



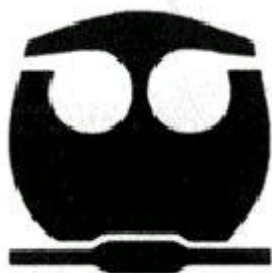
UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA Y DE
EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CICLINAS
TIPO D DE MAÍZ

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
MANUEL BUENDÍA MONREAL



Tutor: DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS

MÉXICO, D. F.

Julio 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA Y DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CICLINAS TIPO D DE MAÍZ

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Dra. Patricia León Mejía	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de los doctores Octavio Guerrero Andrade, Elpidio García Ramírez, Ilenia Rentería Canett y Francisco Quiroz Figueroa en los experimentos de expresión génica

Se reconoce la asesoría del Dr. León P. Martínez Castilla en el análisis de secuencias y filogenia.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Joseph G. Dubrovsky	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología, UNAM
Secretario	Dra. Tzvetanka Dimitrova	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Inst. de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Porque me ha dado todo su apoyo y confianza y ha sido la persona más importante en mi formación académica. Un jefe excelente y un gran ejemplo.

A los doctores León Patricio Martínez y Patricia León

Por sus valiosos comentarios y críticas a mi trabajo durante dos años, siendo parte de mi comité Tutorial

A mis cinco sinodales: Doctores Dubrovsky, Cesy, León, Zentella y Coria

Por darme una parte de su tiempo para discutir mi trabajo y aportar acertadas correcciones.

A mis compañeros y amigos de trabajo:

Víctor, Sara, Carlos, Silvia Karina, Jorge, Mingyar, Angélica, Pilo, Lupita, Tavo, Yaddith, Liliana, Yesica, Paco, Paulina, Viri(s), Mariel, Silvia, Ilenia, Kyke, Alfredo, Germán

Por hacer agradable mi estancia en el laboratorio y compartir su tiempo, experiencia y conocimientos

Este trabajo está dedicado a...

... las dos personas que más quiero y que más me quieren: Gloria y Valeria

... mi tía Vale, que es mi amiga y un gran apoyo personal

... mis abuelitos Jesús y Bertha

... todas las personas que han enriquecido mi vida y la han disfrutado conmigo

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS	2
AGRADECIMIENTOS	3
I. RESUMEN	8
II. ABREVIATURAS	9
III. INTRODUCCIÓN	10
III.I. El Maíz (<i>Zea mays</i>).....	10
III.I.I. Morfología y fisiología del maíz.....	11
III.I.I.I. Germinación de maíz.....	13
III.I.II. El genoma de maíz.....	15
III.II. Ciclo celular.....	16
III.II.I. Ciclinas.....	18
III.II.I.I. Ciclinas tipo D.....	20
III.III. Hormonas vegetales.....	23
III.III.I. Efecto de algunas fitohormonas sobre la expresión de genes de ciclo celular.....	25
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
V.I. Objetivo general.....	28
V.II. Objetivos particulares.....	28
VI. DESARROLLO DEL PROYECTO	29
1. Identificación de genes que codifican ciclinas tipo D en el genoma de maíz y comparación de secuencias con sus ortólogos respectivos	29
1.1. Antecedentes.....	29
1.1.1. Ciclinas tipo D identificadas previamente en maíz y en otras plantas.....	29
1.2. Metodología.....	30
1.2.1. Recopilación de datos.....	30
1.2.2. Obtención de las secuencias de las ciclinas tipo D de maíz.....	30
1.2.3. Identificación de dominios.....	30
1.2.4. Comparación con cilinas de otras especies. Análisis filogenético.....	31
1.3. Resultados.....	31
1.3.1. Identificación de genes, ubicación cromosomal, comparación con sus ortólogos respectivos y nueva nomenclatura.....	31
1.3.2. Análisis de secuencias proteicas: dominios y motivos.....	36

1.3.3. Organización genómica	40
2. Expresión génica bajo diferentes condiciones ambientales	42
2.1. Antecedentes	42
2.1.1. Regulación de ciclo celular por factores ambientales.....	42
2.1.2. Expresión génica de ciclinas tipo D de maíz	44
2.2. Metodología	45
2.2.1. Material vegetal y extracción de RNA	45
2.2.2. Búsqueda de elementos de respuesta a fitohormonas en los promotores	46
2.2.3. Ensayo de incorporación de la timidina.....	46
2.2.4. RT-PCR	46
2.3. Resultados.....	47
2.3.1. Patrones de expresión de ciclinas tipo D en germinación y tejidos.....	47
2.3.2. Efecto de la adición de hormonas sobre la expresión de ciclinas tipo D.....	50
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. PERSPECTIVAS.....	63
X. REFERENCIAS	64
XI. ANEXOS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Secciones verticales de un grano maduro de maíz dentado visto de frente y de lado
2. Fases de la germinación de semillas en relación con la toma de agua
3. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control
4. Modelo general de la regulación en la interfase G1-S de ciclo celular en eucariotes
5. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas tipo D
6. Los cinco grupos de fitohormonas mejor estudiados
7. Árbol filogenético de las ciclinas tipo D de Arabidopsis, arroz y maíz enraizados con la ciclina D de *P. patens*
8. Ubicación cromosomal de los 17 genes de CycDs en el genoma de maíz
9. Dominios proteicos y organización genómica de las ciclinas tipo D de maíz
10. Patrón de expresión de las cuatro CycDs de maíz reportadas previamente
11. Perfiles de expresión de los genes CycD de maíz
12. Funcionalidad de los primers para CycD5;2b y CycD7;1
13. Presencia de elementos de respuesta a fitohormonas en los promotores de las ciclinas D de maíz
14. Efecto de benziladenina, ácido indolacético y ácido abscísico sobre la síntesis de DNA en germinación de maíz
15. Respuesta de los genes CycD de maíz al tratamiento con fitohormonas
16. Resumen de la inducción y represión de algunas fitohormonas sobre la transcripción de CycDs de maíz durante germinación

ÍNDICE DE TABLAS

1. Estadísticas de la producción mundial de maíz, trigo y arroz
2. Clasificación taxonómica del maíz según la base de datos de plantas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)
3. Número de genes de cada grupo de ciclinas tipo D presentes en maíz, arroz y Arabidopsis
4. Dominios y motivos específicos de ciclinas encontrados en las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de maíz
5. Ubicación de los motivos D-box en las ciclinas tipo D de maíz

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Números de acceso de las ciclinas tipo D reportadas de *Physcomitrella patens*, *Arabidopsis thaliana*, arroz y maíz
2. Números de acceso en la base de datos Maize Sequence que corresponden a cada ciclina tipo D de maíz
3. Matriz de identidad entre las secuencias proteicas de las CycDs de maíz y las CycDs de Arabidopsis, arroz y *P. patens*
4. Dominios y motivos presentes en las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de maíz
5. Alineamiento de las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de *Physcomitrella patens*, maíz, arroz y Arabidopsis mostrando su organización genómica
6. Longitud de proteínas y número y longitud de exones e intrones.
7. *Primers* utilizados para amplificar cada CycD de maíz y sus correspondientes condiciones de reacción
8. Perfiles de expresión de 5 CycDs de maíz obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real (Trabajo realizado por la Dra. Ilenia Rentería Canett como parte de una estancia posdoctoral)
9. Comparación entre la nomenclatura propuesta por Hu *et al.*, 2010 y la nomenclatura propuesta en este trabajo
10. Diferentes formas de splice de los genes de ciclinas tipo D de maíz

I. RESUMEN

Las ciclinas son proteínas que, asociadas a CDKs (Cyclin Dependent Kinases), tienen un papel fundamental en el control del ciclo celular; cuando se unen forman complejos activos que permiten la progresión del ciclo celular. Las ciclinas tipo D son importantes en la percepción de señales mitogénicas externas y en el control de la fase G1.

Se encontró que en el genoma de maíz existen al menos 17 genes que codifican para ciclinas tipo D, los cuales están distribuidos en los grupos D1 – D7 descritos previamente en otras plantas. El análisis de sus secuencias proteicas confirma la existencia de dominios característicos de ciclinas.

También se observaron similitudes en organización genómica con sus genes ortólogos de Arabidopsis y arroz, la mayoría de los cuales tienen una estructura de 6 exones y 5 intrones.

Finalmente, se estudiaron los niveles de transcrito de dichos genes en semillas en germinación, en condiciones normales y en presencia de hormonas, así como en diferentes tejidos (mesocotilo, puntas de raíz y primera hoja) de plántulas de una semana. Se detectó la presencia de 15 de las 17 ciclinas en semillas en germinación y al menos en uno de los tejidos probados. Casi todas las ciclinas detectadas muestran patrones de acumulación de mRNA en semillas embebidas por 24 horas. La mayoría está presente en los 3 tejidos probados, aunque en mayor cantidad en raíz; interesantemente, Zeama;CycD3;1a tiene mayores niveles de transcrito en tejidos con menor proliferación que raíz. Los niveles de transcrito no variaron en gran medida con la adición de auxinas y citocininas al medio de imbibición de las semillas; por el contrario, la adición de ácido abscísico disminuyó la expresión de casi la mitad de las ciclinas.

II. ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
Arath	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BA	Benziladenina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CKI	Inhibidor de CDK
CKS	Subunidad de CDK
Cyc	Ciclina
CycD	Ciclina tipo D
FW	<i>Primer forward</i>
IAA	Ácido indolacético
JA	Ácido jasmónico
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótidos
Orysa	<i>Oryza sativa</i> (arroz)
pb	Pares de bases
Phypa	<i>Physcomitrella patens</i>
Pro-DKin	Cinasas dirigidas por prolina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de Reacción en cadena de la polimerasa
RV	<i>Primer reverse</i>
UTR	Región no traducible de un gen (pero transcrita)
Zeama	<i>Zea mays</i> (maíz)

III. INTRODUCCIÓN

III.I El Maíz (*Zea mays*)

El maíz es una de las plantas de mayor importancia cultural y comercial en el mundo. Constituye uno de los tres cereales, junto con el arroz y el trigo, de mayor producción mundial y mayor área de cultivo (Tabla 1).

Tabla1. Estadísticas de la producción mundial de maíz, trigo y arroz (Datos de 2009 de la FAO, ONU).

País	Área cultivada de maíz (ha)	Producción de maíz (Mt)	Rendimiento (Mt/ha)
Mundial	159,531,007	817,110,509	5.12
E.U.A.	32,209,277	333,010,910	10.34
China	30,478,998	163,118,097	5.35
Brasil	13,791,219	51,232,447	3.71
India	8,400,000	17,300,000	2.06
México	7,200,000	20,202,600	2.81
Argentina	2,337,175	13,121,380	5.61

País	Área cultivada de trigo (ha)	Producción de trigo (Mt)	Rendimiento (Mt/ha)
Mundial	225,437,694	681,915,838	3.02
China	24,210,075	114,950,296	4.75
India	28,400,000	80,680,000	2.84
Rusia	26,632,900	61,739,750	2.32
E.U.A.	20,181,081	60,314,290	2.99
Australia	13,507,000	21,656,000	1.6
Francia	5,146,600	38,324,700	7.45

País	Área cultivada de arroz (ha)	Producción de arroz (Mt)	Rendimiento (Mt/ha)
Mundial	161,420,743	678,688,289	4.2
India	44,100,000	131,274,000	2.98
China	29,932,292	197,257,175	6.59
Indonesia	12,883,576	64,398,890	5
Bangladesh	11,500,000	45,075,000	3.92
Tailandia	10,963,126	31,462,886	2.87
Viet Nam	7,440,100	38,895,500	5.23

El desarrollo de las culturas mesoamericanas está íntimamente ligado a la domesticación del maíz. Así como el maíz necesitó la intervención del ser humano para desarrollarse, también los antiguos pobladores necesitaron de la planta para sobrevivir. La idea de que los hombres fueron creados a partir del maíz reforzó esta unión.

El maíz tuvo su centro de origen en Mesoamérica. Los registros fósiles más antiguos datan de hace 8700 años y se encontraron en el valle del río Balsas en México (Piperno *et al.*, 2009). La teoría más aceptada acerca del origen del maíz implica varias etapas de domesticación a partir de una planta muy distinta en su morfología, pero muy cercana en su información genética, el teosinte (*Zea mays ssp. parviglumis*).

Además de su importancia y diversidad en la alimentación humana, el maíz forma parte de la alimentación animal por sí mismo o como ingrediente en la composición de piensos para aves, cerdos y vacas. Por otra parte, las hojas de maíz, una vez separada la mazorca, son utilizados como forraje (Paliwal *et al.*, 2001). El maíz también se utiliza en la fabricación de otros productos como biocombustible (etanol), aceite comestible, almidón, jarabe, dextrosa y jarabe de alta fructosa.

El maíz ha sido utilizado como organismo modelo en estudios biológicos, bioquímicos y genéticos. El ejemplo más notable es el de Barbara McClintock (Premio Nobel 1983 en Fisiología y Medicina), quien confirmó su teoría de recombinación genética por entrecruzamiento de los cromosomas durante la meiosis y descubrió la transposición genética utilizando maíz como modelo de estudio. Por otra parte, ha sido importante en el estudio de las propiedades de los telómeros, el silenciamiento epigenético y el origen del nucléolo. Otros estudios han sido fructíferos en el área de evolución y domesticación, un ejemplo de esto son las cruzas entre maíz y teosinte. También se han utilizado mutantes de maíz para definir genes importantes en ciclo celular y desarrollo de inflorescencia (Coe, 2001; Candela y Hake, 2008).

III.I.I. Morfología y fisiología del maíz

El maíz es una planta herbácea, monocotiledónea y anual de la familia de las poáceas, anteriormente llamadas gramíneas (Tabla 2). La planta está compuesta mayoritariamente por tejido foliar; las hojas forman una vaina larga arrollada íntimamente al tallo, del cual nacen 2 ó 3 espigas o mazorcas envueltas en espatas. En cada mazorca existen filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30 y su color desde amarillo claro hasta verde pardo. En el extremo del tallo se encuentran pequeñas inflorescencias con flores masculinas que se vuelven secas y pardas cuando se dispersa el polen (Paliwal *et al.*, 2001).

Mientras que la mayoría de las gramíneas tiene flores bisexuales, en el maíz existe una separación física entre las flores masculinas y femeninas, lo cual permite la

polinización cruzada. Gracias a la distribución de sus hojas, el maíz es capaz de aprovechar la luz del sol mejor que otras gramíneas.

Tabla 2. Clasificación taxonómica del maíz según la base de datos de plantas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	Zea
Especie	Zea mays

La semilla madura (cariopsis) de maíz está constituida por el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 1). El pericarpio es la capa externa del grano y se deriva de la pared del ovario, por lo que es genéticamente idéntico a la planta madre. El embrión y el endospermo están rodeados y sujetos por el pericarpio. El endospermo y el embrión contienen material genético proveniente del padre y de la madre, por lo que representan al individuo de la siguiente generación. El endospermo representa alrededor del 85 % del peso de la semilla y es la fuente de energía que nutre al embrión por varios días durante la germinación; se almacena en el grano en forma de gránulos intracelulares de almidón y como cuerpos proteicos. La capa más externa del endospermo consiste de una capa de células especializadas llamada aleurona; durante la germinación, las giberelinas producidas en el embrión permiten que las células de la aleurona liberen amilasas para hidrolizar el almidón y proveer de azúcares, los cuales son requeridos para iniciar el crecimiento. El embrión se encuentra en el lado del grano que da hacia la mazorca. El eje embrionario está constituido en su parte basal por la radícula, que dará origen a la raíz primaria, y en su parte apical por la plúmula, que dará origen al tallo. La plúmula comprende cinco o seis pequeños internodos y lleva lo que será una hoja en cada nodo. El escutelo surge del primer nodo y da lugar al cotiledón, el cual digiere y absorbe el endospermo en las primeras etapas del crecimiento. El coleoptilo surge del segundo nodo y deriva en una cubierta protectora para la plúmula. El

primer internodo de la columna del tallo (entre el nodo escutelar y el nodo coleoptilar) es llamado mesocotilo, el cual se alarga rápidamente durante la germinación permitiendo que el coleoptilo (conteniendo las primeras hojas) se eleve hacia la superficie de la tierra. La radícula está protegida por una estructura de vaina llamada coleorriza. Además de la raíz primaria, usualmente surgen dos o más raíces adventicias en la base del primer internodo del tallo (Vincent, 2002).

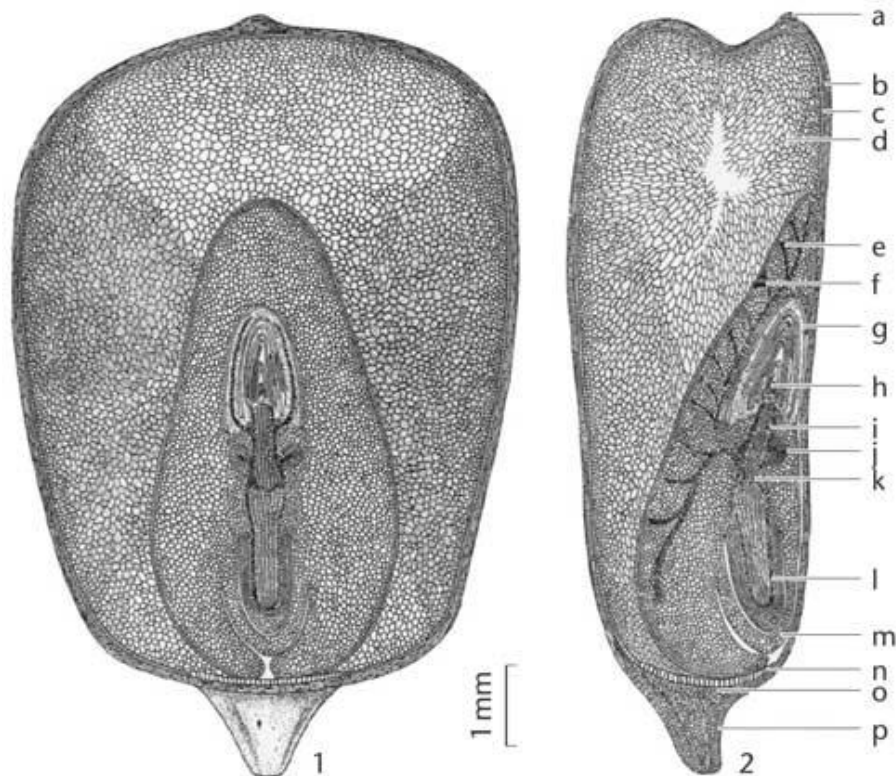


Figura 1. Secciones verticales de un grano maduro de maíz dentado visto de frente (1) y de lado (2). a) Cubierta del estilo, b) pericarpio, c) aleurona, d) endospermo, e) escutelo, f) capa glandular del escutelo, g) coleoptilo, h) brote de plúmula y hojas embrionarias, i) primer internodo, j) primordio de raíz adventicia, k) nodo escutelar, l) radícula (raíz primaria embrionaria), m) coleorriza, n) células conductoras basales del endospermo, o) capa de abscisión, p) pedúnculo. Tomado de Vincent, 2002.

III.I.I.I. Germinación de maíz

Puesto que la germinación se ha estudiado desde distintos enfoques, se han generado distintos conceptos para definirla. Para la agronomía, la germinación culmina cuando la plántula emerge de la superficie del suelo; para la fisiología vegetal, la germinación termina cuando protruye la radícula, aún cuando no haya comenzado la división celular ya que el crecimiento temprano de las células radiculares se debe a la elongación inicial.

De hecho, se ha observado que hay semillas que pueden desarrollar protrusión de la radícula sin ser semillas viables.

Desde un punto de vista más molecular, la germinación requiere restablecer condiciones aptas para el reinicio de la proliferación celular; es por ello que en nuestro grupo de trabajo hemos adoptado una definición de germinación en la cual una serie de procesos bioquímicos y moleculares comienzan con la entrada de agua a la semilla y culminan con la conclusión de la primera ronda de un ciclo celular exitoso.

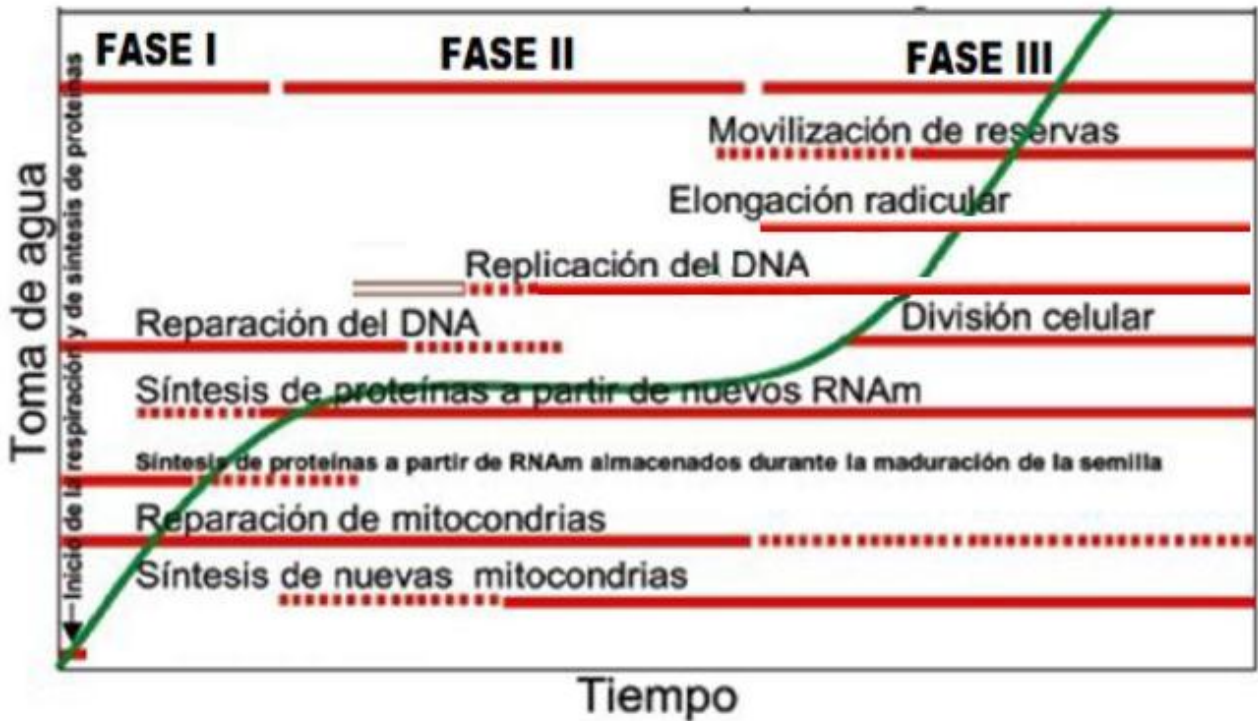


Figura 2. Fases de la germinación de semillas en relación con la toma de agua

La única condición que se requiere para el establecimiento de la germinación en semillas ortodoxas es la entrada de agua (Mayer y Poljakoff, 1975). Este proceso consta de tres fases llamadas comúnmente como fases de hidratación, germinación y crecimiento (Figura 2). La Fase I es rápida, mecánica e independiente del estado metabólico de la semilla, incluso ocurre en semillas muertas; se producen rupturas en las membranas internas por el cambio estructural de los lípidos de la membrana debido a las fuerzas de hidratación de los tejidos embrionarios, de las paredes celulares y de los organelos. Al reactivarse secuencialmente sus funciones; comienza la síntesis de proteínas a partir de mRNA preexistente y la síntesis de nuevos mRNAs, tRNAs y rRNAs; el incremento en la absorción de agua también está acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria (Ching, 1972). La fase II es lenta y acompaña los

procesos metabólicos descritos anteriormente; durante esta fase se observa una reducción casi total en la entrada de agua a la semilla, se disminuyen los procesos reparativos y se incrementa el número de mitocondrias, comienza la replicación de DNA y normalmente en esta fase comienza la protrusión de la radícula. La fase III se considera como un evento tardío; es una fase rápida que se relaciona con el proceso de elongación celular previo a la división celular y ya hay movilización de reservas de la semilla; en esta fase comienza el crecimiento de la planta, por lo tanto depende también de factores externos como la temperatura (Bewley y Black, 1994; Osborne, 1983).

La emergencia de la radícula se debe inicialmente a la elongación celular y posteriormente a la proliferación celular. Durante la germinación ocurre el crecimiento de las células y su posterior división. Para que las células puedan dividirse y así formar parte de los tejidos que constituyen una planta madura, deben ocurrir una serie de pasos que se conocen como ciclo celular. Se ha reportado que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacquard, 1974, Masubelele *et al.*, 2005). La síntesis replicativa nuclear del DNA en embriones de maíz comienza entre las 12 y 15 horas de imbibición, teniendo un máximo de actividad después de las 30 horas (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Georgieva *et al.*, 1991).

III.I.II. El genoma de maíz

La disponibilidad de la secuencia del genoma de maíz ha permitido estudiar familias génicas de una manera más amplia. En 2005, el Proyecto de Secuenciación del Genoma de Maíz comenzó la secuenciación de la variedad B73 basándose en clonas de fósquidos y BACs derivados de la integración de un mapa físico y genético (Wei *et al.* 2007, 2009) y de comparaciones con un mapa óptico (Zhou *et al.* 2009). En 2008 se completó la primera versión del genoma de maíz, la cual ha estado actualizándose gracias a la disponibilidad de datos nuevos (Schnable *et al.* 2009). La página web del Proyecto de Secuenciación del Genoma de Maíz (maizesequence.org) permite obtener bastante información acerca del genoma.

El genoma de maíz consta de 10 cromosomas y tiene un tamaño mediano (2500 Mb), similar al del genoma humano. Es de un tamaño mayor al de *Arabidopsis* y arroz, pero es pequeño en comparación con el genoma de trigo (15000 Mb) y de liliáceas (*Lilium longiflorum*, 90000 Mb). Se han predicho alrededor de 32 000 genes presentes en

el genoma de maíz, el cual está compuesto en su gran mayoría (85%) por cientos de familias de transposones, responsables de la amplificación de fragmentos génicos (Schnable *et al.*, 2009).

