios no detectaron cambios en el número de transcriptos, pero si lo observaron cuando sometieron las plántulas al ataque de insectos. Los insectos no solo dañan mecánicamente al tejido vegetal, si no también transmiten elicitores como conjugados de aminoácidos y ácidos grasos, enzimas (ejemplo: glucosa oxidasa), etc. (Van Poecke, 2007), es posible que *glu1* al igual que la mirosinasa sea inducida por elicitores derivados por insectos herbívoros y así cuando el ataque se simula por daño mecánico, carente de elicitores, no se observa el efecto de inducción.

En cuanto a la evaluación de la expresión de *glu2* por efecto de daño mecánico, se observó una reducción de 51% de transcriptos a 1h después de provocado el daño al coleoptilo, posterior a ello (3h a 24h) se redujo hasta el 98%, comparado con el tiempo 0. Lo anterior sugiere que este gen es fuertemente inhibido por daño mecánico, aunque conociendo que la planta presenta dos tipos de respuesta, local y sistemática (Sánchez-Serrano, 2001). Los resultados del presente estudio indican que *glu2* es inhibida, por lo que es posible sugerir que la inhibición es a nivel sistémico. Esto no impide que su expresión a nivel local pueda ser diferente; sin embargo, por el tipo de muestreo realizado durante el experimento, en el cual se trabajaron mezcla de coleoptilos, no es posible tener información acerca de la respuesta local.

Al comparar la expresión de los genes *ccl* y *glu2* (Gráfica 10) se encontró una alta relación, a diferencia de *ccl-glu1* (Gráfica 9), lo cual sugiere que la expresión de este par de genes (*ccl-glu2*), está regulada por un factor relacionado con daño mecánico.

CONCLUSIÓN

CCL, es una lectina quimérica y el gen que la codifica está regulado por diversos factores involucrados en respuesta a estresores bióticos y abióticos, y la expresión de *ccl* es la de una lectina del tipo “no clásica”. El transcripto que codifica para la β -glucosidasa2, está presente desde los primeros días de germinación, junto con la β -glucosidasa1, y estas isoenzimas pueden unirse específicamente a CCL. El análisis de la región promotora de los tres genes *ccl*, *glu1* y *glu2* sugiere que son regulados por factores externos y pueden expresarse independientemente o en conjunto, lo cual indica participación en la respuesta de la planta a diversos estresores. Además los resultados indican que no existe relación en la expresión de los genes *ccl* y *glu1* cuando la plántula es sometida a estrés salino o daño mecánico, mientras sí existe relación estequiométrica en la expresión de los genes *ccl* y *glu2* ya que ambos son reprimidos bajo los dos estresores probados en el presente estudio.

REFERENCIAS

- Blanchard DJ, Cicek M, Chen J., Esen A.** 2001. Identification of beta-glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on Maize β -glucosidase. *J Biol Chem.* 276: 11895-901. 2001.
- Boyle B, Brisson N.** 2001. Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell* 13: 2525-2537.
- Brzobohaty B., Moore I., Christofferson P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K.** 1993. Release of active cytokinin by a β -glucosidase. Localized to the maize root meristem. *Science* 262: 1051-1054.
- Busk PK, Pages M.** 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37:425-435
- Claes B, Dekeyser R, Villarroel R, Van den Bulcke M, Bauw G, Van Montagu M, and Caplan A.** 1990. Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell.* 2: 19-27.
- de Souza Filho GA, Ferreira BS, Dias JM, Queiroz KS, Branco AT, Bressan-Smith RE, Oliveira JG, and Garcia AB.** 2003. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. *Plant Science* 164: 623-628.
- Diaz-Martin J, Almoguera C, Prieto-Dapena P, Espinosa JM, Jordano J.** 2005. Functional Interaction between Two Transcription Factors Involved in the Developmental Regulation of a Small Heat Stress Protein Gene Promoter. *Plant Physiology*, 139: 1483-1494.
- Esen A.** 1992. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiol.* 98: 174-182.
- Esen A. y Blanchard D.** 2000. A specific β -glucosidase – Aggregating Factor is responsible for the β -glucosidase null phenotype in maize. *Plant Physiol* 122: 563-572.
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE.** 1999. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18:4689-4699.
- Feldwisch J., Vente A., Zettl R., Bako L., Campos N., y Palme K.** 2004. Characterization of two membrane-associated β -glucosidase from maize (*Zea mays* L.) coleoptiles. *Biochem J.* 302:15-21.
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S.** 2004. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1555-1573
- Gorlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, and Ryals J.** 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell.* 8: 629-43.