El genoma de maíz ha experimentado varias rondas de duplicación, incluyendo aquella del ancestro paleopoliploide hace alrededor de 70 millones de años (Paterson *et al.*, 2004) y un evento adicional de duplicación de genoma completo hace unos 5 - 12 millones de años (Blanc y Wolfe, 2004), la cual distingue al maíz de su pariente más cercano cuyo genoma se conoce, el sorgo ó *Sorghum bicolor* (Paterson *et al.*, 2009). El tamaño del genoma de maíz se ha expandido hasta 2,3 gigabases durante los últimos 3 millones de años debido a la proliferación de retrotransposones (San Miguel *et al.*, 1998); de hecho, la abundancia de retrotransposones en plantas fue descubierta en maíz (Kumar y Bennetzen, 1999). Aunque el 89 % del genoma de maíz muestra sintenia con los genomas de arroz y sorgo, sólo alrededor de 30 % de los genes de maíz tienen ortólogos en dichas plantas debido a múltiples eventos de pérdida individual de genes (Schnable *et al.*, 2009).

III.II Ciclo celular

El ciclo celular tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares, incluyendo las plantas (Dewitte y Murray, 2003).

El ciclo celular es una serie de eventos ordenados que conducen a la proliferación celular, la cual es necesaria para la culminación de la germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula; es decir, la formación de un nuevo organismo, y debe coordinarse de manera continua con la diferenciación celular durante el crecimiento de la planta.

La división celular está controlada por la progresión del ciclo celular, el cual consta de cuatro fases: la interfase post-mitótica (G1), la fase de síntesis de DNA (S), la fase post-sintética (G2) y la fase mitótica (M) (Figura 3). Existen 3 puntos de control principales en la progresión del ciclo: 1) en la transición G1-S la célula registra que el entorno sea favorable para comenzar a dividirse, 2) en la transición G2-M la célula examina que la síntesis de DNA ha concluido correctamente y que no han ocurrido daños en el DNA sintetizado, y 3) en la transición metafase-anafase, dentro de la fase M, la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente a los microtúbulos

del huso mitótico y estén alineados en el plano de metafase. Durante la mitosis la célula se divide, posteriormente cada una de las células hijas comienza un nuevo ciclo.

La maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular está comprendida, como en otros organismos eucariotes, por cinasas dependientes de ciclina (CDKs) que, junto con diferentes ciclinas (Cyc), forman complejos CDK-Cyc encargados de fosforilar una gran variedad de sustratos en los puntos de control G1-S y G2-M (Pines, 1995; Huntley y Murray, 1999), conduciendo al inicio de la replicación del DNA y la mitosis, respectivamente. La subunidad catalítica CDK es la encargada del reconocimiento del motivo blanco de fosforilación presente en la proteína sustrato, mientras que la subunidad reguladora Cyc juega el papel de discriminar distintas proteínas como sustratos (Jackman *et al.*, 2003; Inzé y De Veylder, 2006).

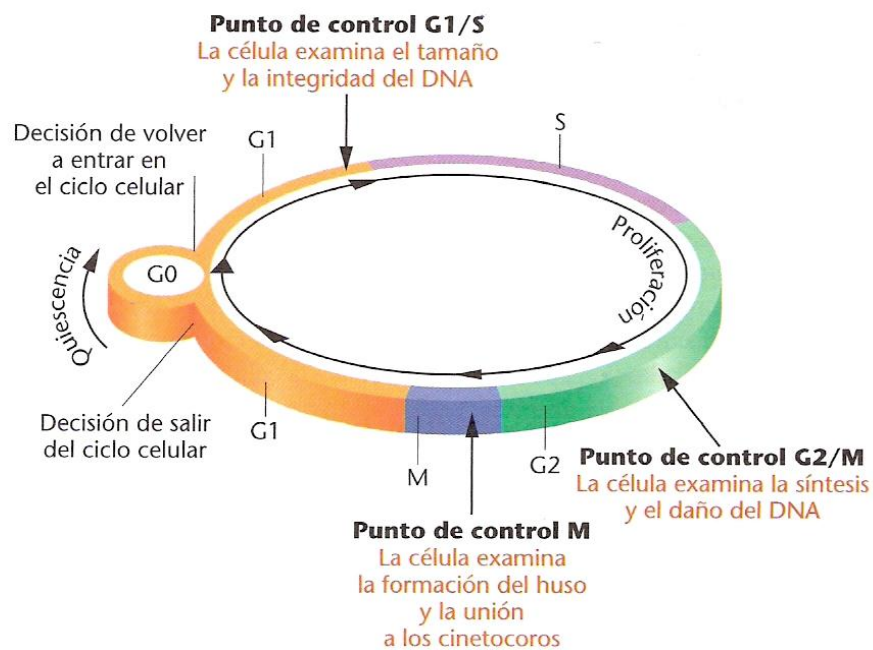


Figura 3. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control (Klug y Cummings, 1999).

Los estudios sobre ciclo celular en plantas han involucrado fundamentalmente especies dicotiledóneas, principalmente *Arabidopsis thaliana*. Se conoce muy poco sobre la regulación del ciclo celular en monocotiledóneas aunque el trabajo en arroz y maíz se ha enriquecido desde la publicación de la secuencia de sus genomas.

En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado más de 90 genes que regulan la progresión del ciclo celular, los cuales pertenecen a siete familias génicas: CDK, Cyc, CKS, CKI, E2F/DP, RB y Wee, siendo las familias de CDKs y ciclinas las que

comprenden más genes (Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Torres-Acosta *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005). Por su cercanía filogenética con genes ortólogos de otras especies, las ciclinas de *Arabidopsis* se han clasificado en los tipos A, B, C, D, H, L, T, P, SDS y J18, mientras que las CDKs se han clasificado en los tipos A, B, C, D, E, F, G y CKL (por CDK-like) (Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005). Así mismo, en el genoma de arroz se han identificado 90 genes pertenecientes a dichas familias génicas, que podrían estar involucradas en el control de su ciclo celular (La *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007).

Para que se lleve a cabo el proceso de germinación y la reanudación del desarrollo, se requiere que la división celular sea reactivada. En *Arabidopsis*, se distinguen cuatro fases de activación del ciclo celular durante germinación: en la fase I, la expansión celular dirige el crecimiento del embrión; en la fase II se activa la división celular en el ápice de la raíz y posteriormente protruye la radícula; en la fase III se activa la proliferación en los cotiledones y en el meristemo apical del tallo, y culmina con la emergencia de los cotiledones; finalmente, en la fase IV terminan las divisiones mitóticas y comienza la formación de primordios de hoja y de raíces laterales (Masubelele *et al.*, 2005).

El grupo de trabajo del Dr. Vázquez-Ramos de la Facultad de Química de la UNAM ha estado involucrado en estudios del ciclo celular en maíz, particularmente durante el proceso de germinación de la semilla (Gutiérrez *et al.*, 2005; Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006; Lara-Núñez *et al.*, 2008). En los últimos años se han dirigido los esfuerzos a caracterizar ciclinas D, debido a que, como reguladoras fundamentales de la fase G1 del ciclo, creemos que tienen una importancia fundamental en el establecimiento y avance de la germinación de semillas.

III.II.I Ciclinas

Las ciclinas son proteínas que se acumulan en momentos específicos del ciclo celular y luego son degradadas rápidamente. Se sabe que juegan un papel crítico en el control de la progresión del ciclo celular en eucariotes puesto que regulan la actividad de las CDKs.

La mayor parte de los organismos cuenta con diferentes grupos de ciclinas, las cuales tienen funciones especializadas. Por ejemplo, en células animales las ciclinas tipo B están implicadas en la entrada a mitosis (Minshull *et al.*, 1989) mientras que las ciclinas tipo D tienen un rol especial en la reentrada al ciclo celular en respuesta a señales

extracelulares (Sherr, 1994) y las ciclinas tipo E promueven la entrada a fase S (Geng *et al.*, 2003). En el genoma humano se han identificado al menos 22 ciclinas, que han sido divididas en 13 tipos: A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, T y UNG2 de acuerdo a similitud en secuencia y función (Nakamura *et al.*, 1995).

De acuerdo a su similitud con las ciclinas de animales, las ciclinas de plantas se han clasificado como tipos A, B, C, D, F, H, L, P, T, SDS y J18. Las ciclinas tipo C y J18 sólo se han encontrado en *Arabidopsis* y las ciclinas tipo F sólo se han encontrado en arroz (Barroco *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006).

El análisis de la familia de ciclinas en el genoma completo de arroz mostró que esta especie contiene 49 genes de ciclinas, las cuales se agrupan en 9 tipos: A, B, D, F, SDS, H, L, P y T, siendo el tipo D el que comprende un mayor número de ciclinas con 14 miembros (La *et al.*, 2006).

Las ciclinas tipo A y B son conocidas como ciclinas mitóticas y participan en la transición G2-M (Bursens *et al.*, 2000b), ambos tipos de ciclinas comprenden más miembros en plantas que en animales y se ha sugerido que en plantas tienen funciones más diversas. Por ejemplo, la ciclina Nicta;CycA3;2 de tabaco cumple con la función de ciclina E en animales y la ciclina Medsa; CycA2;2 de alfalfa se expresa en todas las fases del ciclo celular (Yu *et al.*, 2003; Roudier *et al.*, 2000). Las ciclinas tipo D se expresan mayoritariamente en G1 y algunas funcionan como mediadores de los estímulos internos con los estímulos ambientales para conducir la división celular (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Las ciclinas tipo F son específicas de monocotiledóneas y están relacionadas filogenéticamente con las ciclinas tipo A, B y D, por lo que se ha sugerido que cumplen funciones similares, sin embargo aún no se les atribuye una función fisiológica (La *et al.*, 2006). Las ciclinas tipo H tienen la función de subunidad reguladora de las CAKs (cinasas activadoras de CDKs), las cuales controlan positivamente la actividad de cinasa de las CDKs (Yamaguchi *et al.*, 2000; Shimotohno *et al.*, 2006). Las ciclinas tipo P están relacionadas con la ciclina PHO80 de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual está involucrada en la señalización de fosfato, y se ha postulado que integran el ciclo celular con el estado nutricional de la célula (Torres-Acosta *et al.*, 2004). Adicionalmente se han identificado otros tipos de ciclinas, con un 20 – 30 % de identidad al resto de las ciclinas, que han sido poco caracterizadas: la ciclina CycJ18 de *Arabidopsis* es capaz de complementar ciclinas G1 de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la ciclina SDS es específica de meiosis (Abrahams *et al.*, 2001; Azumi *et al.*, 2002)

Mediante el análisis del genoma completo de *Arabidopsis* se identificaron diez genes de ciclinas tipo D, los cuales se clasifican en seis grupos (Oakenfull *et al.*, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002). De ellas, *AtCycD2* y *AtCycD3* son las ciclinas más estudiadas (De Veylder *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Cockcroft *et al.*, 2000; Swaminatan *et al.*, 2000; Dewitte *et al.*, 2003).

Las plantas poseen menos tipos de ciclinas que los animales, pero la mayoría de esos tipos comprende más miembros. Por ejemplo, en *Arabidopsis* existen 10 diferentes genes de ciclinas tipo D y en arroz existen 14 genes (Renaudin *et al.*, 1996; Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004), mientras que en células de humano sólo existen 3 genes (Sherr, 1995). Es probable que existan rutas reguladoras de la división celular específicas de plantas.

No es clara la razón de la existencia de tantas ciclinas tipo D, aunque se puede especular que cada una tiene un tiempo específico de acción, o bien un tejido específico o principal de acción; es posible que cada una sea activada o reprimida por señales intra/extracelulares específicas pero también existe la posibilidad de que tengan funciones redundantes.

III.II.I.I Ciclinas tipo D

Las ciclinas tipo D tienen una función especial en el control de la reentrada al ciclo celular al percibir señales externas y del desarrollo y acoplarlas a las señales de proliferación (Inzé y De Veylder, 2006).

En animales, las ciclinas tipo D forman complejos con actividad de cinasa con CDK4 y CDK6, los cuales fosforilan a la proteína retinoblastoma (pRB) e inactivan la función de supresor de ésta sobre el factor de transcripción E2F, permitiendo la progresión de G1 hacia S (Harbour y Dean, 2000). Las señales mitogénicas regulan, a niveles transcripcional y traduccional, a los complejos CDK-CycD y controlan la estabilidad de las proteínas y el ensamblaje e importe de los complejos hacia el núcleo (Sherr y Roberts, 2004). Subsecuentemente, los complejos activos de CDK-CycD promueven la progresión de la fase G1 a S para llevar a cabo la proliferación celular.

Estudios recientes han revelado que en plantas se encuentra un patrón similar al de la vía ciclinas/pRB presente en animales (Grafi *et al.* 1996, Xie *et al.* 1996; Ramírez-Parra *et al.*, 1999). Las ciclinas tipo D controlan la ruta en la que están involucrados la proteína retinoblastoma (RB, en animales) o proteínas parecidas a RB (RBR, en plantas)

y los factores de transcripción E2F/DP (Figura 4). En células que no están en división, el factor E2F/DP está unido a la proteína RBR, la cual recluta desacetilasas de histonas que impiden la expresión de algunos genes. Cuando RBR es fosforilada por los complejos CycD-CDK se libera el complejo E2F/DP, que funciona como activador transcripcional permitiendo la expresión de genes requeridos para la transición de la fase G1 a S (Dyson, 1998; Sekine *et al.*, 1999; Uemukai *et al.*, 2005; Inzé y De Veylder, 2006). Las ciclinas D de plantas muestran una baja similitud en su secuencia proteica cuando se comparan con las de animales, sin embargo comparten atributos claves como su participación en la vía antes mencionada (Ramírez-Parra *et al.*, 1999).

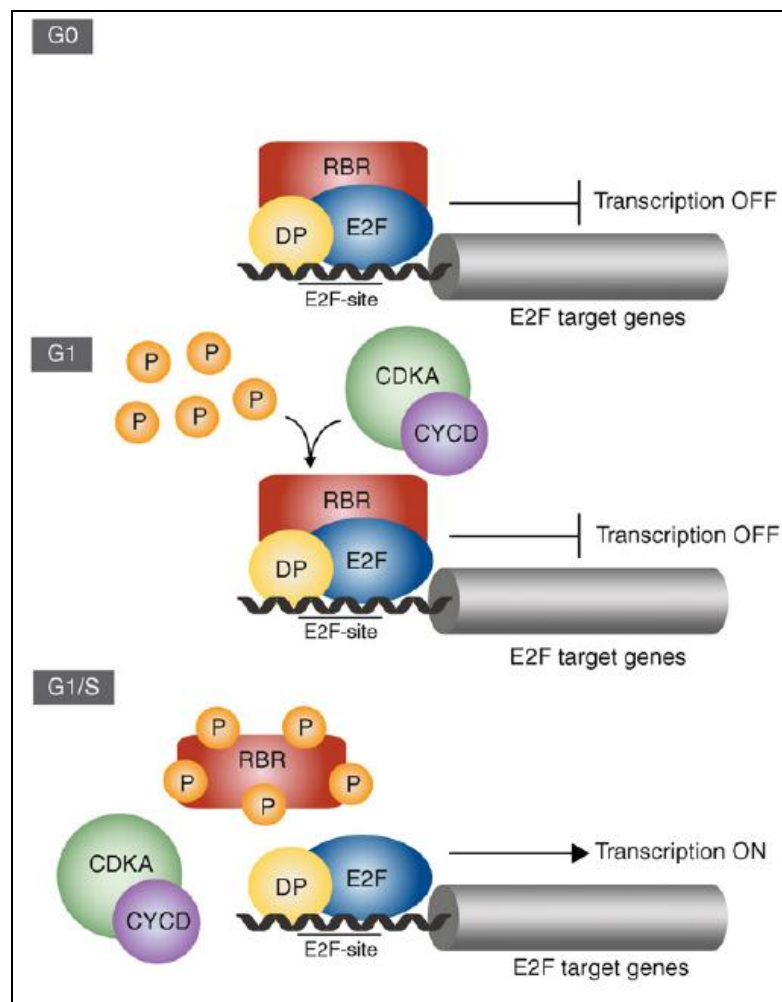






Figura 4. Modelo general de la regulación en la interfase G1-S de ciclo celular en eucariotes (Oakenfull *et al.*, 2002).

La transcripción de los genes blanco de E2F está bloqueada en G0 por la unión de RBR al dímero E2F-DP; cuando el complejo CYCD-CDK polifosforila a RBR, en la fase G1, se libera E2F permitiendo la expresión de genes de fase S y la progresión del ciclo celular

Las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de plantas, al igual que las de otros eucariotes, muestran una misma organización estructural típica (Figura 5), con una región conservada de 250 aminoácidos que es llamada centro de ciclina, el cual consiste de dos dominios llamados amino (N) terminal y carboxilo (C) terminal (Nugent, 1991; Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Menges *et al.*, 2007). El dominio amino terminal tiene una longitud aproximada de 130 aminoácidos y dentro de esta región se encuentra la secuencia conservada de ocho aminoácidos llamada caja ciclina, que sirve como sitio de unión a CDK. El dominio carboxilo terminal está presente en muchas pero no en todas las ciclinas, lo que sugiere que provee una función específica o adicional, pero quizá no crítica. Otra característica de las ciclinas es la presencia del motivo LxCxE de unión a la proteína RB, el cual se encuentra cercano al extremo N terminal y está presente en casi todas las secuencias de ciclinas tipo D. Algunas ciclinas tipo D de plantas también poseen cajas PEST que permiten su degradación por ubiquitinación; sin embargo ninguna de las cuatro CycDs reportadas de maíz cuenta con esta secuencia.



Figura 5. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas tipo D.  Dominio ciclina-N-terminal,  Dominio ciclina-C-terminal,  Caja ciclina,  LxCxE. Escala en número de aminoácidos. Modificado de Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008.

La función de las ciclinas tipo D en la reactivación del ciclo celular durante germinación ha sido poco estudiada. En *Arabidopsis*, la transcripción de las ciclinas tipo D se dispara en diferentes momentos de la germinación, siendo las ciclinas CycD3;2, CycD3;3 y CycD4;1 las que son activadas más tempranamente; la protrusión de la radícula se promueve en plantas que sobreexpresan estas ciclinas y se retrasa en aquellas plantas que las tienen mutadas, lo cual no ocurre con ciclinas activadas tardíamente como CycD3;1 (Masubelele *et al.*, 2005).

En el genoma humano sólo existen 3 genes que codifican ciclinas tipo D., sin embargo esta familia génica se ha diversificado en plantas. Las ciclinas tipo D de plantas se han clasificado en 7 grupos (D1-D7) de acuerdo a análisis filogenéticos realizados con miembros de esta familia génica presentes en varias especies de plantas. El genoma de *Arabidopsis* contiene 10 genes y el de arroz contiene 14 genes que codifican ciclinas tipo

D, teniendo al menos un gen dentro de cada uno de los 7 grupos (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006). En maíz sólo se han reportado 4 genes que codifican ciclinas D (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006) pero no se ha realizado una búsqueda de genes de esta familia en el genoma completo.

Existe un acuerdo para la nomenclatura de ciclinas de plantas, definido por Renaudin *et al.*, (1996): el nombre formal de cada gen está dado por la especie y la clase o tipo al que pertenece así como el número de miembro, y debe seguir las siguientes reglas:

- La notación de la especie debe estar en la forma de la abreviatura de Swissprot, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* = Arath, *Zea mays* = Zeama.
- La clase o tipo de ciclina está definida por su homología con las ciclinas reportadas en animales. Por ejemplo, ciclinas tipo A, B ó D.
- En plantas se reconocen 7 grupos de ciclinas D, llamados CycD1 – CycD7, definidos también por homología en secuencia.
- El número de miembro distingue múltiples genes dentro de un mismo grupo.
- El nombre del gen debe seguir la forma:
Especie-Cyc-Clase o tipo-Grupo-Núm. de miembro, por ejemplo, Arath; CycD1;1
- Se permite la introducción de subgrupos para secuencias con alto porcentaje de homología o funciones equivalentes. El subgrupo debe estar indicado por una letra minúscula al final del nombre.

III.III. Hormonas vegetales

Las fitohormonas u hormonas vegetales son moléculas señal que las plantas producen en concentraciones muy bajas y que regulan su crecimiento y metabolismo. Cada célula es capaz de producir dichas hormonas y éstas pueden ser transportadas a otros tejidos a través del tejido vascular. Existen distintos tipos de fitohormonas; cada uno de ellos tiene un efecto fisiológico distinto y se requiere en un lugar y tiempo específico en el desarrollo de una planta. Los tipos de fitohormonas más estudiados son las giberelinas, auxinas, citocininas, etileno y el ácido abscísico (ABA) (Figura 6).

Las auxinas fueron la primera clase de reguladores de crecimiento descubierta; constituyen uno de los factores principales en la integración de la división celular con la

diferenciación celular, favorecen la elongación celular alterando la plasticidad de la pared celular, promueven la iniciación de la raíz y el desarrollo de raíces laterales y adventicias (De Veylder *et al.*, 2007). También promueven la dominancia apical inhibiendo la formación de brotes laterales. Su distribución diferencial en tejidos se debe a la actividad de diferentes transportadores de auxinas (Petrásek y Friml, 2009). La auxina más común en las plantas es el ácido indolacético (IAA).

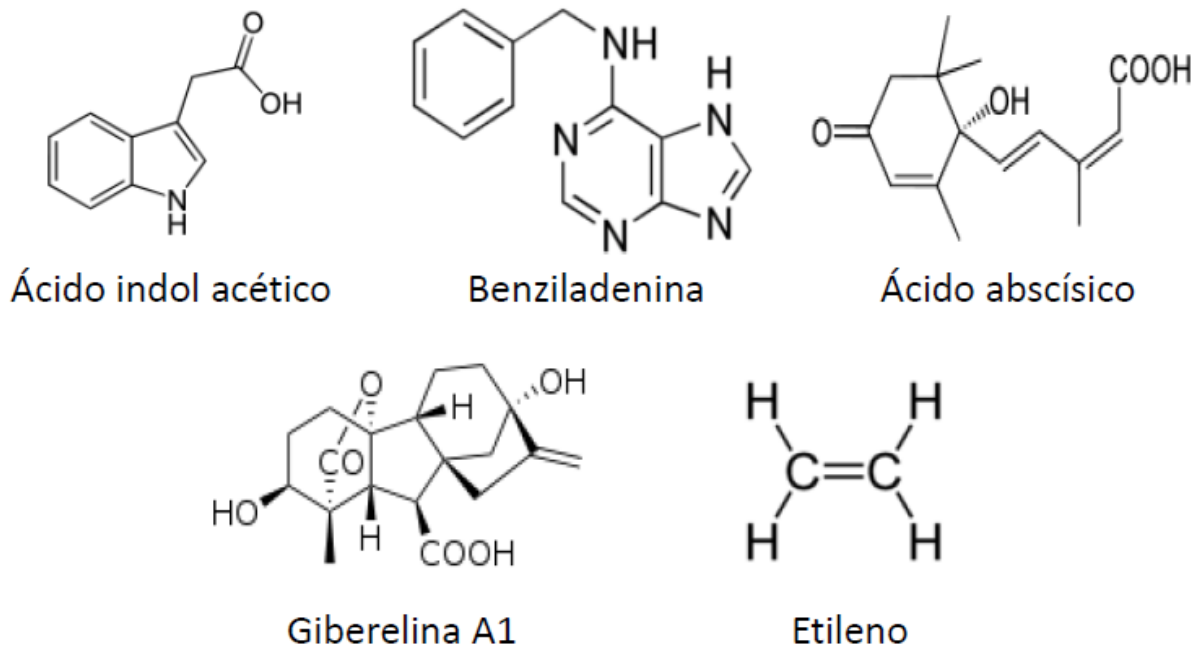


Figura 6. Los cinco grupos de fitohormonas mejor estudiados. Se muestra un ejemplo de auxina (ácido indol acético, IAA), citocinina (benziladenina, BA), ácido abscísico (ABA), giberelina (A1) y etileno.

Las citocininas fueron originalmente aisladas de células de levadura y fueron llamadas cininas (Miller *et al.*, 1956). Promueven la división celular, retardan el envejecimiento de tejidos y regulan el transporte de auxinas a lo largo de la planta (Van Staden, 1983). La relación auxinas/citocininas afecta una gran variedad de procesos en el crecimiento de la planta, muchas veces actuando en sinergismo. En presencia de auxinas se estimula la formación de tallos, raíces y frutos. En contraste con las auxinas, las citocininas estimulan el crecimiento de brotes laterales inhibiendo el crecimiento apical.

Las giberelinas fueron descubiertas como compuestos producidos por el hongo *Gibberella fujikuroi* que ocasionaban crecimiento anormal en plantas de arroz. Durante la germinación se producen giberelinas que son transportadas a la aleurona, donde inducen enzimas hidrolíticas permitiendo la movilización de reservas. También promueven

división celular y floración y revierten el efecto de ABA en la inducción de dormancia y la inhibición del crecimiento del tallo (Tsai *et al.*, 1997).

El ácido abscísico (ABA) debe su nombre a que fue descubierto como un compuesto que se encuentra en altas concentraciones en hojas recién caídas (de reciente abscisión). Se produce principalmente en hojas expuestas a stress y se asocia con la inhibición del crecimiento y la inducción de la dormancia (Feurtado *et al.*, 2004). Los niveles de ABA aumentan durante la embriogénesis y disminuyen durante la germinación y el crecimiento temprano; cuando la planta comienza a producir tallo y hojas, los niveles de ABA se incrementan de nuevo. También previene el estrés hídrico provocando el cierre de estomas (Yan *et al.*, 2007).

El etileno se forma a partir de la metionina en el ciclo de Yang, el cual ocurre en todas las células. Es el responsable de la maduración de frutos climatéricos (tomate, manzana, aguacate, etc) y de otros tejidos como las hojas, tallos y flores. También acelera la senescencia de los tejidos vegetales, estimula la germinación de semillas y está asociado con todas las situaciones de stress de la planta (temperaturas extremas, heridas, patógenos).

Además de estos cinco tipos de hormonas, existen otros reguladores del crecimiento vegetal como los brasinoesteroides, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, el óxido nítrico, las estrigolactonas y las poliaminas.

III.III.I. Efecto de algunas fitohormonas sobre la expresión de genes de ciclo celular

En la naturaleza, las plantas están expuestas constantemente a cambios ambientales a los cuales deben adaptarse para sobrevivir y producir una progenie sana.

La percepción de señales de stress biótico y abiótico activa cascadas de señalización que catalizan flujos iónicos, cascadas de fosforilación, generación de especies reactivas de oxígeno y acumulación de hormonas antimitogénicas como ABA y ácido jasmónico (JA).

En células BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*), la aplicación de JA y ABA antes de la transición G1-S inhibe la síntesis de DNA manteniendo las células en fase G1. Cuando JA es aplicado durante la fase S, la entrada a mitosis se inhibe; dicho efecto no se observa con la aplicación de ABA (Swiatek *et al.*, 2002).

El ABA es considerado un inhibidor de crecimiento en respuesta a factores de estrés como sequía (Cutler *et al.*, 2010). La adición de ABA a callos embriogénicos de maíz inhibe la progresión a fase S (Dudits *et al.*, 2011); en hojas de alfalfa, la actividad de CDK es reprimida por ABA, incluso en presencia de auxina y citocinina (Mészáros *et al.*, 2000). En contraparte, ABA activa distintos KRPs en Arabidopsis y alfalfa (Wang *et al.*, 2008; Pettkó-Szandtner *et al.*, 2006).

Por otra parte existe evidencia de regulación positiva de división celular por algunas fitohormonas. La aplicación exógena de citocininas en cultivos celulares de Arabidopsis ocasiona la acumulación de transcritos de ciclina A1 (Burssens *et al.*, 2000b) y Ciclina D3 (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). La expresión constitutiva de CycD3 fue capaz de inducir formación de callos en ausencia de citocininas, lo cual sugiere que la inducción de ciclo celular por citocininas involucra un aumento en la expresión de CycD3, aumento que es dependiente de la presencia de sacarosa (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999); sin embargo, los niveles de CycD2 son independientes de la adición o remoción de citocininas (Oakenfull *et al.*, 2002).

Plántulas de Arabidopsis tratadas con citocininas mostraron incremento en la expresión de CDKA, CYCD1;1 y CYCD2;1 e inhibición de KRP4 (Cho *et al.*, 2010). Por otra parte, las citocininas son necesarias para la progresión hacia la fase S y para la actividad de CDKA1;1 en cultivos celulares de alfalfa (Pasternak *et al.*, 2007). Aunque se ha reportado que CDKB1;1 de alfalfa, específica d G2-M, es funcional en ausencia de citocinina, esta hormona es esencial para la progresión G2-M en tabaco (Laureys *et al.*, 1998; Pasternak *et al.*, 2007).

La adición de ácido naftalenacético, una auxina, incrementa los niveles de transcrito de CycA2 de Arabidopsis (Burssens *et al.*, 2000b) e incrementa la división celular en petunia (*Petunia hybrida*) en un efecto combinado con citocininas, que no se observa cuando sólo se aplican citocininas (Trehin *et al.*, 1998).

En Arabidopsis, las auxinas promueven la formación de raíces laterales mediante la inducción de la entrada a ciclo celular. Las raíces tratadas con auxinas muestran un rápido incremento en la expresión de genes de fase G1 como E2Fa y CycD3;1, seguido de un incremento en genes de G2-M como las CDKs tipo B; paralelamente, los niveles de KRPs, inhibidores de CDKs, son reprimidos (Himanen *et al.*, 2002); estas respuestas trasccripcionales sugieren la activación de los complejos CYCD-CDKA y CYCA-CDKA, que a su vez, podrían mediar la degradación de E2Fc, la inactivación de Rb y la activación de los genes blanco de E2Fa provocando el paso de la fase G1 a la fase S.

Por otra parte, la inducción de CDKB y CycB podría promover el paso de la fase G2 a la fase M (De Veylder *et al.*, 2007). Se ha reportado que en bajos niveles de auxina, KRP2 inhibe la formación de raíces laterales; el incremento de auxina reduce los niveles de KRP2 y activa CYCD2;1, la cual es limitante en la formación de raíces laterales (Sanz *et al.*, 2011). También se ha observado que auxina se une directamente a una proteína de caja F, SKP2A (S-phase Kinase-Associated Protein 2A), induciendo su degradación dependiente de ubiquitina; la unión de auxina a SKP2A también promueve la degradación de E2Fc y la inducción de la división celular en meristemos de raíz de *Arabidopsis*, lo cual señala a SKP2A como un conector de la respuesta a auxina con el ciclo celular (Jurado *et al.*, 2010).

Los niveles de expresión de CycD3 también aumentan con la adición de brasinoesteroides en *Arabidopsis* (Hu *et al.*, 2000).

La adición de giberelinas incrementa la expresión de la histona H3 y de la ciclina mitótica CycOs1 en arroz (Sauter, 1997).

En maíz se ha observado que la adición de auxinas o citocininas induce diferencialmente la expresión de algunas ciclinas tipo D a nivel de transcrito (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).

IV. HIPÓTESIS

El genoma de maíz debe contener un número de genes de CycDs similar al contenido en los genomas de otras especies cercanas. Es probable que esta riqueza en ciclinas se deba a que algunas de ellas tengan un tiempo y/o lugar específico de acción y/o que respondan de manera diferente a las señales intra- o extracelulares.

V. OBJETIVOS

V.I. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la familia de ciclinas tipo D de maíz en cuanto al número de genes, filogenia, expresión génica y respuesta a algunos reguladores de ciclo celular.

V.II. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar a los genes que codifican ciclinas tipo D en el genoma de maíz.
2. Comparar sus secuencias proteicas y estructuras génicas con las de sus respectivos homólogos en secuencia de otras plantas.
3. Conocer sus perfiles de expresión génica durante germinación y en diferentes tejidos.
4. Determinar el efecto de la adición de algunas fitohormonas sobre sus perfiles de expresión.

VI. DESARROLLO DEL PROYECTO

1. Identificación de genes que codifican ciclinas D en el genoma de maíz y comparación de secuencias con sus ortólogos respectivos

1.1. Antecedentes

1.1.1. Ciclinas tipo D identificadas previamente en maíz y en otras plantas

A partir de la publicación de los genomas de *Arabidopsis* y arroz (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), ha sido posible estudiar de manera extensa la familia de ciclinas en estas plantas. Los genomas de plantas contienen un mayor número de genes que codifican para ciclinas que los genomas de animales, incluso el genoma tan pequeño de *Arabidopsis thaliana* codifica 10 CycAs, 11 CycBs y 10 CycDs (Nieuwland *et al.*, 2007).

En 2004, Wang *et al.* realizaron un estudio filogenético en el que compararon las 10 CycDs de *Arabidopsis thaliana* con las CycDs de otras plantas; de esta manera, clasificaron a todas las CycDs de plantas en 6 grupos: CycD1, CycD2/CYCD4, CycD3, CycD5, CycD6 y CycD7. En el mismo trabajo se identificaron algunas CycDs de otras plantas mediante búsquedas BLAST en el NCBI con la información disponible en ese momento; además de identificar las 14 CycDs presentes en el genoma de arroz, encontraron una CycD1 y dos CycD3 de *Antirrhinum majus*, una CycD2 y una CycD3 de *Chenopodium rubrum*, una CycD2 de *Daucus carota*, una CycD1 y una CycD3 de *Helianthus tuberosus*, dos CycD3 de *Lagenaria siceraria*, tres CycD3 de *Lycopersicon esculentum*, dos CycD3 de *Medicago sativa*, una CycD2 y tres CycD3 de *Nicotiana tabacum*, una CycD3 de *Pisum sativum*, una CycD1 de *Physcomitrella patens*, una CycD3 de *Populus alba*, una CycD3 de *Populus tremula* x *Populus tremuloides*, una CycD2 de *Triticum aestivum* y tres CycDs de *Zea mays*: Zeama;CycD2;1, Zeama;CycD4;1 y Zeama;CycD5;1.

Posteriormente se identificó en maíz un gen que codifica para una proteína con 75% de identidad a Zeama;CycD5;1, por lo que fue nombrado Zeama;CycD5;2 (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). En el transcurso de la elaboración del presente proyecto, se publicó un estudio sobre ciclinas de maíz en el que se identificaron 59 ciclinas, de las cuales 21 pertenecen al tipo D (Hu *et al.*, 2010); sin embargo este estudio presenta algunas inconsistencias, las cuales serán discutidas más adelante.

1.2. Metodología

1.2.1. Recopilación de datos

Las secuencias de los 10 genes de CycDs de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) y de los 14 genes de CycDs de arroz (*Oryza sativa*) fueron obtenidas de The Institute for Genomic Research [(<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>, TIGR Annotation Versión 5.0) y (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>, TIGR Rice Genome Annotation - Release 5), respectivamente]. Las secuencias de los 4 genes de CycDs de maíz (*Zea mays*) reportados previamente, así como la del gen de CycD de *Physcomitrella patens* fueron obtenidas del GenBank en la página web de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de acceso se muestran en el Anexo 1. La nomenclatura de los genes corresponde con la de Wang *et al.* (2004) y Menges *et al.* (2007), que difiere en algunos casos con la propuesta por La *et al.* (2006).

1.2.2. Obtención de las secuencias de las ciclinas tipo D de maíz

Para conocer la totalidad de genes que codifican ciclinas tipo D en el genoma de maíz, se realizó una búsqueda mediante BLAST en la base de datos del genoma de maíz (<http://www.maizesequence.org>) utilizando las secuencias proteicas de cada una de las ciclinas tipo D de arroz y *Arabidopsis* como secuencias *query*. De los resultados encontrados se escogieron aquellos con mayor porcentaje de identidad; el número de acceso correspondiente a cada gen de ciclina tipo D se muestra en el Anexo 2. Se consideraron sólo las variantes de splice que corresponden al transcrito más largo y se verificó que cada variante considerada tuviera un codón de inicio y un codón de término de la traducción. La ubicación cromosomal y la organización genómica de cada gen también fue obtenida de dicha base de datos.

1.2.3. Identificación de dominios

Para encontrar dominios específicos de ciclina y otro tipo de dominios como motivos LxCxE y motivos de unión a CDK, las secuencias proteicas fueron analizadas en los sitios web Functional Site Prediction for the Eukaryotic Linear Motif database (<http://elm.eu.org/>) y en PFAM 22.0 (<http://pfam.janelia.org/hmmsearch.shtml>); la

presencia de regiones PEST fue detectada usando PESTfind Analysis Web-tool (<https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>); los sitios de fosforilación putativos S/TP fueron encontrados utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.8 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

1.2.4. Comparación con ciclinas de otras especies. Análisis filogenético

Se realizó un alineamiento codon-wise de las secuencias proteicas de todas las ciclinas tipo D de maíz, arroz, Arabidopsis y *P. patens* utilizando Clustal W Multiple Alignment (Thompson *et al.*, 1994) en BioEdit; estos alineamientos múltiples de secuencias, en formato fasta, fueron importados en MEGA4.0 (<http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html>) y analizados con el método Neighbor - Joining utilizando las condiciones *default*, es decir, el modelo de sustitución de corrección de Poisson, Pairwise deletion y 500 réplicas de análisis Bootstrap para obtener árboles filogenéticos. Posteriormente se utilizó el programa FigTree v1.3.1 [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>] para modificar la apariencia del árbol filogenético.

La matriz de identidad de secuencias fue obtenida utilizando BioEdit y luego transformada a porcentajes.

1.3. Resultados

1.3.1. Identificación de genes, comparación con sus respectivos ortólogos y nueva nomenclatura

La búsqueda de genes de maíz homólogos en secuencia a los genes de ciclinas D de arroz indicó la presencia de 17 ciclinas tipo D de maíz (Tabla 3). De estos 17 genes, 4 corresponden a las ciclinas reportadas previamente (Zeama;CycD2;1, Zeama;CycD4;1, Zeama;CycD5;1 y Zeama;CycD5;2; Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006) aunque el porcentaje de identidad y el análisis filogenético realizado sugirió que la nomenclatura de estas ciclinas debería ser modificada.

Estos 17 genes de ciclinas tipo D de maíz pueden ser agrupados en los diferentes grupos de ciclinas D reportados para los ortólogos respectivos en Arabidopsis y arroz: CycD1, CycD2/CycD4, CycD3, CycD5, CycD6 y CycD7 (Figura 7). La presencia de al

menos un gen de cada subgrupo de ciclinas D está muy conservada (Oakenfull *et al.*, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Menges *et al.*, 2007), lo que sugiere una función específica para cada subgrupo.

Al igual que en *Arabidopsis* y en arroz, existen sólo una ciclina CycD6 y una ciclina CycD7, el número de miembros dentro de los otros subgrupos varía entre especies: en maíz, existe una ciclina CycD1, siete ciclinas CycD2/D4, dos ciclinas CycD3 y cinco ciclinas CycD5.

Tabla 3. Número de genes de cada grupo de ciclinas tipo D presentes en maíz, arroz y *Arabidopsis*.

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Zea mays</i>
D1	1	3	1
D2/D4	3	5	7
D3	3	1	2
D5	1	3	5
D6	1	1	1
D7	1	1	1
Total	10	14	17

Las nuevas ciclinas fueron denominadas de acuerdo a las reglas propuestas por Renaudin, *et al.* (1996) pero usando la similitud en secuencia y el resultado del análisis filogenético como criterio principal. De esta manera, la ciclina Zeama;CycD1;1 fue llamada así debido a que se agrupa con las ciclinas CycD1 de otras especies; en los casos en los que hay más de un miembro dentro de un subgrupo, el segundo número no corresponde al orden en que fueron identificados, como propone Renaudin *et al.* sino a la similitud con las ciclinas de otras especies, por ejemplo, la ciclina anteriormente llamada Zeama;CycD2;1 presenta mayor similitud a la ciclina CycD2;2 que a la CycD2;1 de arroz, mientras que una de las “nuevas” ciclinas es más cercana a la CycD2;1 que a la CycD2;2 de arroz, por ello el cambio de nomenclatura; de igual manera, las ciclinas anteriormente llamadas Zeama;CycD4;1, Zeama;CycD5;1 y Zeama;CycD5;2 corresponden a las

ciclinas Zeama;CycD4;2, Zeama;CycD5;3A y Zeama;CycD5;3B, respectivamente, en la nueva nomenclatura.

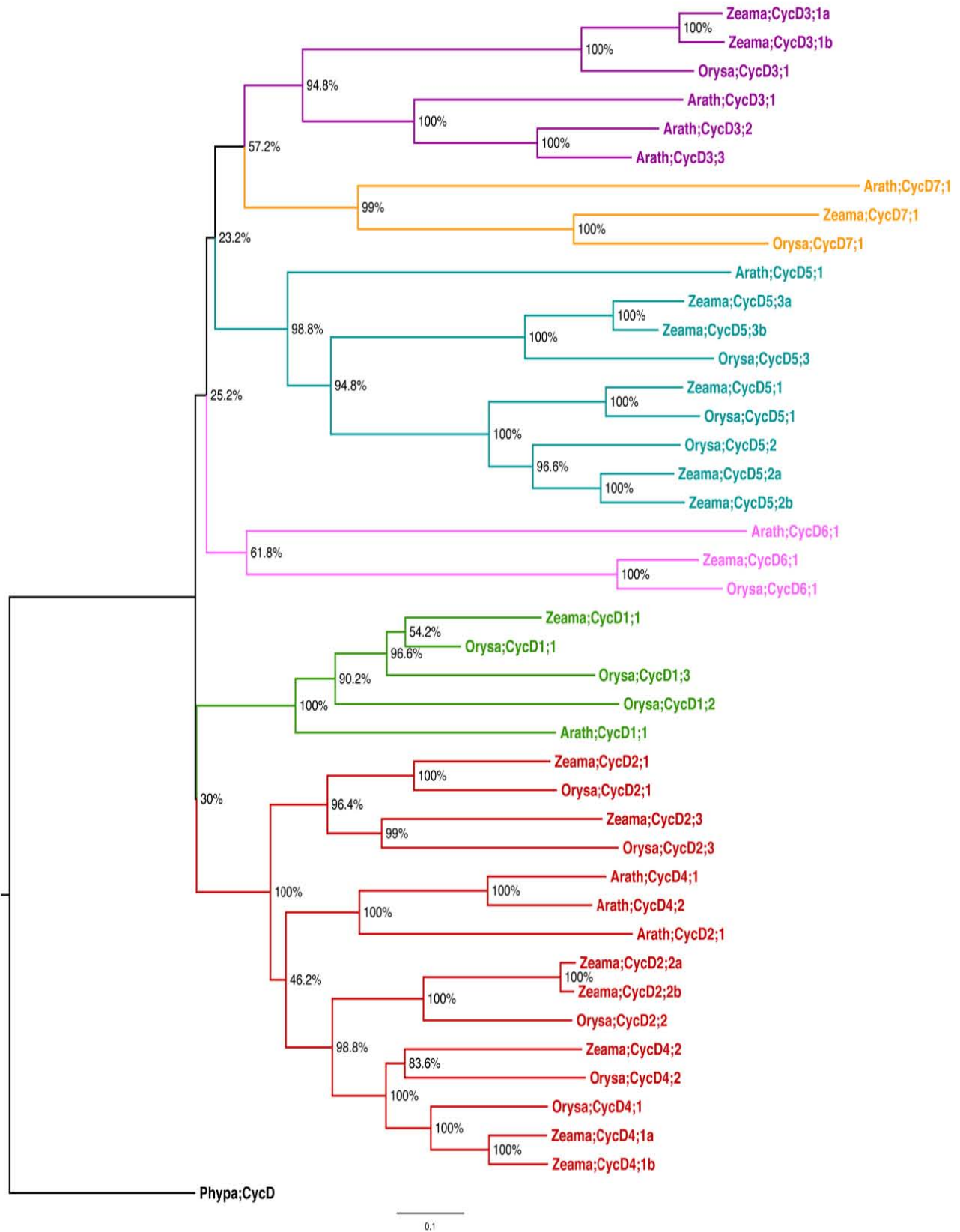


Figura 7. Árbol filogenético de las ciclinas tipo D de *Arabidopsis*, arroz y maíz enraizados con la ciclina tipo D de *P. patens*. Cada grupo de ciclinas tipo D está indicado con un color distinto.

La introducción de subgrupos en la nomenclatura de genes de CycDs fue necesaria en los casos de pares de genes de CycDs de maíz con alta identidad entre sí (>75%) y con sólo un gen ortólogo en arroz. Las ciclinas CycD2;2a y CycD2;2b fueron llamadas así debido a que tienen un alto porcentaje de identidad entre sí (94%) y ambas son muy semejantes a la ciclina CycD2;2 de arroz (60.1% de identidad). De la misma forma, los genes de CycDs de maíz ortólogos a *Oryza*;CycD3;1, *Oryza*;CycD4;1, *Oryza*;CycD5;2 y *Oryza*;CycD5;3 fueron llamados *Zeama*;CycD3;1a y *Zeama*;CycD3;1b (80% de identidad), *Zeama*;CycD4;1a y *Zeama*;CycD4;1b (82% de identidad), *Zeama*;CycD5;2a y *Zeama*;CycD5;2b (75% de identidad) y *Zeama*;CycD5;3a y *Zeama*;CycD5;3b (78% de identidad) (ver Figura 7 y Anexo 3). Estos últimos casos sugieren que los genes CycD2;2, CycD4;1, CycD3;1, CycD5;2 y CycD5;3 sufrieron duplicaciones en el genoma de maíz después de la divergencia de los genomas de arroz y maíz.

Con el fin de distinguir si cada CycD de maíz proviene de un gen distinto o representan variedades alélicas, se obtuvo la ubicación cromosomal de cada gen. Aunque *Zeama*;CycD2;2a y *Zeama*;CycD2;2b tiene 94% de identidad en secuencia proteica, su ubicación en cromosomas distintos es evidencia de que se trata de dos genes distintos. Lo mismo sucede con los otros pares de genes producto de duplicaciones recientes (Figura 8).

Los genes de ciclinas tipo D de maíz están distribuidos en 7 de los 10 cromosomas aunque la mayoría se encuentra en los cromosomas 1 y 7. Posteriormente a la divergencia entre los genomas de arroz y maíz ha habido 5 duplicaciones intercromosomales de genes de ciclinas D de maíz; no hay evidencia de duplicaciones intracromosomales.

El análisis filogenético con las ciclinas tipo D de maíz concuerda con análisis previos (Huntley y Murray, 1999; Oakenfull *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004) en *Arabidopsis* y arroz que sugieren que las ciclinas CycD2 y CycD4 pertenecen al mismo subgrupo. No hay evidencia de ortólogos distintivos entre monocotiledóneas y dicotiledóneas dentro del subgrupo CycD2/CycD4, lo que sugiere la existencia de sólo seis ancestros comunes de genes de ciclinas antes de la separación entre mono- y dicotiledóneas (Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2007).

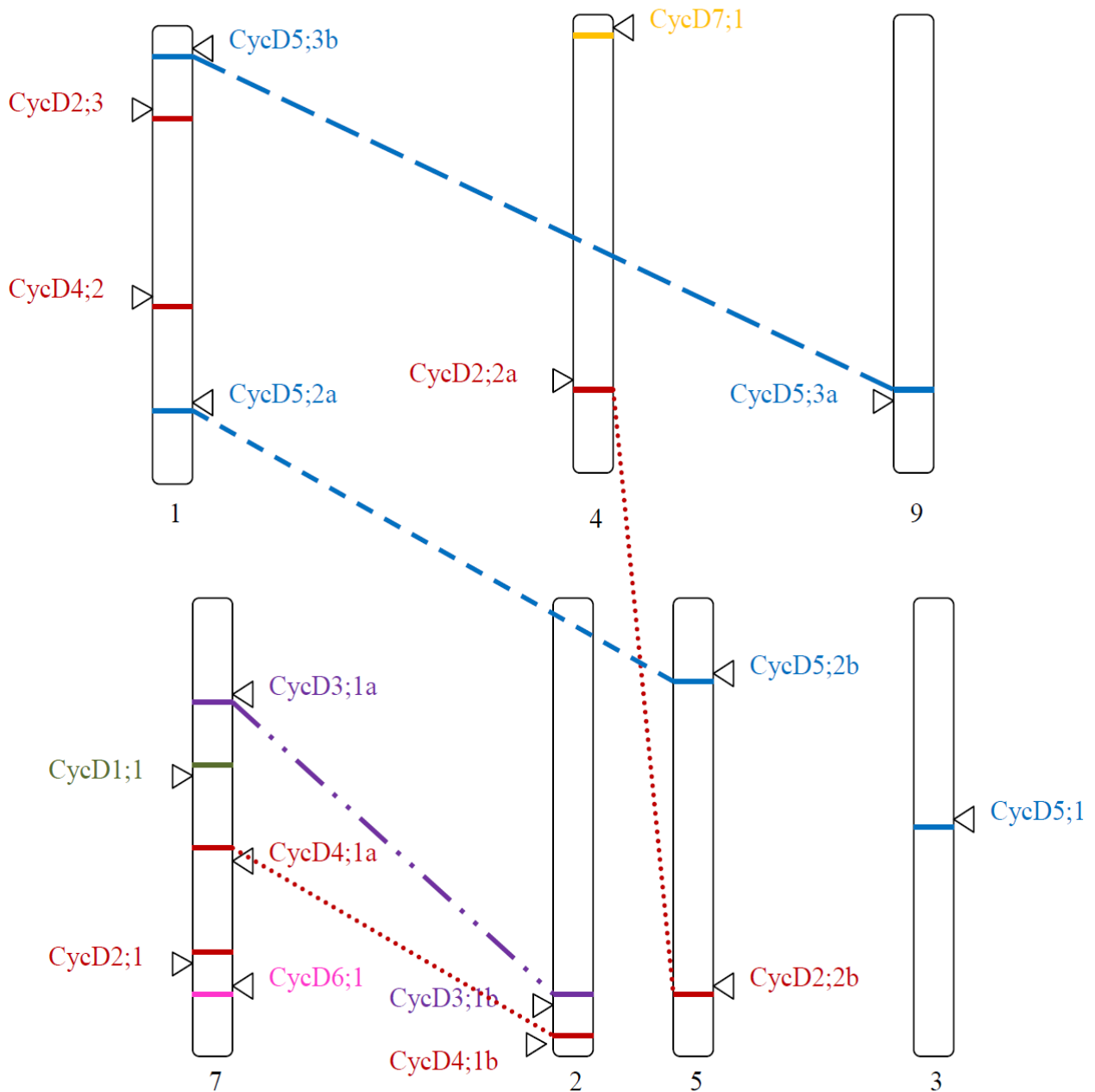


Figura 8. Ubicación cromosomal de los 17 genes de CycDs en el genoma de maíz. Se muestran líneas de unión entre las ciclinas D que son producto de duplicaciones recientes. Los números indican el número de cromosoma.

Como ya se había mostrado antes (Menges *et al.*, 2007), la ciclina tipo D del musgo *Physcomitrella patens* (Phypa;CycD, AJ488282), cuyo linaje divergió del de plantas vasculares hace unos 450 – 500 millones de años, muestra gran similitud con las ciclinas tipo D de angiospermas, lo que sugiere que su estructura podría corresponder con la del gen ancestro de plantas.

1.3.2. Análisis de secuencias proteicas: dominios y motivos

Las ciclinas en plantas, al igual que en otros eucariotes, poseen una región conservada llamada núcleo de ciclina, que comprende un dominio de ciclina cercano al extremo amino y otro cercano al extremo carboxilo, llamados ciclina_N y ciclina_C, respectivamente (Nugent *et al.*, 1991). El dominio ciclina_N es una región de alrededor de 130 aminoácidos y está presente en todas las ciclinas extendiéndose desde el primer exón hasta el cuarto exón (Figura 9A, Tabla 4 y Anexo 1); este dominio es necesario para que las ciclinas sean activas ya que al principio de esa región se encuentra la caja ciclina, que es un sitio de ocho aminoácidos mediante el cual las ciclinas se unen a las proteínas CDKs (Wang *et al.*, 2004; Nieuwland *et al.*, 2007). Las 17 ciclinas tipo D de maíz contienen el dominio ciclina_N, así como la caja ciclina al inicio de tal dominio (Figura 9A, Tabla 4 y Anexo 1). Por otro lado, el dominio ciclina_C está presente en la mayoría de las CycDs de maíz, arroz, *Arabidopsis* y *Physcomitrella patens*, pero no se encuentra en 11 de las 42 CycDs, especialmente en los subgrupos CycD3 y CycD5 (Orysa;CycD1;1, Zeama;CycD3;1a, Zeama;CycD3;1b, Orysa;CycD3;1, Arath;CycD3;1, Arath;CycD3;2, Zeama;CycD5;3a, Zeama;CycD5;3b, Orysa;CycD5;3, Arath;CycD5;1 y Zeama;CycD7;1), lo que sugiere que este dominio no es esencial para la actividad de las ciclinas pero podría tener una función específica (Wang *et al.*, 2004).