Grace ML, Chandrasekharan MB, Hall TC, Crowe AJ. 2004. Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the beta-phaseolin promoter. *J Biol Chem.* 279:8102-8110.

Hamilton DA, Schwarz YH, Mascarenhas JP. 1998. A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol* 38:663-669.

Hartmann U, Sagasser M, Mehrrens F, Stracke R, Weisshaar B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol.* 57: 155-171.

Hernández Cruz P., Pérez Campos E., Martínez Martínez B. 2005. Las lectinas vegetales como modelo De estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Rev* 24 (1): 21-27.

Jones P y Vogt T. 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *PLANTA* 213:164-174.

Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T. 1999. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res* 27: 470-478.

Kim HJ, Kim YK, Park JY, Kim J. 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29: 693-704.

Kittur F., Lalgondar M., Yu HY., Bevan DR., Esen A. 2007. Maize β -glucosidase aggregating factor is a polyspecific jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for β -glucosidase aggregation. *J Biol Chem.* 282:7299-7311.

Kittur F., Young Yu H., Bevan D., y Esen A. 2009. Homolog of the maize β -glucosidase aggregating factor from sorghum is a jacalin-related GalNAc-specific lectin but lacks protein aggregating activity. *Glycobiology* 19(3):277-287.

Lee J, Parthier B, and Lobler M. 1996. Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta.* 199: 625-32.

Li HM, Rotter D, Bonos SA, Meyer WA, Belanger FC. 2005. Identification of a gene in the process of being lost from the genus *Agrostis*. *Plant Physiol.* 138: 2386-95.

Lis H y Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydratesspecific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev* 98: 637-674.

Lopez-Molina L, Chua NH. 2000. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 541-547.

Molina J, Landa A, Bautista G, Martinez M, and Cordoba F. 2004. Molecular association of lectin and β -glucosidase in corn coleoptile. *Biochim Biophys Acta.* 1674: 299-304.

- Morant A., Jorgensen K., Jorgensen C., Paquette S., Sanchez-Perez R., Lindberg B., Bak S.** 2008. β -glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69:1795-1813.
- Nagano A J., Matsushima and Hara-Nishimura I.** 2005. Activation of an ER-body-localized β -glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell physiol.* 46(7):1140-1148.
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K.** 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J Biol Chem.* 279: 55355-55361.
- Pontoppidan B., Hopkins R., Rask L y Meijer J.** 2005. Differential wound induction of the myrosinase system in oilseed rape (*Brassica napus*): contrasting insect damage with mechanical damage. *Plant Science* 168:715-722.
- Rask L., Andreasson E., Ekblom B., Eriksson S., Pontoppidan B y Meijer J.** 1992. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* 18:387-398.
- Rudiger H y Rouge P.** 1998. Structure and Function of plant Lectin. *Carbohydr Eur* 23: 16-22.
- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ.** 2004. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 134: 1718-1732.
- Rose A, Meier I, Wienand U.** 1999. The tomato I-box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of Myb-like proteins. *Plant J* 20: 641-652.
- Sharon N. and Lis H.** 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11): 53R – 62R.
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell.* 16: 2481-2498.
- M Tomita, N Shimizu and DL Brutlag.** 1996. Introns and reading frames: correlation between splicing sites and their codon positions. *Molecular Biology and Evolution.* 13:1219-1223
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K.** 1993. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5:1529-1539.
- Van Damme Els J. M., Peumans Willy J., Barre Annick, y Rougé Pierre.** 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(6):575–692.
- Van Poecke R.** 2007. *Arabidopsis*-Insect Interactions. American Society of Plant Biologists..

Wang XM, and Ma QH. 2005. Characterization of a jasmonate-regulated wheat protein related to a β -glucosidase-aggregating factor. *Plant Physiol Biochem.* 43:185-92.

Williams CE, Collier CC, Nemacheck JA, Liang C, and Cambron SE. 2002. A lectin-like wheat gene responds systemically to attempted feeding by avirulent first-instar Hessian fly larvae. *J Chem Ecol.* 28: 1411-28.

Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H. 2004. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochim Biophys Acta.* 1679:279-287.

Yanagisawa S. 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J* 21:281-288.

Yang T, Poovaiah BW. 2002. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem.* 277:45049-45058.

Yoshioka S, Taniguchi F, Miura K, Inoue T, Yamano T, Fukuzawa H. 2004. The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene Cah1, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 16: 1466-1477.

Zhang W, Peumans WJ, Barre A, Astoul CH, Rovira P, Rouge P, Proost P, Truffa-Bachi P, Jalali AA, and Van Damme EJ. 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta.* 210: 970-978.