En estudios previos se ha mostrado que existen cinco aminoácidos en el dominio ciclina_N, en los exones 1, 2, 3 y 4 que son esenciales para la actividad de ciclinas mitóticas; tales aminoácidos están conservados también en las ciclinas tipo D. Esos 5 aminoácidos son una arginina (R) que se encuentra antes del inicio del dominio ciclina_N y que corresponde a la hélice 1 (H1) de la estructura de la proteína ciclina A; un ácido aspártico (D) como parte de un motivo DRF correspondiente a la hélice H2; una leucina (L) como parte de un motivo QL y una lisina (K) como parte de un motivo K(V/M)EE correspondientes a la hélice H3; y un ácido glutámico (E) correspondiente a la hélice H5 (Jeffrey *et al.*, 1995; Renaudin *et al.*, 1996). Las secuencias proteicas de las ciclinas de maíz aquí reportadas también poseen los aminoácidos conservados en las otras ciclinas (Figura 9A y Anexo 4).

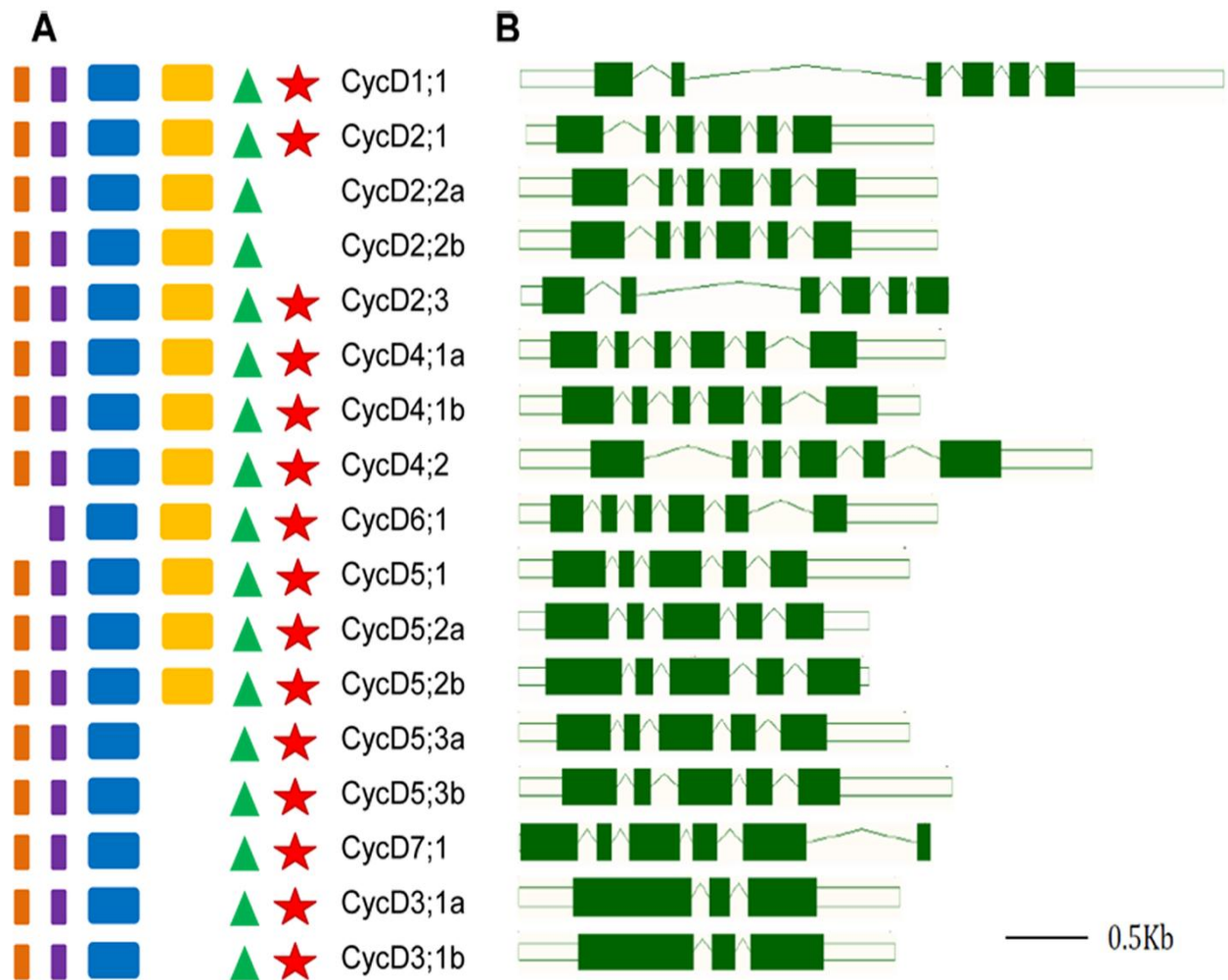


Figura 9. Dominios proteicos y organización genómica de las ciclinas tipo D de maíz. (A) Dominios y motivos característicos de ciclinas encontrados en las CycDs de maíz: motivo LxCxE de unión a RB (rectángulo naranja), caja ciclina (rectángulo púrpura), dominio ciclina_N terminal (rectángulo azul), dominio ciclina_C terminal (rectángulo amarillo), aminoácidos esenciales para estructura de ciclinas (triángulo verde), sitio de fosforilación equivalente al T191 de la ciclina Nicta;CycD3;3 (estrella roja); (B) organización genómica mostrando exones (barras verdes), intrones (líneas verdes) y UTRs (barras blancas).

Las ciclinas tipo D de animales y casi todas las ciclinas tipo D de plantas contienen un motivo de unión a la proteína RB que consiste en una secuencia consenso LxCxE cercana al extremo amino (Ewen *et al.*, 1993; Soni *et al.*, 1995). Algunos estudios en plantas han demostrado que las CycDs se unen a la proteína RBR (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998; Nakagami *et al.*, 1999, 2002; Boniotti y Gutiérrez, 2001; Koroleva *et al.*, 2004; Kawamura *et al.*, 2006).

Todas las ciclinas tipo D de maíz poseen la secuencia LxCxE excepto Zeama;CycD6;1 (Figura 9A y Tabla 4). Interesantemente, las CycD6 de arroz, de *Arabidopsis* y de álamo (*Populus trichocarpa*) tampoco poseen tal secuencia, lo que sugiere que esto puede ser una característica especial para este subgrupo (Menges *et*

al., 2007). Es probable que las CycD6 actúen en una vía distinta a la de RBR – E2F. En este contexto, es interesante la observación de que la ciclina CycD6;1 de *Arabidopsis* está más implicada en establecer patrones celulares en raíz que en proliferación celular (Sozzani *et al.*, 2010).

Tabla 4. Dominios y motivos específicos de ciclinas encontrados en las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de maíz. Los sitios de fosforilación equivalentes a T191 de *Nicta*;CycD3;3 están en negritas; los sitios conservados entre las ciclinas CycD2/CycD4 y CycD3 están en itálicas; los sitios que se encuentran en regiones PEST están subrayados; los sitios consenso de fosforilación por CDK (S/TPxR/K) están entre paréntesis.

	Ciclina_N (aa, valor E)	Ciclina_C (aa, valor E)	LxCxE (aa)	Caja ciclina (aa)	PEST potencial (aa, valor E)	PEST pobre (aa, valor E)	Sitios de fosforilación por CDK putativos
Zeama;CycD1;1	45-178 (1.5e-28)	180-299 (4.2e-09)	LLCAE (8-12)	ILKVQEYY (83-90)	----	----	S57, T181 , T240, S247, S311, S321
Zeama;CycD2;1	54-186 (1.8e-27)	188-292 (2.1e-07)	LLCGE (12-16)	ICKVHSYY (93-100)	----	----	T189 , S291, S297, S343
Zeama;CycD2;2a	69-204 (2.4e-30)	206-313 (5.8e-07)	LLCAE (12-16)	IWKVIEHY (111-118)	----	----	(T38), S317, S339
Zeama;CycD2;2b	64-199 (2.2e-29)	201-306 (8e-07)	LLCAE (12-16)	IWKVIEHY (106-113)	----	----	(T35), S312, S334
Zeama;CycD2;3	52-193 (8e-24)	195-309 (1.2e-05)	LLCEE (12-16)	IKKAQAYH (94 – 101)	----	----	T196 , (S298), S336
Zeama;CycD4;1a	53-185 (2.3e-30)	187-305 (7e-05)	LLCAE (13-17)	IWKVHTCY (92-99)	335 – 349 (+10.68)	----	T188 , S307
Zeama;CycD4;1b	57-189 (1.4e-29)	191-311 (1.8e-06)	LLCGE (13-17)	IWKVHAYY (96-103)	----	1 – 40 (+1.76), 342 – 355 (+0.98)	T192 , S311, S349
Zeama;CycD4;2	60-193 (1.1e-28)	195-309 (3.2e-05)	LLCAE (13-17)	IWKAYTHH (99-106)	----	----	S42, T196 , S307, S314, S357
Zeama;CycD3;1a	72-190 (4.4e-15)	----	LYCPE (11-15)	ASRAAARL (86-93)	----	328 – 357 (+1.34)	T193 , S300, S304, S351
Zeama;CycD3;1b	68-183 (1.4e-17)	----	LYCPE (11-15)	VSRAAARL (83-90)	----	----	T186 , S297, S301, S341
Zeama;CycD5;1	78-193 (2.1e-20)	195-326 (1.1e-07)	LTCEE (17-21)	ILETRGCF (101-108)	57 – 91 (+11.39)	13 – 57 (+0.39)	T196 , S272
Zeama;CycD5;2a	75-202 (1.5e-23)	204-329 (3.7e-05)	LMCLE (18-22)	VLETRAYF (109-116)	----	----	S71, S75, T205 , T277, S300, (T302)
Zeama;CycD5;2b	83-209 (1.5e-24)	211-328 (1.2e-05)	LTCLC (18-22)	VFETQAYF (116-123)	----	324 – 357 (+4.75), 73 – 106 (+4.02)	S70, S77, T212 , S285, (T311), S333
Zeama;CycD5;3a	75-188 (5.5e-25)	----	LICLE (21-25)	IIKTTAMF (95-102)	----	313 - 346 (+0.52)	T16, T191 , T249, S287, S314, S316, (S349)
Zeama;CycD5;3b	63-188 (4.8e-22)	----	LICLE (23-27)	IIKTTAMF (97-104)	----	73 - 91 (+3.81), 295 – 333 (+3.51), 160 – 178 (+0.21)	T18, T191 , T250, S288, S309, S311, T325, (S341)
Zeama;CycD6;1	39-158 (6.1e-18)	160-259 (1.2e-05)	----	ISKVRFGG (63-70)	----	9 - 43 (+4.03)	S28, T161 , S207, T270
Zeama;CycD7;1	74-202 (3.9e-19)	----	LYCDE (7-11)	IIFYAFGRLL (108-115)	403 – 426 (+5.83), 1 – 52 (+5.04)	84 – 105 (+4.85)	T19, T205 , T216, T321, S339, S415

Se cree que las ciclinas son proteínas que se acumulan en tiempos específicos del ciclo celular y luego son degradadas. Se ha visto que *Arath;CycD3;1* es degradada por una ruta dependiente del proteasoma (Planchais *et al.*, 2004); por su parte, las ciclinas D de humano son degradadas por proteólisis mediada por ubiquitinación, un mecanismo en el que la glucógeno sintetasa cinasa 3 β (GSK3 β) fosforila el residuo Thr-286 localizado en un dominio PEST (una región hidrofílica rica en Pro [P], Glu [E], Ser [S] y Thr [T]), esta fosforilación también es importante para que *CycD1* sea exportada al citoplasma (Diehl y Sherr, 1997; Diehl *et al.*, 1997, 1998; Germain *et al.*, 2000). En *Arabidopsis*, todas las ciclinas tipo D, con excepción de *Arath;CycD4;2*, poseen al menos un dominio PEST pobre (PESTfind score ≥ 0) (Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2006, 2007); sin embargo 3 de las 14 *CycDs* de arroz y 8 de las 17 *CycDs* de maíz no presentan ni una región PEST pobre, además de que sólo 4 *CycDs* en *Arabidopsis*, 6 en arroz y 3 en maíz poseen regiones PEST potenciales (Tabla 4), lo que sugiere que algunas ciclinas pueden ser degradadas por la vía de proteasoma mientras que otras podrían ser degradadas por otras rutas o su regulación podría depender de otros mecanismos.

Tabla 5. Ubicación de los motivos D-box en las ciclinas tipo D de maíz

Ciclina	Posición	E	Referencia
CycD1;1	272-281	0.83	CYCA
CycD2;2b	311-319	0.62	Securina
CycD2;3	171-178 277-284	0.47 0.58	Geminina Geminina
CycD4;1a	266-273	0.37	Geminina
CycD4;1b	270-277	0.38	Geminina
CycD5;2a	188-197	0.40	CYCA
CycD5;2b	354-363	0.56	CYCA
CycD5;3a	344-351	0.28	Geminina
CycD5;3b	336-343	0.28	Geminina
CycD6;1	147-156 147-155	0.026 0.85	CYCA CYCB

Existe otro tipo de motivos llamados D-box (*Destruction-box*) que son ubiquitinados y reconocidos por APC/C ocasionando la degradación de las proteínas que los contienen; sin embargo, APC/C es activo sólo en etapas tardías del ciclo celular, entonces sólo puede degradar proteínas que estén presentes en mitosis, como se ha observado con las ciclinas tipo B (Eloy *et al.*, 2006; van Zon *et al.*, 2010). Puesto que el análisis de las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de maíz indicó que 10 de ellas poseen al menos un motivo D-box (Tabla 5) y se ha observado presencia de proteína de

algunas ciclinas tipo D en etapas tardías del ciclo celular (Kono *et al.*, 2003), existe la posibilidad de que puedan ser degradadas por APC/C.

En tabaco, la fosforilación de la Thr-191 de CycD3;3 es importante para la actividad de cinasa del complejo CycD/CDK y para importe nuclear (Nakagami *et al.*, 2002). También se ha probado que la Ser-343 de Arath;CycD3;1 es fosforilada bajo varios estados de crecimiento; este es uno de cinco sitios putativos de fosforilación por cinasas dirigidas por prolina (Pro-DKin) –basados en el motivo conservado S/TP– en esa ciclina, de los cuales tres se encuentran en regiones PEST (Menges *et al.*, 2006). En la Tabla 4 se muestran los sitios putativos de fosforilación Pro-DKin en las CycDs de maíz, casi todos (64/76) se encuentran del inicio del dominio ciclina_C hacia el extremo carboxilo.

El sitio de fosforilación más conservado es el equivalente a la Thr-191 de Nicta;CycD3;3 que se encuentra al inicio del dominio ciclina_C; está presente en todas las ciclinas de maíz, Arabidopsis, arroz y *P. patens* excepto en Zeama;CycD2;2a, Zeama;CycD2;2b, Orysa;CycD2;2 y Arath;CycD7;1, estas cuatro ciclinas tienen el residuo Thr pero carecen de la prolina que los expondría a la fosforilación. Existe un motivo SP alrededor de la posición 300 que está conservado en las CycD2/CycD4 y CycD3 de maíz, el cual podría ser un sitio de fosforilación específico para estos subgrupos. Sólo Zeama;CycD2;2a, Zeama;CycD2;2b, Zeama;CycD2;3, Zeama;CycD5;2a, Zeama;CycD5;3a y Zeama;CycD5;3b tienen un sitio de fosforilación consenso por CDK pero se ha probado que en algunas proteínas basta con los dipéptidos mínimos S/TP para ser fosforilados por CDK (Nash *et al.*, 2001; Moses *et al.*, 2007). Así mismo, sólo 6 de las 17 ciclinas de maíz poseen sitios putativos de fosforilación Pro-DKin dentro de regiones PEST. La ausencia de cajas PEST en muchas de las ciclinas D de maíz indica que quizá no sean degradadas necesariamente durante la transición G1/S; su regulación podría depender más de su asociación con su CDK correspondiente o de la presencia de inhibidores de CycD/CDKs.

1.3.3. Organización genómica

La organización exón – intrón de las ciclinas tipo D de maíz, incluyendo a las nuevas aquí reportadas, corresponde con la estructura altamente conservada en las CycDs de angiospermas y musgos (Figura 9B, Anexos 5 y 6). La distribución y longitud de exones e intrones está conservada entre monocotiledóneas (arroz y maíz) y dicotiledóneas

(*Arabidopsis*), así como con el gen *Phypa;CycD* del musgo *Physcomitrella patens*. En 2007, Menges *et al.* mostraron que esta estructura no está conservada en los genes *CycD* de algas, por lo que propusieron que la estructura del gen *Phypa;CycD* representa la del gen ancestro de ciclinas tipo D en plantas.

El gen *Phypa;CycD* comprende seis exones (1, 276 pb; 2, 87 pb; 3, 99 pb; 4, 202 pb; 5, 128 pb; 6, 291 pb); esta estructura está conservada en casi todos los miembros de los subgrupos *CycD1*, *CycD2/4* y *CycD6* de angiospermas, con excepción de dos ciclinas tipo D de arroz, *Orysa;CycD1;1* y *Orysa;CycD2;3*. La primera es de menor tamaño y su secuencia proteica termina cerca del final del cuarto exón, en tanto que *Orysa;CycD2;3* parece haber incorporado 3 exones y 3 intrones antes de su último exón, resultando en una estructura de 9 exones y un tamaño mayor.

El análisis de Menges *et al.* (2007) sobre las *CycD3* muestra que todos los miembros de ese grupo en *Arabidopsis* y álamo (*Populus trichocarpa*) tienen 4 exones con una longitud conservada de los exones centrales (2, 202 pb; 3, 131 pb) y que el exón 1 representa los exones 1 – 3 de la estructura ancestral sugiriendo la fusión de dichos exones cuando apareció el gen *CycD3* original en angiospermas; con este análisis extendido a las ciclinas de maíz, se muestra que los exones 1 – 3 se fusionaron con el exón 4 cuando apareció el gen *CycD3* original en monocotiledóneas. Así mismo, la fusión de los exones 3 y 4 de los genes *CycD5* también se observa en los cinco genes *CycD5* de maíz, resultando en una estructura génica de cinco exones.

La estructura genómica de las ciclinas *CycD7* es característica para cada una de las 3 especies: *Arath;CycD7;1* tiene sólo 4 exones, *Orysa;CycD7;1* tiene 5 exones y *Zeama;CycD7;1* tiene 6 exones. La ciclina de *Arabidopsis* parece haber fusionado a lo largo de la evolución sus exones 3-4 y 5-6, por ello tiene menos exones que la estructura del gen ancestro pero un tamaño de proteína parecido; de igual manera, la ciclina de arroz perdió su cuarto intrón resultando en la fusión de sus exones 4 y 5. Por otra parte, la ciclina de maíz también fusionó los exones 3-4 de la estructura original pero parece haber incorporado un sexto intrón y un séptimo exón, por ello el tamaño de la proteína es mayor.

Existen dos características conservadas en casi todas las estructuras genómicas de las ciclinas analizadas: (1) en todos los genes, excepto en los del subgrupo *CycD3*, el primer exón termina en una posición constante que se encuentra dentro de la caja ciclina, necesaria para unirse a CDK, y (2) el dominio ciclina_N termina a la mitad del

cuarto exón en todos los genes, y poco más adelante comienza el dominio ciclina_C en aquellos donde está presente.

2. Expresión génica bajo diferentes condiciones ambientales

2.1. Antecedentes

Aunque el conocimiento acerca de la regulación de los genes que participan en ciclo celular en plantas es extenso, los estudios se han enfocado sólo a conocer los efectos de un solo tipo de stress en varios genes o al efecto de varios tipos de stress sobre uno o pocos genes. No existen trabajos que caractericen una familia de genes, como las ciclinas tipo D, en cuanto a su expresión diferencial y regulación diferencial en respuesta a factores ambientales.

2.1.1. Regulación del ciclo celular de plantas por factores ambientales

Las señales exógenas afectan tanto las tasas de crecimiento como la división y expansión celular. Por ejemplo, en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) expuestas a déficit de agua, la elongación de la hoja es menor y la actividad mitótica en células del mesófilo de la primera hoja también está reducida (Schuppler *et al.*, 1998). Otros estudios en raíces de maíz (*Zea mays*; Sacks *et al.*, 1997) y girasol (*Helianthus annuus*; Robertson *et al.*, 1990) expuestas a stress por déficit de agua encontraron efectos similares y una participación de ácido abscísico (ABA) en la inhibición del ciclo celular. En maíz, el déficit de agua prolonga la duración del ciclo celular como resultado de reducción en la actividad de CDK (Granier *et al.*, 2000).

El stress salino, el cual también puede estar mediado por ABA, ocasiona plantas de menor tamaño con menos raíces laterales. A nivel molecular, redujo los niveles de expresión de algunos genes de ciclo celular en Arabidopsis, particularmente de las ciclinas A2;1 y B1;1 y redujo el número de células en división en los meristemos de raíz (Bursens *et al.*, 2000a; West *et al.*, 2004).

La generación artificial de stress oxidativo, por aplicación de menadión, en cultivos celulares BY-2 y plantas de tabaco interrumpe la replicación y retrasa la entrada a mitosis (Reichheld *et al.*, 1999).

En células de perejil (*Petroselinum crispum*), la luz UV reduce la expresión de los genes CDKA, ciclina B, e histonas H1, H2, H3 y H4 (Logemann *et al.*, 1995).

En cultivos celulares de tabaco y perejil tratados con elicitores fúngicos, la actividad de ciclo celular también está inhibida (Logemann *et al.*, 1995; Kadota *et al.*, 2004). El elicitador criptogeína interrumpe el ciclo celular en las fases G1 ó G2 provocando muerte celular.

En hojas de girasol, el alargamiento del ciclo celular debido a envejecimiento celular está ligado a un arresto de núcleos en la fase G1 del ciclo celular sin cambios en la duración de las fases G2, S y M (Granier y Tardieu, 1998). En contraste, la temperatura afecta la duración de todas las fases del ciclo celular, sin acumulación preferencial de núcleos en ninguna fase (Tardieu y Granier, 2000).

Distintos tipos de estrés inducen la expresión de EL2 y SIM, los cuales son inhibidores de CDKs homólogos en arroz y Arabidopsis, respectivamente (Peres *et al.*, 2007). Se ha propuesto que estos inhibidores conectan la progresión del ciclo celular con la percepción de estrés.

La sacarosa también es una molécula importante en la regulación de los genes involucrados en ciclo celular. La adición de sacarosa a cultivos celulares de Arabidopsis induce la expresión de CycD2 y CycD4 (Soni *et al.*, 1995; De Veylder *et al.*, 1999). En cultivos de células en estado quiescente, a los que se les añadió sacarosa, los niveles de mRNA de CycD2 se incrementaron en la fase G1 temprana mientras que los de CycD3 se incrementaron en la interfase G1-S (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000).

En células animales, la progresión del ciclo celular requiere la señalización de Ca^{2+} , esta señalización se ve alterada en cáncer (Roderick y Cook, 2008). En células de tabaco, un incremento en la concentración de Ca^{2+} puede regular la progresión del ciclo celular en respuesta a estrés oxidativo o estrés hipoosmótico (Sano *et al.*, 2006; Dudits *et al.*, 2011)

Además de los diferentes tipos de stress y de la disponibilidad de azúcares, el ciclo celular también está regulado por la señalización de diferentes fitohormonas (ver sección III.III.I. Efecto de algunas fitohormonas sobre la expresión de genes de ciclo celular).

2.1.2. Expresión génica de ciclinas tipo D de maíz

Durante la germinación de maíz, la mayoría de las células entran a la fase G1 en las primeras horas y comienzan a entrar a la fase S después de las 12 - 15 h, tiempo en el cual se incrementa la síntesis de DNA (Baíza *et al.*, 1989, Reyes *et al.*, 1991) y se elevan las cantidades de PCNA (Herrera *et al.*, 2000); las células en fase M son visibles después de 28 h, cuando protruye la radícula (Baíza *et al.*, 1989).

Como parte de los trabajos anteriores, se han clonado cuatro diferentes ciclinas D de maíz, que fueron nombradas CycD2;1, CycD4;1, CycD5;1 y CycD5;2, las cuales hemos llamado CycD2;2a, CycD4;2, CycD5;3a y CycD5;3b respectivamente, en el presente trabajo (ver sección 1). Las cuatro CycDs mostraron niveles de mRNA diferentes durante la germinación y en diferentes tejidos de plántulas de 8 días, sugiriendo que no actúan de manera redundante (Figura 10). La adición por separado de una citocinina y una auxina (BA e IAA, respectivamente) durante germinación incrementó, en algunos casos drásticamente, sus niveles de mRNA (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).

Los estudios se han ampliado a la observación de la conducta de las correspondientes proteínas ciclinas durante la germinación, tanto en condiciones control como en presencia de BA e IAA exógenos. Para nuestra sorpresa, la adición de fitorreguladores no modifica significativamente los niveles de proteína de ninguna de las ciclinas, y por el contrario, algunas muestran una ligera reducción de niveles (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008). Por lo tanto, no existe correlación entre el nivel de mRNA y la cantidad de proteína observable para ninguna de estas ciclinas. Interesantemente, la actividad de cinasa asociada a los complejos CDK-CycD sí responde positivamente a la adición de fitorreguladores, por lo que podemos concluir que, al menos en esas cuatro ciclinas, los fitorreguladores actúan tanto a nivel de expresión génica en las ciclinas como a nivel de activación de los complejos CDK-CycD (Lara-Núñez *et al.*, 2008).

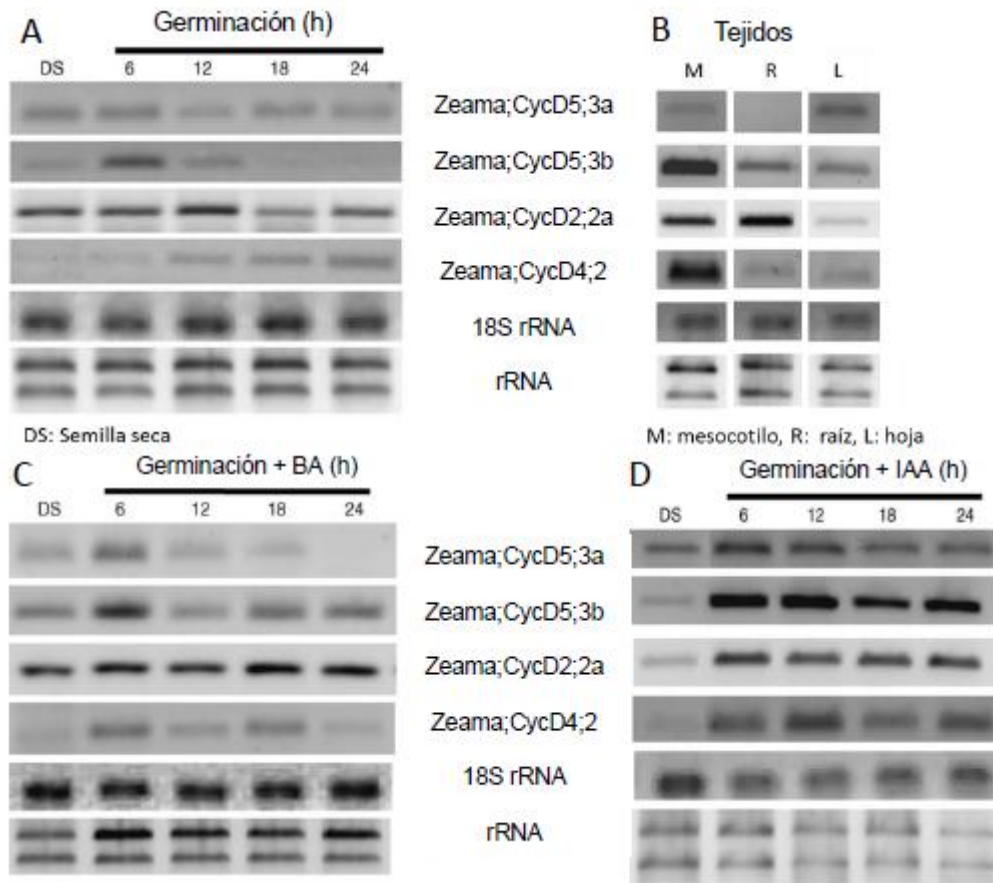


Figura 10. Patrón de expresión de las cuatro CycDs de maíz reportadas previamente. RT-PCR de las CycDs de maíz usando (A) RNA de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos, (B) RNA de diferentes tejidos de plántulas de 8 días, (C) RNA de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos adicionados con BA 1 μ M y (D) RNA de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos adicionados con IAA 0.1 μ M. Se muestran los productos amplificados de 18S rRNA y el RNA utilizado como controles. Modificado de Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006.

2.2. Metodología

2.2.1. Material vegetal y extracción de RNA

Se utilizaron lotes de 15 ejes embrionarios extraídos de semillas de maíz var. Chalqueño; cada lote fue lavado con hipoclorito de sodio al 0.5% y luego lavado con agua estéril. Posteriormente, cada lote fue puesto en una caja Petri con 1.5 mL de buffer de imbibición (50 mM Tris-HCl pH 6.2, 2% sacarosa, 10 mM MgCl₂) e incubado por diferentes tiempos (0, 8, 16 y 24 h) a 25 °C. Para probar el efecto de las fitohormonas, se añadió

benziladenina (BA) al 1 μM o al 10 μM , ácido indolacético (IAA) al 0.1 μM o al 1 μM , ó ácido abscísico (ABA) al 50 μM al buffer de imbibición.

Para conocer la expresión en tejidos, se pusieron a germinar 50 semillas de maíz var. Chalqueño con agua, luz constante y a 25 $^{\circ}\text{C}$; después de 8 días se cortaron diferentes tejidos (mesocotilos, puntas de raíz y puntas de primeras hojas) de plántulas sanas.

El RNA total de cada lote de ejes y de cada tejido cortado fue obtenido utilizando el reactivo Trizol, siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen).

2.2.2. Búsqueda de elementos de respuesta a fitohormonas en los promotores

Se obtuvieron secuencias de 2000 nt, *upstream* del sitio de inicio de la transcripción de cada una de las ciclinas tipo D de maíz, según la base de datos Maize Sequence; posteriormente se efectuó una búsqueda de cada uno de los elementos de respuesta a auxinas, a citocininas y a ABA, reportados en PLACE Database (Higo *et al.*, 1999), en cada una de las regiones promotoras.

2.2.3. Ensayo de incorporación de la timidina

Se incubaron lotes de 10 ejes embrionarios en buffer de imbibición, conteniendo alguna de las hormonas y ^3H -Timidina (50 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ buffer), por 15 h a 25 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, los ejes fueron lavados con agua desionizada y homogenizados en un mortero a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 1 mL de solución de lisis (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1M, SDS 0.5%). El homogenizado se pasó a un tubo de ensayo, se le añadió 1 mL de TCA 20% y se dejó a 4 $^{\circ}\text{C}$ por una hora; transcurrido dicho tiempo, se filtraron los homogenizados y se lavaron cuatro veces con TCA 5 % y dos veces con etanol 90 %. Los filtros se secaron a 60 $^{\circ}\text{C}$ por una hora, en seguida, se introdujeron a frascos viales, se agregó 5 mL de solución de centelleo (POP 0.1 g/L) y se cuantificó la incorporación de timidina en un contador de centelleo.

2.2.4. RT-PCR

Para estudiar los niveles de expresión de cada gen de ciclina de forma comparativa, se realizaron experimentos RT-PCR utilizando el kit OneStep RT-PCR de QIAGEN. Se utilizaron 100 ng de RNA total para cada reacción. Los *primers* y las condiciones de

reacción utilizados para amplificar cada gen se muestran en el Anexo 7. Los productos de reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. La toma de imágenes y densitometría se realizaron usando el programa Quantity One en el equipo Fluor-S Multilmager (Bio-Rad). Se hicieron 3 réplicas para cada ensayo; se muestran sólo los resultados del último ensayo por ser el más representativo.

Para el análisis estadístico de los experimentos con hormonas, los valores de cada muestra se calcularon como unidades relativas tomando en cuenta el valor de densitometría de la muestra embebida por 8 h sin hormonas (Control 8 = C8) como 1.0. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de correcciones de Bonferroni para comparar pares de muestras (C8 vs BA8, C8 vs IAA8, C8 vs ABA8, C16 vs BA16, C16 vs IAA16 and C16 vs ABA16). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

2.3. Resultados

2.3.1. Patrones de expresión de ciclinas tipo D en germinación y en tejidos

Los patrones de expresión de las 4 CycDs de maíz previamente descritas fueron publicados en 2006 por Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos (Figura 10). En el presente trabajo se estudiaron los niveles de transcrito de los 13 genes de ciclinas tipo D de maíz restantes durante el proceso de germinación, así como en diferentes tejidos de plántula; para esto se diseñaron *primers* específicos para cada ciclina (Anexo 7) y se llevaron a cabo experimentos RT-PCR. También se estudió el perfil de expresión del gen de CycD2;2a de maíz (previamente descrito como CycD2;1) como control adicional. Cada ensayo de análisis de expresión fue normalizado utilizando el gen de r18S como control de carga.

Se detectó la presencia de mRNA de 11 de las 13 ciclinas tipo D aquí estudiadas en ejes embrionarios de maíz en germinación y al menos en uno de los tejidos de plántula; sus perfiles de expresión y las cantidades de transcrito fueron diferentes para cada una, lo que sugiere que no son redundantes, al menos en su totalidad (Figura 11A).

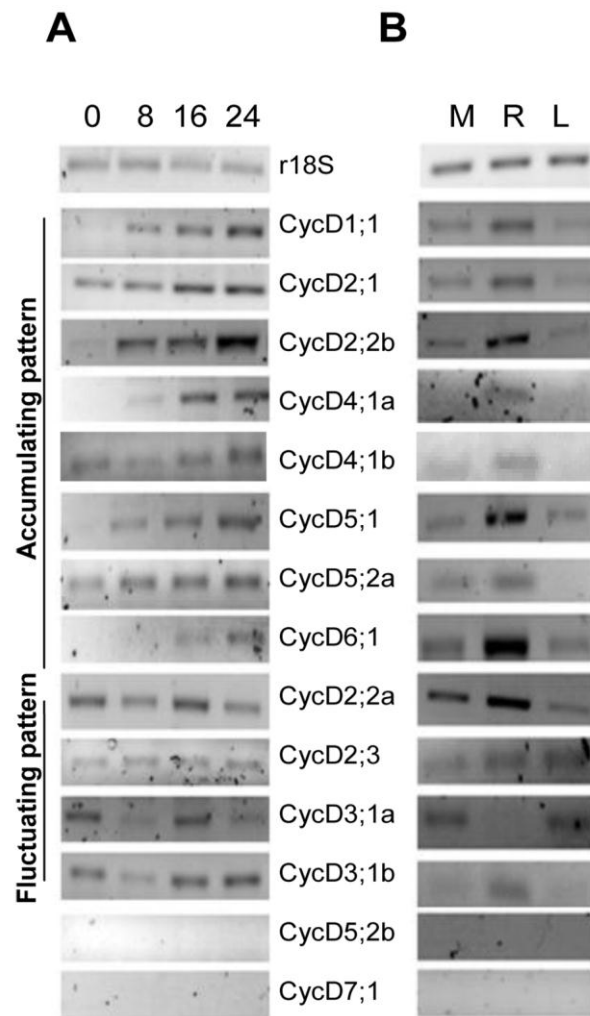


Figura 11. Perfiles de expresión de los genes CycD de maíz. (A) Patrones de expresión obtenidos de experimentos de RT-PCR semicuantitativos en ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 8, 16 y 24 h. (B) Patrones de expresión obtenidos de experimentos de RT-PCR semicuantitativos en mesocotilo (M), puntas de raíz (R) y primera hoja (L) de plántulas de una semana. Se muestran las imágenes más representativas de tres réplicas biológicas independientes.

Las once ciclinas que fueron detectadas estuvieron presentes en semilla seca, aunque CycD1;1, CycD2;2b, CycD4;1a, CycD5;1 y CycD6;1 estuvieron presentes en muy bajos (o casi indetectables) niveles. Los niveles de transcrito de la gran mayoría de las ciclinas incrementaron con la imbibición aunque con diferente cinética siendo visibles claramente después de 8 h o 16 h de imbibición, lo cual concuerda con un incremento en la actividad metabólica y con el establecimiento del ciclo celular (Baíza *et al.*, 1989).

Los experimentos RT-PCR en germinación indicaron que ocho de las once CycDs detectadas mostraron un patrón de acumulación de transcrito, mientras que las otras tres

mostraron fluctuación o no mostraron cambios significativos (Figura 11A). La ciclina CycD2;2a fue incluida como control y mostró un patrón similar al reportado previamente (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). De manera paralela, la Dra. Ilenia Rentería realizó experimentos de PCR tiempo real de algunas ciclinas con patrones de acumulación y patrones de no acumulación y los resultados fueron similares a los obtenidos por RT-PCR semicuantitativo, corroborando estos resultados (Anexo 8).

Por otra parte, se estudió la expresión de las ciclinas en tres diferentes tejidos de plántula: meristemos de raíz (~5 mm desde la punta), mesocotilos y primeras hojas verdaderas. Al igual que en germinación, se detectó la presencia de las mismas diez ciclinas, mientras que CycD5;2b y CycD7;1 no fueron detectadas en ninguno de los tejidos (Figura 11B).

El patrón de expresión en tejidos de cada ciclina fue diferente. Como se esperaba, la gran mayoría mostró niveles altos de transcrito en tejidos proliferativamente activos como las puntas de raíz y bajos niveles en hoja. Interesantemente, la ciclina CycD3;1a mostró exactamente el patrón opuesto. Los experimentos de PCR en tiempo real confirmaron el patrón de esta y otras cuatro ciclinas (Anexo 8).

Aunque la funcionalidad de los *primers* para las ciclinas CycD5;2b y CycD7;1 fue demostrada con la amplificación de los fragmentos de DNA genómico correspondientes; sus transcritos no fueron detectados en ninguno de los tejidos analizados. Los fragmentos de DNA genómico esperados con los *primers* para CycD5;2b y CycD7;1, de 1114 pb y 714 pb respectivamente, fueron amplificados por PCR en DNA genómico. Sin embargo, los fragmentos de mRNA esperados, de 666 pb y 533 pb respectivamente, no pudieron ser obtenidos; en el caso de la ciclina CycD7;1, se observa una banda de ~400 nt, amplificada por RT-PCR, que no corresponde con la única forma de splice reportada para este gen (Figura 12). Lo anterior puede deberse a que ambas ciclinas estén presentes en niveles muy bajos, que estén presentes en otros tejidos no analizados, que sean transcritos sólo bajo ciertas condiciones ambientales o del desarrollo de la planta o que sean pseudogenes.

Los perfiles de expresión observados para todas las ciclinas tipo D de maíz nos permiten establecer que no existe una correlación entre los 6 grupos de CycDs de plantas con un perfil de expresión específico bajo las condiciones estudiadas.

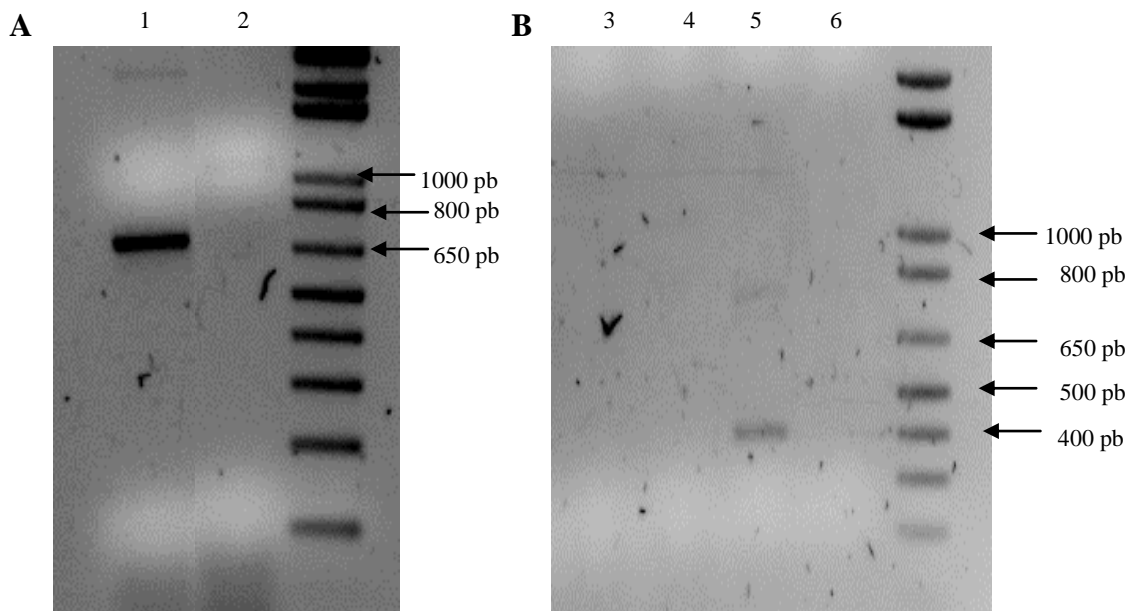


Figura 12. Funcionalidad de los primers para CycD5;2b y CycD7;1.

(A) PCR de CycD7;1 (carril 1, 714 pb) y CycD5;2b (carril 2, 1114 pb) en DNA genómico. (B) RT-PCR de CycD5;2b (carriles 3 y 4, 666 pb) y CycD7;1 (carriles 5 y 6, 533 pb) utilizando 60 C (carriles 3 y 6), 62 C (carril 4) y 58 C (carril 5) como temperatura de alineamiento y 41 ciclos de reacción en RNA de 24h de germinación.

2.3.2. Efecto de la adición de hormonas sobre la expresión de ciclinas tipo D

Una probable explicación a la existencia de tantos genes que codifican para ciclinas tipo D en plantas es que respondan de manera diferencial a distintas condiciones ambientales, por ejemplo, diversos tipos de stress o a la variación en los niveles de fitohormonas. Como una primera aproximación a la posible respuesta de las ciclinas tipo D a la adición de hormonas, detectamos que la presencia de elementos de respuesta a auxinas, citocininas y ABA en los promotores de dichos genes es diferencial. En la Figura 13 se muestra la distribución de elementos de respuesta a lo largo de la región promotora de cada ciclina.

Se puede observar que algunas ciclinas como CycD4;1b y CycD5;3a poseen muchos elementos de respuesta a dichas fitohormonas, mientras que otras ciclinas como CycD2;2b, CycD2;3 y CycD4;1a poseen muy pocos. Con base en la presencia de estos elementos, puede suponerse que las auxinas incrementarían los niveles de transcripción de algunas ciclinas: CycD1;1, CycD2;1, CycD4;1b, CycD4;2, CycD5;2 a y b, y CycD5;3 a y b; las citocininas aumentarían la expresión de CycD5;2b, CycD5;3b y CycD6;1, mientras que ABA afectaría la transcripción de CycD3;1b, CycD4;1b y de CycD5;1. Cabe mencionar que la presencia de estos elementos de respuesta no implica que estos sean

necesariamente funcionales; por otro lado, podría haber elementos de respuesta aun no reportados en las bases de datos.

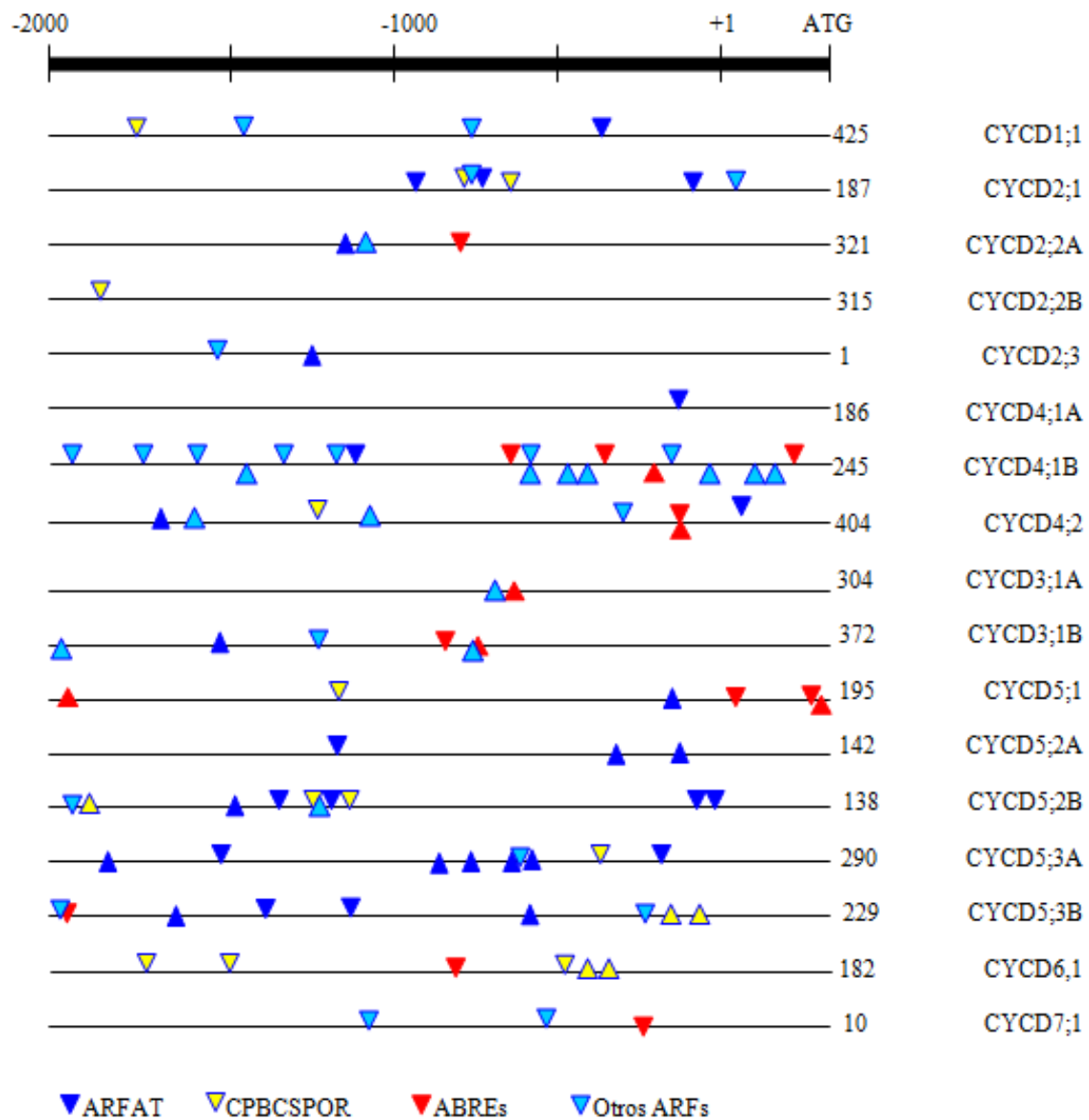


Figura 13. Presencia de elementos de respuesta a fitohormonas en los promotores de las ciclinas D de maíz. ▼ *Auxin response factor*, ▼ respuesta a citocininas, ▼ respuesta a ABA, ▼ otros elementos de respuesta a auxinas

Para poder comenzar a estudiar el efecto de las hormonas, primero analizamos si cada una de éstas tenía un efecto sobre la síntesis de DNA, en las concentraciones utilizadas: benziladenina (BA, 1 μ M), ácido indolacético (IAA, 0.1 μ M) y ácido abscísico (ABA, 50 μ M). Se sabe que auxinas y citocininas inducen la síntesis de DNA, mientras que ABA la reprime. Los promedios de 3 ensayos de timidina indican que BA e IAA

incrementaron en 1.36 y 1.37 veces, respectivamente, la síntesis de DNA, mientras que ABA la disminuyó a un 86 % tomando la muestra control como 100 % (Figura 14).

Después de probar que las hormonas que utilizamos son funcionales en esas concentraciones, analizamos el efecto de dichas hormonas en la expresión de las ciclinas tipo D.

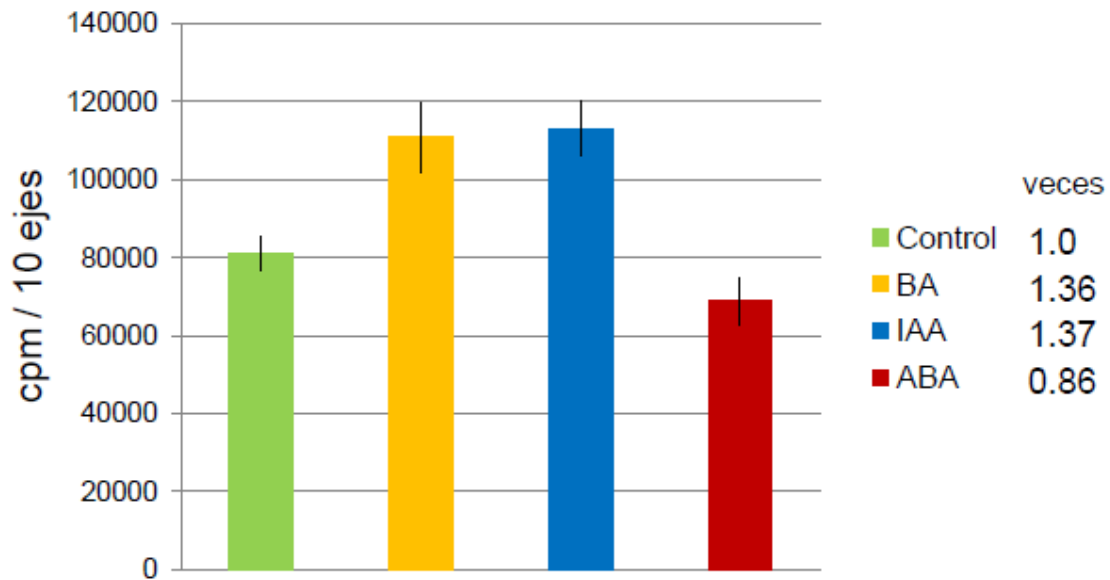


Figura 14. Efecto de benziladenina (BA, 1 μ M), ácido indolacético (IAA, 0.1 μ M) y ácido abscísico (ABA, 50 μ M) sobre la síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz embebidos por 15 horas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

Se estudió el patrón de expresión de las ciclinas en ejes embrionarios embebidos por 8 y 16 h con buffer de imbibición añadido con benziladenina, ácido indolacético o ácido abscísico y se compararon estos resultados con aquellos en los que no se añadieron hormonas. En los primeros dos ensayos se utilizó BA 1 μ M e IAA 0.1 μ M; para el tercer ensayo se aumentó la concentración de hormona añadida a 10 μ M y 1 μ M respectivamente, pero el efecto de ambas concentraciones fue esencialmente el mismo. La concentración de ABA fue 50 μ M en los tres ensayos.

Se tomó el gen r18S como control de carga para calibrar las curvas de expresión ya que sus niveles de transcrito no se han visto afectados por hormonas en trabajos anteriores (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Posteriormente se normalizó el valor de densitometría de cada muestra en relación al valor de densitometría de 8 h de imbibición sin hormonas, el cual fue tomado como unidad de referencia.

Los niveles de transcrito de la mayoría de las ciclinas tipo D en ejes embebidos en presencia de BA o IAA fueron muy similares a los de ejes embebidos en ausencia de

estas hormonas. Los únicos cambios observados con la adición de estas dos hormonas fueron los siguientes: la adición de BA incrementó los niveles de las ciclinas CycD3;1b y CycD4;1b, mientras que el IAA sólo indujo la expresión de CycD3;1a y CycD4;1b (Figura 15). Por otro lado, la adición de ácido abscísico redujo los niveles de transcrito de muchas de las ciclinas analizadas: CycD1;1, CycD2;2b, CycD3;1a, CycD4;1a, CycD5;1, CycD5;2a y CycD6;1.

Las ciclinas que no fueron detectadas en germinación ni en tejidos (CycD5;2b y CycD7;1) tampoco fueron detectadas en presencia de ninguna de las fitohormonas utilizadas (Datos no mostrados).

No se observó una clara correlación entre los efectos observados de la adición de hormonas y la presencia de elementos de respuesta en los promotores de los genes de CycDs. Al parecer, la mayoría de los elementos de respuesta encontrados en la base de datos PLACE no son funcionales en estos genes, al menos en ejes embrionarios en germinación. Por otro lado, los promotores de las ciclinas D de maíz podrían tener elementos de respuesta a hormonas que no están reportados en PLACE; dicha base de datos contiene pocos elementos particularmente para ABA y los reportados tienen una secuencia muy estricta, por lo que podrían ser específicos de algunos genes o de algunas plantas.

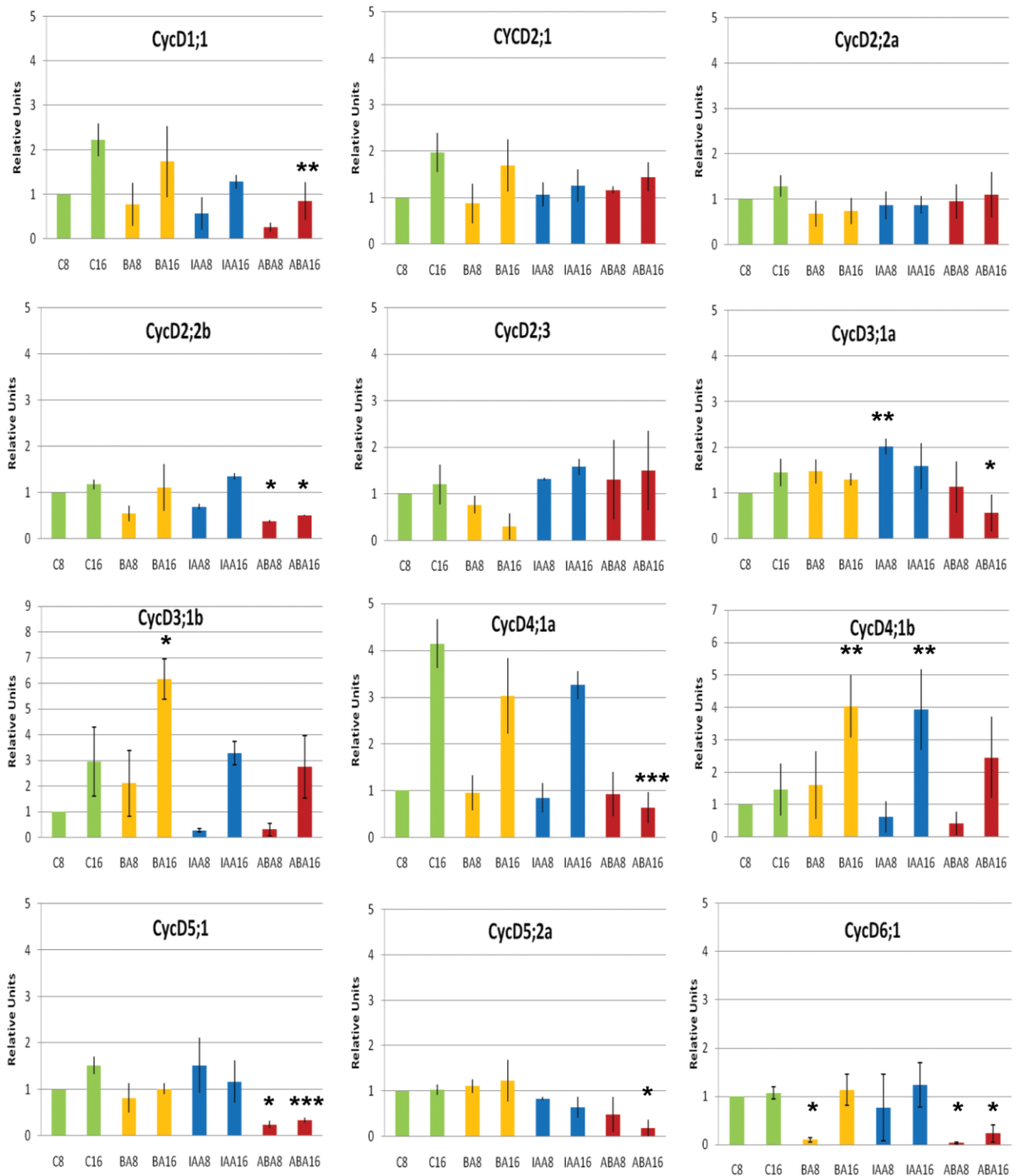


Figura 15. Respuesta de los genes CycDs de maíz al tratamiento con fitohormonas. Niveles de transcrito relativo de los genes de CycDs de maíz en ejes embrionarios embebidos por 8 y 16 h sin hormonas (verdes), con una citocinina (BA 10 μM, amarillo), una auxina (IAA 1 μM, azul) o ácido abscísico (ABA 50 μM, rojo). Los valores de densitometría se obtuvieron tomando en cuenta el valor de 8h sin hormonas como uno. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de correcciones de Bonferroni para comparar pares de columnas (C8 vs BA8, C8 vs IAA8, C8 vs ABA8, C16 vs BA16, C16 vs IAA16 and C16 vs ABA16). Asteriscos muestran diferencia estadísticamente significativa después de aplicar la corrección de Bonferroni: *** = valor P < 0.001, ** = valor P de 0.001 a 0.01, * = valor P de 0.01 a 0.05. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El genoma de maíz cuenta con al menos 17 ciclinas tipo D

Se reportó la existencia de 17 genes que codifican para ciclinas tipo D en el genoma de maíz; cuatro de ellos corresponden a las ciclinas previamente reportadas como Zeama;CycD2;1, Zeama;CycD4;1, Zeama;CycD5;1 y Zeama;CycD5;2 (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Tal riqueza en genes de ciclinas tipo D es común en plantas (10 genes en Arabidopsis y 14 en arroz) aunque resalta que Arabidopsis tiene menos genes CycDs, lo cual concuerda con el pequeño tamaño de su genoma. Por otra parte, el genoma de maíz es el que tiene mayor cantidad de genes CycDs debido, quizá, a eventos de duplicación génica mediados por transposones, lo cual es común en maíz.

El análisis filogenético indicó que los genes de CycDs de maíz, al igual que los de otras angiospermas, se pueden clasificar en los grupos CycD1, CycD2/D4, CycD3, CycD5, CycD6 y CycD7. Independientemente del total de genes de CycDs en cada especie, existe al menos un gen de cada grupo en Arabidopsis, arroz y maíz, lo que sugiere que el gen ancestro derivó originalmente en seis genes y posiblemente éstos conservan funciones específicas.

La familia génica completa de ciclinas tipo D de maíz fue nombrada de acuerdo a sus afinidades filogenéticas

La ciclina de maíz CycD1;1 (llamada así por ser la primera reportada) debió cambiar su nombre a CycD5;1 debido a su afinidad filogenética con las ciclinas del grupo CycD5 de otras plantas (Wang *et al.*, 2004). De la misma forma, en este trabajo se propone una nomenclatura para la familia completa de ciclinas tipo D de maíz a partir del análisis filogenético realizado y los porcentajes de identidad con los genes ortólogos en Arabidopsis y arroz, utilizando las reglas de nomenclatura de ciclinas propuestas con anterioridad (Renaudin *et al.*, 1996). El análisis filogenético hizo necesario el cambio de nomenclatura de las ciclinas tipo D descritas previamente en maíz, así como la introducción de subgrupos en los casos de pares de genes de maíz con alta identidad entre sí y con sólo un gen ortólogo en el genoma de arroz; en este caso, la existencia de subgrupos obedece estrictamente a la cercanía filogenética y no a funciones similares o redundantes. Dado que el genoma de la variedad de maíz B73 está secuenciado y anotado casi en su totalidad, se espera que la nomenclatura propuesta en este trabajo no sufra mayores modificaciones. En el futuro, con la disponibilidad de la secuencia de los

genomas de otras variedades de maíz y/o de otras especies del género *Zea*, será interesante investigar si esta nomenclatura también se cumple para ellas; muy probablemente, cada especie o variedad de maíz contendrá al menos un gen de cada grupo de ciclinas tipo D y la identidad con sus ortólogos entre variedades será muy alta, pero puede ser que algunas variedades contengan más ó menos genes debido a más ó menos eventos de duplicación génica.

Recientemente se reportó la existencia de 21 ciclinas tipo D en el genoma de maíz (Hu *et al.*, 2010); sin embargo, este trabajo considera diversas formas de splicing, o mRNAs incompletos, como diferentes genes, además de que no considera algunos de los genes reportados en el presente trabajo que evidentemente corresponden con genes de CycDs (ver Anexo 9).

Las secuencias de las ciclinas tipo D en maíz se obtuvieron originalmente de la versión 3b.50 de la base de datos Maize Sequence. En la versión 4a.53 de dicha base de datos, existe también otro gen que contiene todas las características particulares de una ciclina tipo D, este gen se localiza en el cromosoma 2 y parece ser producto de una duplicación intercromosomal reciente del gen que codifica la ciclina CycD4;1, ya que ambos genes tienen una identidad de 82% (Anexo 3). Por lo tanto, el gen reportado en la versión más reciente de Maize Sequence fue llamado Zeama;CycD4;1b mientras que el gen reportado desde versiones anteriores fue llamado Zeama;CycD4;1a. Los genes de las ciclinas CycD2;2, CycD3;1, CycD5;2 y CycD5;3 también parecen haberse duplicado después de la divergencia de los genomas de maíz y arroz. A pesar de ser productos de duplicaciones recientes y de tener porcentajes de identidad tan altos, este trabajo muestra que su expresión no es redundante, por ejemplo, CycD2;2a y CycD2;2b son 94% idénticos, sin embargo CycD2;2a presenta una cinética de expresión fluctuante durante germinación y no se ve afectada por hormonas mientras que CycD2;2b presenta una cinética de expresión acumulativa durante germinación y su expresión es reprimida por ABA. Es probable que pares de proteínas tan parecidas realicen la misma función pero en distintos momentos del desarrollo o bajo ciertas condiciones ambientales.

Las ciclinas tipo D de maíz poseen dominios proteicos y organización genómica características de ciclinas tipo D de plantas

En cuanto a la presencia de dominios y motivos proteicos en las secuencias de aminoácidos, cada una de las CycDs encontradas posee características generales de ciclina y marcas específicas de ciclina tipo D, como la secuencia de unión a CDK, la

secuencia de unión a RB y algunos sitios de fosforilación. Todas poseen el dominio ciclina_N terminal pero 5 ciclinas carecen del dominio ciclina_C terminal, lo cual podría implicar una función distinta para estas últimas. La ciclina Zeama;CycD6;1, al igual que las ciclinas CycD6 de arroz y de Arabidopsis, carece del motivo de unión a RB, esto concuerda con hallazgos recientes que muestran que la ciclina CycD6;1 de Arabidopsis participa en la formación de patrones celulares en raíz y no tiene una función específica en proliferación celular (Sozzani *et al.* 2010). Interesantemente, la mayoría de ciclinas tipo D de maíz carece de cajas PEST, lo que sugiere que serían proteínas estables; sin embargo, la regulación podría depender de su asociación con la CDK correspondiente o de la presencia de inhibidores de los complejos CycD-CDK más que de su degradación.

La organización genómica de seis exones y cinco intrones, que corresponde con la estructura del gen ancestro de ciclinas tipo D de angiospermas (Menges *et al.*, 2007) está conservada en los grupos CycD1, CycD2/D4 y CycD6. Por su parte, los grupos de ciclinas CycD3 y CycD5 han perdido intrones a lo largo de su evolución, resultando en estructuras de tres exones y cinco exones, respectivamente. Se desconoce si esta pérdida de intrones tiene algún significado funcional, como sería la pérdida de regiones reguladoras de la expresión.

Al menos 15 ciclinas tipo D de maíz se expresan en los tejidos analizados

Se detectó la presencia de transcrito de 11 de las 13 ciclinas tipo D aquí estudiadas, en ejes embrionarios en germinación y al menos en un tejido de plántulas de una semana. Además de estas once ciclinas, ya se había demostrado la expresión de otras cuatro ciclinas: CycD2;2a, CycD4;2, CycD5;3a y CycD5;3b (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). El hecho de no haber detectado transcritos de las ciclinas CycD5;2b y CycD7;1 podría deberse a que sus niveles son extremadamente bajos, o inestables, que sean transcritos en otros tejidos no analizados en este trabajo o que sean transcritos sólo bajo ciertas condiciones ambientales. Ambos genes presentan todas las características de genes que codifican para proteínas, es decir, tienen codón de inicio y de término de la traducción, sitios donadores y aceptores de splicing conservados, regiones 5'-UTR y 3'-UTR y regiones promotoras; además presentan una estructura exón-intrón similar a la de sus homólogos en secuencia más cercanos, por lo que la posibilidad de que este par de genes sean pseudogenes es baja. Sin embargo, en la versión más reciente del genoma de maíz (5b.60), aparece sólo una forma de splice del gen de la ciclina CycD5;2b, la cual tiene un cambio en el marco de lectura a partir del segundo exón, resultando en una

proteína hipotética de tamaño similar pero completamente distinta en secuencia hacia el extremo carboxilo; esta información, junto con la nula expresión de este gen en los tejidos analizados, sugiere que el gen CycD5;2b podría ser efectivamente un pseudogen.

De acuerdo con la versión más reciente (5b.60) del genoma de maíz, 9 de las 17 ciclinas tipo D presentan más de una variante de splice: CycD1;1, CycD2;2a, CycD4;1a, CycD4;1b, CycD4;2, CycD3;1b, CycD5;3a, CycD5;3b y CycD6:1. Los primers utilizados en este trabajo no permiten distinguir cuál(es) de las variantes de splice está(n) siendo transcrita(s), por lo que la expresión observada podría ser el resultado de la suma de la expresión de más de una variante (ver Anexo 10). En el futuro será interesante probar la existencia de diferentes formas de splice de ciclinas tipo D, así como investigar si la existencia de determinada variante está determinada por etapas del desarrollo de la planta o por condiciones ambientales, lo cual representaría una manera más fina de regular la expresión de estos genes.

Los transcritos de la mayoría de las ciclinas tipo D de maíz se acumulan en tiempos tardíos de germinación y en tejidos altamente proliferativos

Durante la germinación de maíz, la fase S del ciclo celular comienza alrededor de las 12 horas de imbibición, tiempo en el que se observa un incremento en la cantidad de DNA nuclear marcado y una acumulación de PCNA (Baíza *et al.* 1989; Reyes *et al.* 1991; Herrera *et al.* 2000); las células entran a la fase M después de 28-32 horas de imbibición, lo que coincide con la protrusión de la radícula (Baíza *et al.* 1989). En el presente trabajo se muestra que casi todas las ciclinas tipo D de maíz estuvieron presentes en semilla seca aunque algunas en muy bajos niveles; no obstante, todas fueron claramente detectables desde 8 horas de imbibición, lo que coincide con la fase G1. Aunque se sabe que la cantidad de transcrito no siempre correlaciona con la cantidad de proteína, el aumento en los niveles de transcrito de la mayoría de las ciclinas D concuerda con reportes previos que indican la presencia y activación de ciclinas tipo D en la transición G1-S durante la germinación de maíz (Gutiérrez *et al.* 2005, Lara-Núñez *et al.* 2008). De la misma manera, la acumulación de transcrito hacia las 24 horas de imbibición que se observa en la mayoría de las ciclinas tipo D apoya reportes previos que afirman la presencia y actividad de complejos CycD-CDK en fase G2 (Schnittger *et al.* 2002; Kono *et al.* 2003).

Se esperaba que las ciclinas tipo D estuvieran presentes predominantemente en tejidos altamente proliferativos, como los meristemos de raíz, y en menor medida en

tejidos con mayor diferenciación y, en general, este fue el resultado obtenido. Sin embargo, también se detectó transcrito de casi todas las ciclinas en hoja, aunque en niveles menores, esto puede tener distintas explicaciones: (1) posiblemente los transcritos de ciclinas observados en hoja sean remanentes de procesos de desarrollo previos, (2) las ciclinas sólo están presentes en zonas de división celular activa, y la proporción de estas zonas en hoja es más pequeña, ó (3) que algunas ciclinas efectivamente estén involucradas en procesos de diferenciación. En este contexto, la ciclina CycD3;1a constituye una interesante excepción al haber mostrado el perfil de expresión opuesto, es decir, acumulación de transcrito en mesocotilo y hoja y niveles bajos en meristemas de raíz y contrasta con la expresión de CycD3;1 de Arabidopsis, la cual está asociada con tejidos proliferativos y no con tejidos diferenciados (Dewitte et al., 2003).

La expresión a nivel de transcrito de las ciclinas tipo D de maíz está regulada de manera diferencial por fitohormonas

En trabajos anteriores se ha mostrado que las regiones promotoras de los cuatro genes de CycDs de maíz descritos previamente contienen elementos cis-reguladores de respuesta a hormonas como auxinas, citocininas, giberelinas, ABA y etileno, y que su distribución es diferencial (Bravo Alberto y Buendía Monreal, 2008). En el presente trabajo, se obtuvieron 2000 nt de región promotora de cada gen CycD de maíz y se observó la presencia de algunos elementos de respuesta a auxinas, citocininas y ABA. La distribución de elementos cis-reguladores fue diferencial incluso entre pares de genes que codifican proteínas con alto porcentaje de identidad entre sí, lo cual apoya la hipótesis de que no hay redundancia dentro de esta familia génica. Sin embargo, no se encontró una clara correlación entre la presencia de elementos de respuesta a hormonas con su inducción o inhibición experimental. Es muy probable que algunos de los elementos de respuesta encontrados no sean funcionales y que existan elementos de respuesta no reportados en las bases de datos de motivos reguladores en plantas, particularmente en relación a la respuesta a ABA, puesto que los pocos elementos reportados son muy estrictos en secuencia y podrían ser específicos de Arabidopsis.

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado previamente que la adición de una auxina estimula claramente la expresión de las ciclinas CycD4;2, CycD5;3a y CycD5;3b (ver Figura 10). El presente estudio muestra que, de las ciclinas tipo D restantes, sólo las ciclinas CycD3;1a y CycD4;1b responden positivamente a la adición de la auxina.

También se sabía que una citocinina estimula claramente la expresión de CycD5;3b (Figura 10). Aquí se demostró que las ciclinas CycD3;1b y CycD4;1b también incrementan su expresión a nivel de transcrito en presencia de la misma citocinina.

Por otra parte, la adición de ABA redujo claramente la expresión de siete ciclinas durante germinación. El papel que juega el ácido abscísico en inhibir la proliferación celular parece estar bien establecido (Swiatek *et al.* 2002; Da Silva *et al.* 2008) aunque no se había reportado inhibición de la expresión a nivel de transcrito en ciclinas tipo D de maíz (Gutiérrez *et al.*, 2005).

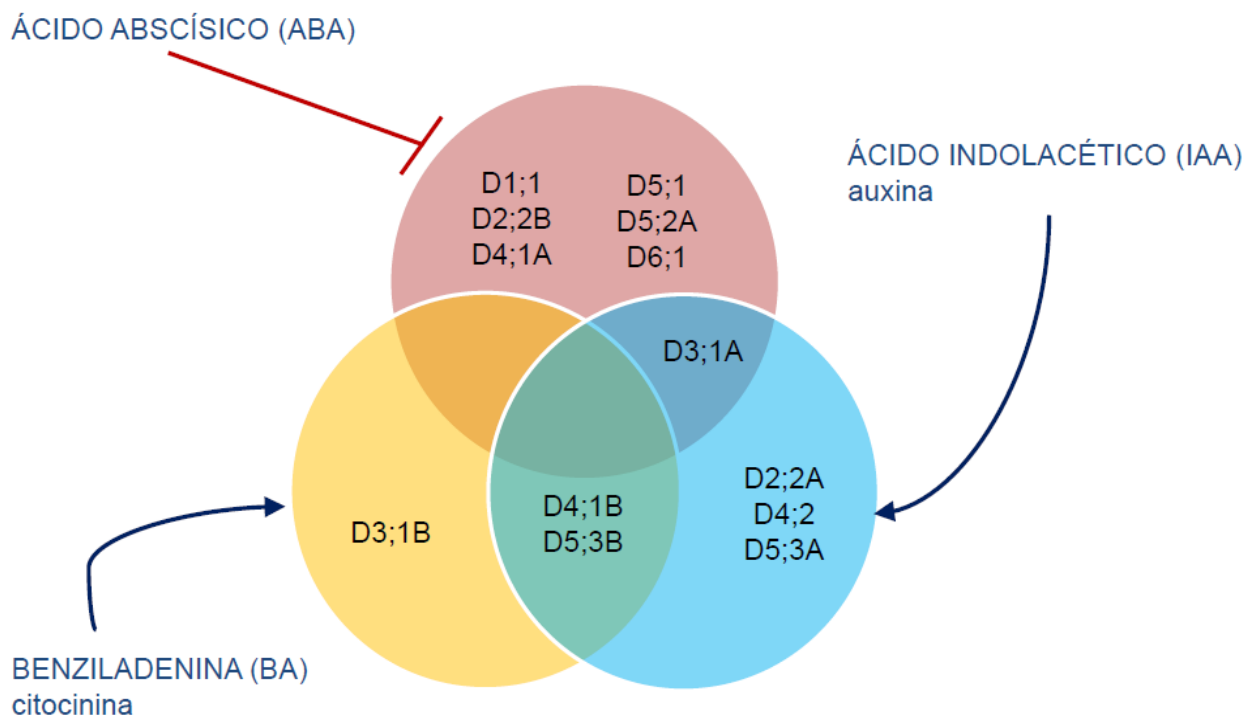


Figura 16. Resumen del efecto inductor o represor que ejercen algunas fitohormonas sobre la transcripción de CycDs de maíz durante germinación. Se observa que IAA induce la expresión de cinco ciclinas, BA induce la expresión de tres ciclinas y ABA inhibe la expresión de otras seis ciclinas distintas.

En la Figura 16 se muestra un esquema que resume los efectos observados al añadir diversas fitohormonas durante germinación, tomando en cuenta los efectos observados en trabajos anteriores (Gutiérrez *et al.*, 2005; Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Se puede ver que de las 15 ciclinas tipo D de maíz que han sido detectadas experimentalmente, 13 son reguladas al menos por una fitohormona. Sólo las ciclinas CycD2;1 y CycD2;3 no presentaron una clara inducción o represión en presencia de hormonas. En cuanto a aquellas que sí son reguladas por hormonas, la mitad son reprimidas por ABA y la otra mitad son estimuladas por BA y/o IAA, influyendo esta

última en más ciclinas que la citocinina. Es interesante resaltar que en general aquellas ciclinas que son reprimidas por ABA no son inducidas por auxinas o citocininas y viceversa, con excepción de la ciclina CycD3;1a, que es inducida por auxina y reprimida por ABA.

El efecto inductor o inhibidor de las fitohormonas sobre las ciclinas estudiadas podría ser resultado de una influencia directa sobre el promotor de las ciclinas ó podría ser un efecto indirecto producto de la acción directa de las fitohormoonas sobre factores de transcripción y su posterior señalización.

Consideraciones finales

Además de la función que desempeñan las ciclinas tipo D durante la germinación, también participan en otros momentos del desarrollo de la planta, como en la inducción de proliferación celular en las zonas meristemáticas de la raíz y del tallo, y en la formación de primordios de raíces laterales (Dewitte *et al.*, 2007; Qi y John, 2007, Nieuwland *et al.*, 2009, Sanz *et al.*, 2011). Se sabe muy poco acerca de la función de cada ciclina tipo D en estos procesos pero se ha visto que en Arabidopsis tienen funciones distintas y que responden selectivamente a diferentes hormonas.

Los patrones diferenciales de expresión sugieren que la riqueza en ciclinas tipo D de maíz no es sólo una cuestión redundante, sino que su presencia podría ser importante para diferentes fases del ciclo celular y/o para diferentes etapas del desarrollo de la planta. Es probable que algunas ciclinas tipo D estén involucradas en otros procesos, como la ciclina CycD6;1, que controla la formación de patrones celulares en la raíz de Arabidopsis (Sozzani *et al.* 2010).

En el futuro será fundamental determinar si la regulación diferencial de las ciclinas tipo D también se da a nivel de proteína, de localización intracelular, de modificaciones postraduccionales y de interacción con otras proteínas.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ El genoma de maíz contiene al menos 17 genes que codifican para ciclinas tipo D.
- ❖ Proponemos una nomenclatura de la familia génica completa a partir del análisis filogenético realizado.
- ❖ Las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de maíz poseen motivos y dominios característicos de ciclinas.
- ❖ La organización genómica de las ciclinas tipo D de maíz está muy conservada con la de sus ortólogos en otras plantas, particularmente dentro de cada grupo de ciclinas.
- ❖ Al menos 15 de las 17 ciclinas tipo D se expresan durante germinación y en diferentes tejidos de plántula.
- ❖ La mayoría de las ciclinas estudiadas en este trabajo presentan acumulación de transcritos hacia tiempos tardíos de germinación y en tejidos con altos niveles de proliferación.
- ❖ La adición de ácido abscísico inhibió la expresión de diversas ciclinas durante germinación mientras que la adición de benziladenina o ácido indolacético indujo la expresión de otras.

IX. PERSPECTIVAS

La identificación de la familia completa de genes que codifican para ciclinas tipo D en maíz abre un panorama mucho más complicado de la regulación del ciclo celular en maíz.

En el presente trabajo se estudió la influencia de algunas fitohormonas sobre la expresión de las ciclinas; sin embargo es importante conocer si la expresión de las ciclinas también está determinada por otras condiciones ambientales, tales como distintos tipos de stress, y si esta regulación también es diferencial.

Las ciclinas también podrían ser específicas de ciertos tipos celulares, por lo que será interesante investigar su presencia mediante ensayos de hibridación *in situ*.

En la base de datos del genoma de maíz están reportadas variantes de splice de algunas de las CycDs. Será importante verificar experimentalmente dichas formas de splice alternativo e investigar si cada variante tiene una expresión diferencial, lo cual constituiría una manera de regulación adicional que no ha sido reportada en ciclinas.

Otra manera de buscar especificidad en la función de las CycDs es estudiar sus regiones promotoras mediante la búsqueda *in silico* de elementos cis reguladores y su posterior confirmación experimental.

En los siguientes trabajos será necesario conocer la regulación de dichas ciclinas a nivel de proteína, de actividad de los complejos CycD-CDK y de interacción con otras proteínas.

X. REFERENCIAS

- **Abrahams S, Cavet G, Oakenfull EA, Carmichael JP, Shah ZH, Soni R, Murray JA** (2001) A novel and highly divergent *Arabidopsis* cyclin isolated by complementation in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* **1539**: 1-6
- **Ach RA, Durfee T, Miller AB, Taranto P, Hanley-Bowdoin L, Zambryski PC, Grissem W** (1997) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* **17**: 5077-5086
- **Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- **Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y, Ma H** (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* **21**: 3081-3095
- **Baíza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E** (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* **135**: 416-421
- **Barroco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inzé D, Mironov V** (2003) Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol Life Sci* **60**: 401–412
- **Bewley JD, Black M** (1994) *Seeds. Physiology of development and germination*, 2a edición, Plenum Press, New York, pp 8 - 213
- **Blanc G, Wolfe KH** (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16**: 1667
- **Boniotti MB, Gutiérrez C** (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J* **28**:341-350
- **Bravo Alberto CE, Buendía Monreal M** (2008) Estudio de la región promotora de cuatro ciclinas D de maíz. Tesis de Licenciatura, México
- **Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inzé D, Verbruggen N** (2000a) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 632-640
- **Burssens S, de Almeida Engler J, Beeckman T, Richard C, Shaul O, Ferreira**

- PCG, Van Montagu M, Inzé D** (2000b) Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2;1* gene. *Planta* **211**: 623-631
- **Candela H, Hake S** (2008) The art and design of genetic screens: maize. *Nature Rev Genet* **9**: 192-203
 - **Ching TM** (1972) Metabolism of germination in seeds. In Kozlowski TT, ed, *Seed Biology*, Vol. 3, Academic Press, New York, pp 115-117
 - **Cho HJ, Kwon HK, Wang MH** (2010) Expression of Kip-related protein 4 gene (KRP4) in response to auxin and cytokinin during growth of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry and Molecular Reports* **43**: 273–278
 - **Cohen JD** (1982) Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-aspartate from seeds of *Glycine max* L. *Plant Physiol* **70**: 749-753
 - **Cockcroft CE, den Boer BG, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* **405**: 575–579
 - **Coe EHJ** (2001) The origins of maize genetics. *Nature Rev Genet* **2**: 898-905
 - **Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679
 - **Da Silva EA, Toorop PE, Van Lammeren AA, Hilhorst HW** (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea Arabica* 'Rubi') seed germination *Ann. Bot.* **102**: 425-433
 - **Deltour R, Jacquard A** (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L., *Ann. Bot* **38**: 329
 - **De Veylder L, Engler JDA, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Mongagu MV, Engler G, Inzé D** (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* **208**: 453–462
 - **De Veylder L, Beeckman T, Inzé D** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 655-665
 - **Dewitte W, Murray JAH** (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 235–264
 - **Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH** (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79–92
 - **Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins**

- C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, Murray JAH** (2007) Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 14537–14542.
- **Diehl JA, Cheng MG, Roussel MF, Sherr CJ** (1998) Glycogen synthase kinase 3 beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**: 3499-3511
 - **Diehl JA, Sherr CJ** (1997) A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol Cell Biol* **17**: 7362-7374
 - **Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ** (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **11**:957-972
 - **Dudits D, Abrahám E, Miskolczi P, Ayaydin F, Bilgin M, Horváth GV** (2011) Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Ann Bot* **107**: 1193-1202
 - **Dyson N** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**: 2245-2262
 - **Eloy NB, Coppens F, Beemster GT, Hemerly AS, Ferreira PC** (2006) The Arabidopsis anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* **5**: 1957-1965
 - **Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM** (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* **73**: 487-497
 - **Feurtado JA, Ambrose SJ, Cutler AJ, Ross AR, Abrams SR, Kermode AR** (2004) Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta* **218**: 630-639
 - **Gachon C, Mingam A, Charrier B** (2004) Real-Time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot* **55**: 1445-1454
 - **Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H y Sicinski P** (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**: 431–443
 - **Georgieva EI, López-Rodas G, Sendra R, Gröbner P, Loidl P** (1991) Histone acetylation in *Zea mays*. II. Biological significance of post-translational histone

acetylation during embryo germination. *J Biol Chem* **266**: 18751-18760

- **Germain D, Russell A, Thompson A, Hendley J** (2000) Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *J Biol Chem* **275**: 12074-12079
- **Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavitigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* **296**: 92–100
- **Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, De Caprio JA, Sellers WR, Kaelin WG Jr.** (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**: 8962-8967
- **Granier C, Tardieu F** (1998) Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves: a common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. *Plant Physiol* **116**: 991-1001
- **Granier C, Inzé D, Tardieu F** (2000) Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34^{cdc2} kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiol* **124**: 1393-1402
- **Guo J, Song J, Wang F, Zhang XS** (2007) Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol Biol* **64**: 349-360
- **Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM** (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* **46**:166-73
- **Harbour JW, Dean DC** (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393–2409
- **Herrera I, Sánchez MP, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM** (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize. Regulation by phytohormones during seed development and germination and its association with a putative cyclin D protein. *Physiol Plant* **110**: 127-134

- **Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300
- **Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339-2351
- **Hu Y, Bao F, Li J** (2000) Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**: 693-701
- **Hu X, Cheng X, Jiang H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y** (2010) Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*). *Genet Mol Res* **9**: 1490-1503
- **Huntley R, Healy JMS, Freeman D, Lavender P, de Jagger SM, Greenwood J, Makker J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzarides T, Gutierrez C, Doonan JA, Murray JAH** (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* **37**: 155-169
- **Huntley RP, Murray JAH** (1999) The plant cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 440–446
- **Inzé D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105
- **Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J** (2003) Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**: 143–148
- **Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP** (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**: 313-320
- **Jurado S, Abraham Z, Mnazano C, López-Torrejón G, Pacios LF, Del Pozo JC** (2010) The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* **22**: 3891-3904
- **Kadota Y, Watanabe T, Fujii S, Higashi K, Sano T, Nagata T, Hasezawa S, Kuchitsu K** (2004) Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J* **40**: 131-142
- **Kawamura K, Murray JAH, Shinmyo A, Sekine M** (2006) Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol Biol* **61**: 311-327
- **Klug SW, Cummings MR** (1999) *Conceptos de genética*. Ed. Prentice Hall, Madrid, pp 43

- **Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Ichimiya H, Umeda M** (2003) *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* **132**: 1315-1321
- **Koroleva OA, Tomlinson M, Parinyapong P, Sakvarelidze L, Leader D, Shaw P, Doonan JH** (2004) CYCD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell* **16**: 2364-2379
- **Kumar A, Bennetzen JL** (1999) Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* **33**: 479-532
- **La HG, Li J, Ji ZD, Cheng YJ, Li XL, Jiang SY, Venkatesh PN, Ramachandran S** (2006) Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa L.*). *Mol Genet Genomics* **275**: 374-386
- **Lara-Núñez A, De Jesús N, Vázquez Ramos JM** (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant* **132**: 79 – 88
- **Laureys F, Dewitte W, Witters E, Van Montagu M, Inzé D, Van Onckelen H** (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett* **426**: 29-32
- **Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**: 402-408
- **Logemann E, Wu SC, Schröder J, Schmelzer E, Somssich IE, Hahlbrock K** (1995) Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *Plant J* **8**: 865-876
- **Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH** (2005) D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15694-15699
- **Mayer AM, Poljakoff A** (1975) The germination of seeds. 2a edición. Pergamon Press, pp 21-26
- **Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* **41**: 546-566.

- **Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH** (2006) The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 893-906
- **Menges M, Pavesi G, Morandini P, Bögre L, Murray JAH** (2007) Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. *Plant Physiol* **145**: 1558-1576
- **Mészáros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettkó-Szandtner A, Peres A, Magyar Z, Horváth GV, Bakó L, Fehér A, Dudits D** (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol* **43**: 595-605
- **Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM** (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J Am Chem Soc* **78**: 1375-1380
- **Minshull J, Blow JJ, Hunt T** (1989) Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell* **56**: 947–956
- **Moses AM, Heriche JK, Durbin R** (2007) Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase. *Genome Biol* **8**:R23
- **Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* **18**: 243–252
- **Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A** (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D / cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1847-1857
- **Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* **18**: 243–252
- **Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi M, Mori N** (1995) Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* **221**: 534-542
- **Nash P, Tang X, Orlicky S, Chen Q, Gertler FB, Mendenhall MD, Sicheri F, Pawson T, Tyers M** (2001) Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a

threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**: 514-521

- **Nieuwland J, Menges M, Murray JAH** (2007) The plant cyclins. *In* D Inze, ed, *Cell Cycle Control and Plant Development*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 31-61
- **Nieuwland J, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Sanz L, Murray JAH** (2009) The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in *Arabidopsis* by affecting the basal meristem region. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 22528–22533.
- **Nugent JH, Alfa CE, Young T, Hyams JS** (1991) Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* **99**: 669-674
- **Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C, Murray JAH** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 749–760
- **Osborne DJ** (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can J Bot* **61**: 3568-3577
- **Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR** (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal – 28
- **Pasternak TP, Ötvös K, Domoki M, Fehér A** (2007) Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regulators* **51**: 109–117
- **Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA** (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9903-9908.
- **Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberler G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Otiillar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer KF, Messing J, Rokhsar DS** (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* **457**: 551-556
- **Peres A, Churchman ML, Hariharan S, Himanen K, Verkest A, Vandepoele K, Magyar Z, Hatzfeld Y, Van Der Schueren E, Beemster GT, Frankard V, Larkin JC, Inzé D, De Veylder L** (2007) Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J Biol Chem* **282**: 25588-25596
- **Petrásek J, Friml J** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development*

136: 2675-2688

- **Pettkó-Szandtner A, Mészáros T, Horváth GV, Bakó L, Csordás-Tóth E, Blastyák A, Zhiponova M, Miskolczi P, Dudits D** (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J* **46**: 111-123
- **Pines J** (1995) Cyclins and cyclin dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308**: 697–711
- **Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Iriarte J, Dickau R** (2009) Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *PNAS* **106**: 5019-5024
- **Planchais S, Samland AK, Murray JAH** (2004) Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* **38**: 616-625
- **Qi R, John PC** (2007) Expression of genomic AtCYCD2;1 in Arabidopsis induces cell division at smaller cell sizes: Implications for the control of plant growth. *Plant Physiol.* **144**: 1587–1597.
- **Quiroz-Figueroa F y Vázquez-Ramos JM** (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant* **128**: 556-568
- **Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutiérrez C** (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**: 3527-3533
- **Reichheld JP, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inzé D** (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* **17**: 647-656
- **Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrel DA, Sundaresan V, Murray JAH** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* **32**: 1003-1018
- **Reyes J, Jiménez-García LF, González M, Vázquez-Ramos JM** (1991) Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res* **1**: 113-117
- **Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH** (1999) Cytokinin activation

of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541–1544

- **Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* **20**: 4513-4521
- **Robertson JM, Hubick KT, Yeung EC, Reid DM** (1990). Developmental responses to draught and abscisic acid in sunflower roots.2. Mitotic activity. *J Exp Bot* **41**: 339-350
- **Roderick HL, Cook SJ** (2008) Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer* **8**: 361–375
- **Roudier F, Fedorova E, Gyorgyey J, Feher A, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi E** (2000) Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J* **23**: 73-83
- **Sacks MM, Silk WK, Burman P** (1997) Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant Physiol* **114**: 519-527
- **San Miguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL** (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat. Genet.* **20**: 43-45.
- **Sano T, Higaki T, Handa K, Kadota Y, Kuchitsu K, Hasezawa S, Hoffmann A, Endter J, Zimmermann U, Hedrich R, Roitsch T** (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Lett* **580**: 597–602
- **Sanz L, Dewitte W, Forzani C, Patell F, Nieuwland J, Wen B, Quelhas P, De Jager S, Titmus C, Campilho A, Ren H, Estelle M, Wang H, Murray JA** (2011) The Arabidopsis D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *Plant Cell* **23**: 641-660
- **Sauter M** (1997) Differential expression of CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J* **11**: 181-190
- **Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J,**

Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**: 1112-1115

- **Schnittger A, Schöbinger U, Bouyer D, Weini C, Stierhof YD, Hülkamp M** (2002) Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6410–15
- **Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R** (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* **117**: 667-678
- **Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A** (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett* **460**: 117-122
- **Sherr CJ** (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551–555
- **Sherr CJ** (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **20**: 187 – 190
- **Sherr CJ, Roberts JM** (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**: 2699–2711
- **Shimotohno A, Ohno R, Bisova K, Sakaguchi N, Huang J, Koncz C, Uchimiya H, Umeda M** (2006) Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**: 701-710

- **Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**: 85-103
- **Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno MA, Busch W, Van Norman JM, Vernoux T, Brady SM, Dewitte W, Murray JA, Benfey PN** (2010) Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* **466**: 128-132
- **Swaminathan K, Yang Y, Grotz N, Campisi L, Jack T** (2000) An enhancer trap line associated with a D-class cyclin gene in Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**: 1658–1667
- **Swiatek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inzé D, Van Onckelen H** (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **128**: 201-211
- **Tardieu F, Granier C** (2000) Quantitative analysis of cell division in leaves: methods, developmental patterns and effects of environmental conditions. *Plant Mol Biol* **43**: 555-567
- **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ**: (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**: 4673-4680
- **Torres-Acosta JA, de Almeida Engler J, Raes J, Magyar Z, De Groot R, Inzé D, De Veylder L** (2004) Molecular characterization of Arabidopsis PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell Mol Life Sci* **61**: 1485-1497
- **Trehin C, Planchais S, Glab N, Perennes C, Tregear J, Bergounioux C** (1998) Cell cycle regulation by plant growth regulators: involvement of auxin and cytokinin in the re-entry of Petunia protoplasts into cell cycle. *Planta* **206**: 215- 224
- **Tsai FY, Lin CC, Kao CH** (1997) A comparative study of the effects of abscisic acid and methyl jasmonate on seedling growth of rice. *Plant Growth Reg* **21**: 37-42
- **Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, De Jager S, Kato K, Kondorosi E, Murray JAH, Ito M, Shinmyo A, Sekine M** (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* **57**: 83-100
- **Van Staden J** (1983) Seeds and cytokinins. *Physiol Plant* **58**: 340-346
- **Van Zon W, Ogink J, ter Riet B, Medema RH, te Riele H, Wolthuis RM** (2010) The APC/C recruits cyclin B1-Cdk1-Cks in prometaphase before D box recognition to

control mitotic exit. *J Cell Biol* **190**: 587-602

- **Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inzé D** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 903–916
- **Vázquez-Ramos JM, Osborne DJ** (1986) Chromatography analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mut Res* **166**: 39-47
- **Vincent PLD** (2002) *Zea mays* (Maize, corn). *Encyclopedia of Life Sciences*
- **Wang GF, Kong HZ, Sun YJ, Zhang XH, Zhang W, Altman N, Depamphilis CW, Ma H** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**: 1084–1099
- **Wang H, Zhou Y, Bird DA, Fowke LC** (2008) Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Microsc* **231**: 234-246
- **Wei F, Coe E, Nelson W, Bharti AK, Engler F, Butler E, Kim H, Goicoechea JL, Chen M, Lee S, Fuks G, Sanchez-Villeda H, Schroeder S, Fang Z, McMullen M, Davis G, Bowers JE, Paterson AH, Schaeffer M, Gardiner J, Cone K, Messing J, Soderlund C, Wing RA** (2007) Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genet* **3**: e123
- **Wei F, Zhang J, Zhou S, He R, Schaeffer M, Collura K, Kudrna D, Faga BP, Wissotski M, Golser W, Rock SM, Graves TA, Fulton RS, Coe E, Schnable PS, Schwartz DC, Ware D, Clifton SW, Wilson RK, Wing RA** (2009) The physical and genetic framework of the maize B73 genome. *PLoS Genet* **5**: e1000715
- **West G, Inzé D, Beemster GT** (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol* **135**: 1050-1058
- **Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ, Gutiérrez C** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J* **15**: 4900-4908
- **Yamaguchi M, Fabian T, Sauter M, Bhalerao RP, Schrader J, Sandberg G, Umeda M** (2000) Activation of CDK-activating kinases is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J* **24**: 11-20
- **Yan J, Tsuichihara N, Etoh T, Iwai S** (2007) Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. *Plant Cell Environ* **30**: 1320-1325

- **Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Indica). *Science* **296**: 79-92**
- **Yu Y, Steinmetz A, Meyer D, Brown S, Shen WH (2003) The tobacco A-Type cyclin; *Nicta*; *CYCA3;2*, at the nexus of cell division and differentiation. *The Plant Cell* **15**: 2763-2777**
- **Zhou S, Wei F, Nguyen J, Bechner M, Potamouisis K, Goldstein S, Pape L, Mehan MR, Churas C, Pasternak S, Forrest DK, Wise R, Ware D, Wing RA, Waterman MS, Livny M, Schwartz DC (2009) A single molecule scaffold for the maize genome. *PLoS Genet* **5**: e1000711**

XI. Anexos

Anexo 1. Números de acceso de las ciclinas tipo D reportadas de *Physcomitrella patens* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Arabidopsis thaliana* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/> TIGR annotation version 5.0, Junio 2007), arroz (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>, TIGR rice annotation release 5, Junio 2007).

Grupo de ciclinas	Ciclina	Número de acceso
	Phypa;CycD	AJ488282
CycD1	Arath;CycD1;1	At1g70210
	Orysa;CycD1;1	Os09g21450
	Orysa;CycD1;2	Os06g12980
	Orysa;CycD1;3	Os08g32540
CycD2/4	Arath;CycD2;1	At2g22490
	Orysa;CycD2;1	Os07g42860
	Orysa;CycD2;2	Os06g11410
	Orysa;CycD2;3	Os03g27420
	Arath;CycD4;1	At5g65420
	Arath;CycD4;2	At5g10440
	Orysa;CycD4;1	Os09g29100
	Orysa;CycD4;2	Os08g37390
CycD3	Arath;CycD3;1	At4g34160
	Arath;CycD3;2	At5g67260
	Arath;CycD3;3	At3g50070
	Orysa;CycD3;1	Os09g02360
CycD5	Arath;CycD5;1	At4g37630
	Orysa;CycD5;1	Os12g39830
	Orysa;CycD5;2	Os03g42070
	Orysa;CycD5;3	Os03g10650
CycD6	Arath;CycD6;1	At4g03270
	Orysa;CycD6;1	Os07g37010
CycD7	Arath;CycD7;1	At5g02110
	Orysa;CycD7;1	Os11g47950

Anexo 2. Números de acceso en Maize Sequence Database que corresponden a cada ciclina tipo D de maíz.

Ciclina	Número de acceso en Maize Sequence	Versión(es) de Maize Sequence en la(s) que aparece	Clona	Ubicación	Longitud (aa)
CycD1;1	GRMZM2G476685_P01	Desde 4a.53	Contig AC196414.3-Contig25	Cromosoma 7: 105,364,656-105,369,473 reverse strand	325
CycD2;1	GRMZM2G079629_P01	Todas las versiones	Contig AC201907.4-Contig20	Cromosoma 7: 166,159,039-166,161,537 forward strand	345
CycD2;2a	GRMZM2G075117_P02	Todas las versiones	Contig AC190640.4-Contig68	Cromosoma 4: 179,624,889-179,627,427 forward strand	360
CycD2;2b	GRMZM2G000021_P01	De 3b.50 a 4a.53	Contig AC195795.3-Contig41	Cromosoma 5 Clona AC195795.3: 158,063-160,610 forward strand	355
CycD2;3	AC204669.3_FGP029	Sólo en 3b.50	Contig AC204669.3-Contig36	Cromosoma 1 Clona AC204669.3 en 125,031-127,807	346
	AC205676.3_FGP029		Contig AC205676.3-Contig41	Cromosoma 1 Clona AC205676.3 en 174,040-176,816	346
CycD4;1a	GRMZM2G140633_P01	Todas las versiones	Contig AC196112.3-Contig45	Cromosoma 7: 127,890,301-127,892,874 forward strand	356
CycD4;1b	GRMZM2G178229_P01	Desde 4a.53	Contig AC211560.3-Contig51	Cromosoma 2: 187,441,540-187,443,834 forward strand	361
CycD4;2	GRMZM2G133413_P01	Todas las versiones	Contig AC193997.3-Contig140	Cromosoma 1: 200,723,661-200,726,940 forward strand	388
CycD3;1a	GRMZM2G107377_P01	Todas las versiones	Contig AC198888.4-Contig59	Cromosoma 7: 49,732,339-49,734,473 forward strand	387
CycD3;1b	GRMZM2G161382_P02	Todas las versiones	Contig AC202407.3-Contig26	Cromosoma 2: 163,317,827-163,320,224 forward strand	391
CycD5;1	GRMZM2G047637_P01	Todas las versiones	Contig AC185252.4-Contig78	Cromosoma 3: 113,346,729-113,349,009 reverse strand	349
CycD5;2a	GRMZM2G056303_P01	Todas las versiones	Contig AC186339.3-Contig38	Cromosoma 1: 254,688,533-254,690,378 forward strand	349
CycD5;2b	GRMZM2G078192_P01	Sólo en 3b.50	Contig AC208417.3-Contig36	Cromosoma 5 Clona AC208417.3 en 58,371-59,916	365

CycD5;3a	GRMZM2G006721_P02	Todas las versiones	Contig AC194035.3-Contig71	Cromosoma 9: 147,800,047-147,802,265 forward strand	353
CycD5;3b	GRMZM2G007130_P01	Todas las versiones	Contig AC200137.4-Contig62	Cromosoma 1: 22,373,476-22,376,079 forward strand	345
CycD6;1	GRMZM2G050933_P01	Todas las versiones	Contig AC187282.3-Contig141	Cromosoma 7: 156,667,098-156,669,547 reverse strand	307
CycD7;1	GRMZM2G058410_P01	Todas las versiones	Contig AC211224.3-Contig46	Cromosoma 4: 764,403-766,798 forward strand	431

Anexo 3. Matriz de identidad entre las secuencias proteicas de las CycDs de maíz y las CycDs de Arabidopsis, arroz y *P. patens*.

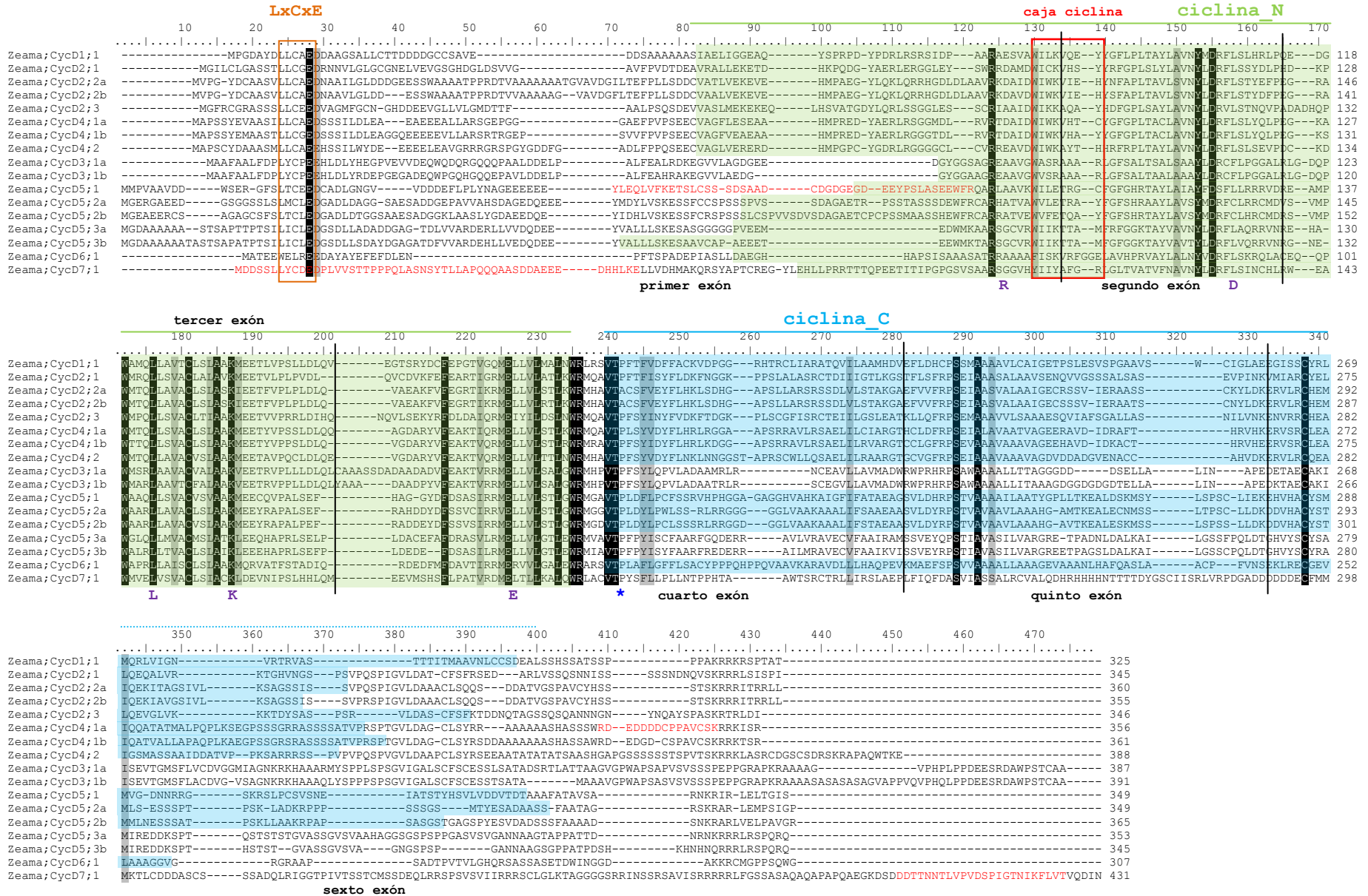
En rojo se resalta la identidad de cada CycD de maíz con su ortólogo respectivo en arroz.

Los números negros representan la identidad entre cada CycD de maíz con sus respectivos parálogos

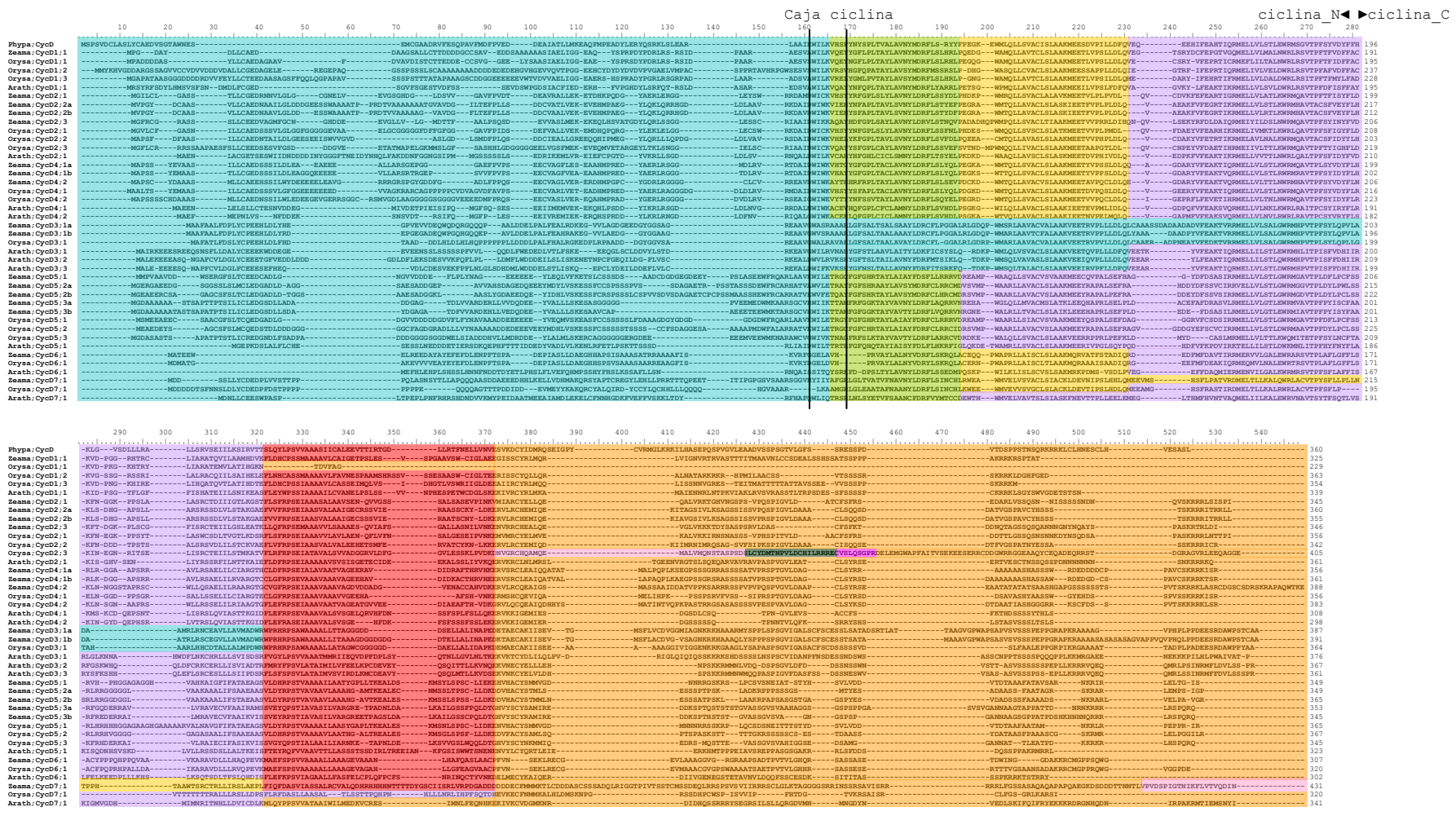
	ZmD1;1	ZmD2;1	ZmD2;2a	ZmD2;2b	ZmD2;3	ZmD4;1a	ZmD4;1b	ZmD4;2	ZmD3;1a	ZmD3;1b	ZmD5;1	ZmD5;2a	ZmD5;2b	ZmD5;3a	ZmD5;3b	ZmD6;1	ZmD7;1
Phypa;CycD	23.1%	24.8%	23.8%	23.0%	23.5%	26.7%	26.2%	22.9%	17.7%	17.7%	20.4%	19.0%	20.0%	20.9%	20.6%	23.9%	13.3%
Zeama;CycD1;1	ID	26.1%	26.2%	26.4%	24.4%	26.3%	26.6%	23.6%	18.0%	17.3%	21.0%	21.4%	21.1%	21.5%	21.2%	20.9%	15.9%
Orysa;CycD1;1	49.4%	21.1%	22.9%	23.1%	21.4%	22.8%	23.5%	20.9%	13.3%	12.6%	17.3%	16.4%	17.0%	16.8%	17.9%	18.4%	12.0%
Orysa;CycD1;2	40.2%	24.4%	21.9%	22.0%	22.0%	22.3%	23.8%	20.8%	14.6%	14.7%	20.9%	20.5%	20.3%	18.7%	19.5%	18.5%	14.9%
Orysa;CycD1;3	52.1%	25.0%	26.3%	26.1%	22.0%	25.0%	24.3%	22.1%	16.4%	16.7%	21.1%	19.2%	18.9%	19.2%	19.6%	19.0%	14.4%
Arath;CycD1;1	44.0%	25.7%	24.3%	24.8%	24.0%	23.6%	25.4%	22.6%	16.3%	15.9%	22.8%	22.2%	20.6%	20.6%	22.7%	20.0%	15.6%
Zeama;CycD2;1	26.1%	ID	40.1%	40.7%	45.0%	39.9%	39.2%	34.5%	17.7%	17.8%	20.0%	19.3%	20.1%	20.6%	21.6%	18.7%	14.6%
Zeama;CycD2;2a	26.2%	40.1%	ID	94.4%	30.3%	44.8%	45.0%	40.4%	18.4%	17.7%	18.7%	18.7%	19.4%	19.8%	20.1%	17.1%	14.8%
Zeama;CycD2;2b	26.4%	40.7%	94.4%	ID	31.0%	44.5%	44.2%	40.1%	18.7%	18.2%	18.6%	18.8%	19.0%	20.5%	20.8%	17.0%	15.5%
Zeama;CycD2;3	24.4%	45.0%	30.3%	31.0%	ID	33.5%	33.5%	30.6%	16.6%	17.2%	21.5%	19.4%	19.5%	20.9%	21.8%	17.5%	13.9%
Orysa;CycD2;1	24.9%	63.7%	41.4%	40.6%	44.9%	40.0%	39.7%	35.5%	16.6%	17.1%	19.5%	19.4%	19.5%	19.8%	20.5%	18.7%	15.2%
Orysa;CycD2;2	26.5%	39.4%	60.1%	60.1%	29.7%	43.1%	42.2%	37.6%	18.3%	17.8%	18.7%	17.2%	18.2%	19.2%	19.7%	18.9%	14.9%
Orysa;CycD2;3	23.0%	36.6%	30.6%	30.6%	42.0%	30.4%	30.6%	29.3%	17.6%	18.1%	17.6%	19.5%	19.6%	20.9%	20.6%	15.8%	15.2%
Arath;CycD2;1	22.4%	32.9%	35.3%	34.5%	27.4%	35.2%	34.2%	31.5%	16.0%	16.4%	16.3%	16.1%	16.9%	17.1%	17.6%	16.7%	13.3%
Zeama;CycD4;1a	26.3%	39.9%	44.8%	44.5%	33.5%	ID	81.8%	50.2%	19.0%	19.2%	20.1%	20.6%	20.6%	21.4%	22.0%	18.4%	16.2%
Zeama;CycD4;1b	26.6%	39.2%	45.0%	44.2%	33.5%	81.8%	ID	51.7%	19.8%	20.9%	19.6%	21.6%	20.2%	21.7%	21.8%	19.0%	15.9%
Zeama;CycD4;2	23.6%	34.5%	40.4%	40.1%	30.6%	50.2%	51.7%	ID	21.7%	22.4%	18.7%	19.7%	18.3%	21.9%	21.0%	17.9%	15.9%
Orysa;CycD4;1	26.4%	40.9%	45.0%	44.7%	32.2%	64.0%	62.7%	50.2%	18.9%	19.2%	18.9%	20.3%	20.1%	19.2%	19.8%	19.2%	14.8%
Orysa;CycD4;2	24.2%	37.3%	44.5%	43.5%	33.5%	55.0%	55.0%	50.9%	19.2%	19.9%	18.2%	19.2%	19.3%	20.9%	21.9%	18.9%	15.8%
Arath;CycD4;1	26.4%	31.6%	32.5%	32.7%	27.2%	33.7%	34.0%	29.7%	16.6%	16.9%	18.0%	18.3%	18.9%	17.4%	18.2%	17.7%	14.0%
Arath;CycD4;2	25.5%	30.6%	32.5%	32.9%	24.9%	35.1%	34.8%	29.9%	17.7%	17.7%	18.3%	17.7%	17.6%	19.5%	19.2%	17.7%	13.8%
Zeama;CycD3;1a	18.0%	17.7%	18.4%	18.7%	16.6%	19.0%	19.8%	21.7%	ID	80.2%	17.2%	17.2%	18.8%	16.6%	17.4%	15.2%	17.6%
Zeama;CycD3;1b	17.3%	17.8%	17.7%	18.2%	17.2%	19.2%	20.9%	22.4%	80.2%	ID	17.1%	17.6%	18.6%	16.6%	18.0%	14.8%	18.5%
Orysa;CycD3;1	20.1%	18.6%	21.5%	22.0%	19.4%	21.2%	21.4%	23.4%	60.9%	60.2%	20.1%	20.3%	21.8%	17.6%	18.4%	16.7%	18.4%
Arath;CycD3;1	18.9%	19.8%	21.3%	21.5%	19.3%	22.9%	22.2%	22.1%	26.9%	27.0%	18.5%	17.3%	16.4%	15.5%	16.6%	13.9%	14.7%
Arath;CycD3;2	19.2%	22.9%	23.2%	23.0%	19.5%	22.7%	22.4%	22.5%	25.8%	26.3%	17.1%	18.7%	17.7%	15.7%	15.9%	15.2%	15.8%
Arath;CycD3;3	20.6%	22.2%	24.1%	24.0%	19.8%	24.4%	23.8%	23.6%	25.6%	25.5%	18.4%	19.1%	18.2%	16.5%	17.5%	14.9%	14.9%
Zeama;CycD5;1	21.0%	20.0%	18.7%	18.6%	21.5%	20.1%	19.6%	18.7%	17.2%	17.1%	ID	44.8%	47.1%	29.0%	29.9%	16.4%	14.2%
Zeama;CycD5;2a	21.4%	19.3%	18.7%	18.8%	19.4%	20.6%	21.6%	19.7%	17.2%	17.6%	44.8%	ID	74.6%	27.9%	31.1%	18.4%	14.1%
Zeama;CycD5;2b	21.1%	20.1%	19.4%	19.0%	19.5%	20.6%	20.2%	18.3%	18.8%	18.6%	47.1%	74.6%	ID	29.3%	31.8%	17.7%	15.6%
Zeama;CycD5;3a	21.5%	20.6%	19.8%	20.5%	20.9%	21.4%	21.7%	21.9%	16.6%	16.6%	29.0%	27.9%	29.3%	ID	78.3%	14.7%	13.8%

Zeama;CycD5;3b	21.2%	21.6%	20.1%	20.8%	21.8%	22.0%	21.8%	21.0%	17.4%	18.0%	29.9%	31.1%	31.8%	78.3%	ID	15.1%	13.3%
Orysa;CycD5;1	20.4%	20.0%	17.9%	17.8%	20.3%	18.7%	20.0%	19.3%	18.2%	17.3%	70.3%	46.3%	48.8%	28.0%	29.0%	17.1%	12.7%
Orysa;CycD5;2	21.7%	20.0%	19.0%	19.1%	20.4%	21.9%	22.0%	21.9%	18.0%	17.8%	49.8%	59.2%	59.2%	29.1%	30.4%	16.6%	15.1%
Orysa;CycD5;3	18.6%	19.1%	17.8%	18.4%	18.5%	19.6%	19.7%	19.9%	16.5%	16.7%	27.7%	28.9%	30.2%	53.5%	54.6%	12.7%	12.9%
Arath;CycD5;1	18.0%	18.2%	20.4%	20.3%	18.6%	18.9%	19.0%	18.0%	15.1%	15.0%	22.1%	21.9%	19.4%	19.4%	21.4%	17.5%	11.9%
Zeama;CycD6;1	20.9%	18.7%	17.1%	17.0%	17.5%	18.4%	19.0%	17.9%	15.2%	14.8%	16.4%	18.4%	17.7%	14.7%	15.1%	ID	12.5%
Orysa;CycD6;1	20.0%	18.6%	18.0%	17.9%	19.0%	19.5%	20.3%	18.1%	15.7%	14.3%	17.1%	17.8%	18.1%	16.2%	16.7%	72.5%	12.9%
Arath;CycD6;1	20.0%	18.8%	15.8%	16.0%	18.2%	16.1%	15.7%	14.7%	12.8%	12.3%	16.5%	16.0%	16.3%	15.6%	15.6%	20.2%	12.6%
Zeama;CycD7;1	15.9%	14.6%	14.8%	15.5%	13.9%	16.2%	15.9%	15.9%	17.6%	18.5%	14.2%	14.1%	15.6%	13.8%	13.3%	12.5%	ID
Orysa;CycD7;1	15.3%	13.6%	14.2%	14.4%	15.3%	15.1%	14.9%	13.8%	17.3%	18.0%	15.1%	16.3%	15.5%	14.3%	14.3%	14.3%	36.6%
Arath;CycD7;1	17.3%	16.0%	15.1%	14.9%	14.9%	16.4%	15.7%	15.0%	14.7%	14.4%	15.6%	15.7%	15.8%	15.2%	14.5%	14.8%	17.3%

Anexo 4. Dominios y motivos presentes en las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de maíz. Se muestran los dominios ciclina_N en sombra verde y ciclina_C en sombra azul, el sitio LxCxE de unión a RBR, la caja ciclina, los cinco aminoácidos (R, D, L, K, E) esenciales para estructura de ciclina, el sitio de fosforilación equivalente a T191 de Nicta;CycD3;3 (*). Cajas PEST potenciales están indicadas en letras rojas.



Anexo 5. Alineamiento de las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de *Physcomitrella patens*, maíz, arroz y Arabidopsis mostrando su organización genómica. Cada exón está sombreado con un color distinto.



Exones 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Anexo 6. Longitud de proteínas y número y longitud de exones e intrones.
UTRs no están consideradas en la longitud de exones.

Ciclina	Proteína (aa)	Exones	Longitud exones-intrones
Phypa;CycD	360	6	(617-196-87-103-99-103-202-108-128-101-595)
Zeama;CycD1;1	325	6	(679-273-87-1662-99-144-208-117-131-115-1220)
Orysa;CycD1;1	229	4	(273-295-87-1205-99-97-231)
Orysa;CycD1;2	363	6	(402-97-87-1367-96-83-202-1069-143-150-162)
Orysa;CycD1;3	354	6	(375-216-87-2768-96-535-202-230-134-141-171)
Arath;CycD1;1	339	6	(424-152-87-526-99-95-202-89-137-84-1071)
Zeama;CycD2;1	345	6	(471-266-87-102-99-91-202-96-125-96-864)
Zeama;CycD2;2a	360	6	(659-188-87-85-99-102-202-109-122-157-729)
Zeama;CycD2;2b	355	6	(638-197-87-85-99-97-202-109-122-158-754)
Zeama;CycD2;3	346	6	(288-251-87-1209-117-84-202-128-125-64-222)
Orysa;CycD2;1	356	6	(312-298-87-103-99-91-202-109-125-90-246)
Orysa;CycD2;2	342	6	(297-189-87-110-99-96-202-104-122-178-222)
Orysa;CycD2;3	405	9	(339-414-93-152-99-120-202-111-128-85-76-1357-57-494-31-931-193)
Arath;CycD2;1	361	6	(586-240-87-82-99-102-196-117-128-90-612)
Zeama;CycD4;1a	356	6	(467-107-87-157-99-123-202-128-116-272-783)
Zeama;CycD4;2	388	6	(706-502-87-90-102-108-208-155-119-315-888)
Orysa;CycD4;1	356	6	(336-105-87-382-99-137-202-102-98-217-249)
Orysa;CycD4;2	383	6	(357-622-87-108-99-93-202-112-122-251-285)
Arath;CycD4;1	308	6	(504-306-87-102-99-91-205-136-128-596-268)
Arath;CycD4;2	298	6	(303-142-87-75-99-82-204-141-116-394-251)
Zeama;CycD3;1a	387	3	(967-101-113-103-851)
Zeama;CycD3;1b	391	3	(1014-105-128-88-1109)
Orysa;CycD3;1	364	3	(655-91-125-83-315)
Arath;CycD3;1	376	4	(739-89-202-109-131-73-575)
Arath;CycD3;2	367	4	(666-90-202-78-131-81-416)
Arath;CycD3;3	361	4	(582-78-202-86-131-98-470)
Zeama;CycD5;1	349	5	(503-81-87-90-304-125-137-145-809)
Zeama;CycD5;2a	349	5	(474-98-87-103-298-89-134-125-438)
Zeama;CycD5;2b	365	5	(491-101-87-85-301-139-134-123-235)
Zeama;CycD5;3a	353	5	(580-75-87-105-295-98-137-139-703)
Zeama;CycD5;3b	345	5	(525-90-87-153-289-74-140-141-823)
Orysa;CycD5;1	365	5	(327-100-87-107-334-143-137-299-213)
Orysa;CycD5;2	367	5	(354-96-87-100-307-90-134-88-222)
Orysa;CycD5;3	345	5	(327-144-87-132-283-78-134-111-207)
Arath;CycD5;1	323	5	(461-80-87-84-310-75-149-81-597)
Zeama;CycD6;1	307	6	(376-105-93-98-102-100-208-129-131-383-725)
Orysa;CycD6;1	320	6	(195-110-93-90-102-115-208-90-131-357-234)
Arath;CycD6;1	302	6	(201-98-84-73-96-81-208-70-131-86-189)
Zeama;CycD7;1	431	6	(339-112-87-103-292-78-143-148-369-650-75)
Orysa;CycD7;1	320	5	(282-238-87-100-99-143-294-731-201)
Arath;CycD7;1	341	4	(326-252-87-93-295-96-496)

Anexo 7. *Primers* utilizados para amplificar cada CycD de maíz y sus correspondientes condiciones de reacción. Los *primers* en negritas fueron utilizados en experimentos RT-PCR semicuantitativo y PCR tiempo real.

	Secuencia del <i>primer</i> (5' - 3')	Fragmento (pb)	Condiciones de reacción para germinación	Condiciones de reacción para tejidos de plántula	Condiciones de reacción para germinación y tejidos en PCR tiempo real
Zeama;CycD1;1	FW GGG TTT CTT CCA TTG ACA GC	291	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV GAA GTC GAC GAA GGT GAA GG		34 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 61 C, 45 seg a 72 C)	35 ciclos (40 seg a 94 C, 40 seg a 61 C, 35 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD2;1	FW CCA CAC GAT AAG CCT TGG AT	308	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV GAG CCT TTG AGT GTG CCA AT		30 ciclos (40 seg a 94 C, 40 seg a 60 C, 35 seg a 72 C)	30 ciclos (40 seg a 94 C, 40 seg a 6 C, 35 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD2;2a	FW TTA CAA TTT CGC ACC GTT GA	622	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV CAG CGT CCA GGA CAC CTA TT		32 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 60 C, 45 seg a 72 C)	29 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 60 C, 45 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD2;2b	FW GCA AGC GCA AGA CAC TAG AG	104	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	10 min a 95 C
	RV ACA AAA TGG TAC GAG AGA GC		31 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 60 C, 45 seg a 72 C)	29 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 60 C, 45 seg a 72 C)	40 ciclos (15 seg a 95 C, 60 seg a 60 C)
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD2;3	FW GTA AGG AGA TGC CAT GAA GC	130	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	10 min a 95 C
	RV CGG CTG TCT GGT TAT CGT CA		29 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 60 C, 20 seg a 72 C)	34 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 60 C, 20 seg a 72 C)	40 ciclos (15 seg a 95 C, 60 seg a 60 C)
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD4;1a	FW GGG GAG GGG AAG AAG AGG AG	105	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	10 min a 95 C
	RV GAT TTT GGT AAC CTG GTG CG		38 ciclos (40 seg a 94 C, 40 seg a 65 C, 35 seg a 72 C)	34 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 64 C, 20 seg a 72 C)	40 ciclos (15 seg a 95 C, 60 seg a 60 C)
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	

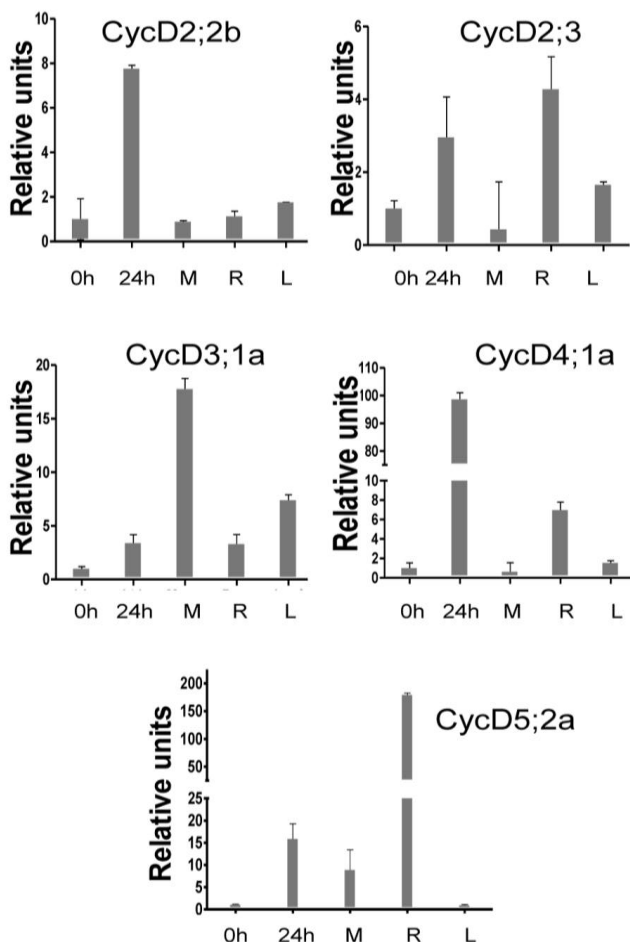
Zeama;CycD4;1b	FW TCT GCA CGC CGG TTC ATA CAA A	205	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV GTA ATC TGG TGC CCG AAC GGT AAT		38 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 61 C, 15 seg a 72 C)	38 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 61 C, 15 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD3;1a	FW GTA GAA GCC GCA GCC GCA GC	111	30 min at 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	10 min a 95 C
	RV AAG CAA TGC CAA GAA CCA AC		38 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 64 C, 20 seg a 72 C)	41 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 64 C, 20 seg a 72 C)	40 ciclos (15 seg a 95 C, 60 seg a 60 C)
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD3;1b	FW AAA GGA TCC GGA AAT AAG CGT AAG CAC	182	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV AAA CTT AAG TGG CTC TGG AGA GGA CGA CA		41 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 61 C, 45 seg a 72 C)	42 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 61 C, 20 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD5;1	FW GTT CCT CCC GCT CTA CAA TG	662	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV CCA TAG GTT GCA GCC AAG AT		37 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 61 C, 45 seg a 72 C)	38 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 61 C, 45 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD5;2a	FW GTC CTG TGC TGT GCG GCT GT	148	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	10 min a 95 C
	RV CGT CAC CGT TTC TCC AGC AG		38 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 62 C, 20 seg a 72 C)	38 ciclos (35 seg a 94 C, 35 seg a 62 C, 20 seg a 72 C)	40 ciclos (15 seg a 95 C, 60 seg a 60 C)
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD5;2b	FW TTC GAG ACG CAG GCT TAC TT	666	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV GAC GGA CTC GTA TGG ACT GC		39 ciclos (60 seg a 94 C, 60 seg a 60 C, 45 seg a 72 C)	40 ciclos (60 seg a 94 C, 60 seg a 64 C, 45 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
Zeama;CycD6;1	FW TTC ATC TCC AAG GTG CGT TT	339	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV GAT AGC ATG CGG AGA GGA AG		37 ciclos (40 seg a 94 C, 40 seg a 60 C, 35 seg a 72 C)	40 ciclos (40 seg a 94 C, 40 seg a 60 C, 35 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	

Zeama;CycD7;1	FW CTA TGC GTT TGG TAG GCT	533	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	
	RV CTC CGT CAG GAC GAA CAA		39 ciclos (60 seg a 94 C, 60 seg a 60 C, 45 seg a 72 C)	40 ciclos (60 seg a 94 C, 60 seg a 64 C, 45 seg a 72 C)	
			10 min a 72 C	10 min a 72 C	
r18S	FW GGA AAC TTA CCA GGT CCA GAC ATA G	180	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	30 min a 54 C, 15 min a 94 C	10 min a 95 C
	RV GTG GCC TAA ACG GCC ATA GTC CCT C		18 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 58 C, 45 seg a 72 C)	16 ciclos (50 seg a 94 C, 50 seg a 61 C, 45 seg a 72 C)	40 ciclos (15 seg a 95 C, 60 seg a 60 C)
			10 min a 72 C	10 in a 72 C	

Anexo 8. Perfiles de expresión de 5 CycDs de maíz obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real

(Trabajo realizado por la Dra. Ilenia Rentería Canett como parte de una estancia posdoctoral)

METODOLOGÍA. Para los análisis de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), el RNA total fue tratado con DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 µg de RNA tratado con DNasa para generar el cDNA usando el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las reacciones qRT-PCR se llevaron a cabo en placas ópticas de 96 pozos en un equipo de PCR tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems). En cada reacción se añadió 6.25 µL de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA y 200 nM de cada primer en un volumen de reacción de 12.5 µL. Los primers y las condiciones de reacción utilizados se muestran en el anexo 7. Los niveles de expresión relativa fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y normalizados usando el gen r18S. Se realizaron tres réplicas biológicas en cada experimento.







Niveles de transcrito relativos obtenidos de PCR en tiempo real en ejes embebidos por 0 y 24 h y en los tres diferentes tejidos de plántula, mesocotilo (M), puntas de raíz (R) y primera hoja (L).

Anexo 9. Comparación entre la nomenclatura propuesta por Hu *et al.*, 2010 y la nomenclatura propuesta en este trabajo. La nomenclatura de este trabajo está basada en un análisis filogenético explicado a detalle en el texto.

Nomenclatura de Hu et al.	Número de acceso en Maize Sequence	Nomenclatura de este trabajo	Observaciones
Zeama;CycD1;1	GRMZM2G476685_P01	Zeama;CycD1;1	
Zeama;CycD2;1	GRMZM2G075117_P02	Zeama;CycD2;2a	
Zeama;CycD2;2	GRMZM2G079629_P01	Zeama;CycD2;1	
Zeama;CycD3;1	GRMZM2G161382_P01	Zeama;CycD3;1b	Hu <i>et al.</i> toman en cuenta las formas de splice como genes distintos
Zeama;CycD3;2	GRMZM2G161382_P02		
Zeama;CycD4;1	GRMZM2G133413_P01	Zeama;CycD4;2	Hu <i>et al.</i> toman en cuenta las formas de splice como genes distintos
Zeama;CycD4;2	GRMZM2G133413_P02		
Zeama;CycD4;3	GRMZM2G133413_P03		
Zeama;CycD4;4	GRMZM2G178229_P01	Zeama;CycD4;1b	Hu <i>et al.</i> toman en cuenta las formas de splice como genes distintos
Zeama;CycD4;5	GRMZM2G178229_P02		
Zeama;CycD4;6	GRMZM2G178229_P03		
Zeama;CycD4;7	GRMZM2G140633_P01	Zeama;CycD4;1a	Hu <i>et al.</i> toman en cuenta las formas de splice como genes distintos
Zeama;CycD4;8	GRMZM2G140633_P02		
Zeama;CycD4;9	GRMZM2G140633_P03		
Zeama;CycD4;10	GRMZM2G140633_P05		
Zeama;CycD5;1	GRMZM2G006721_P02	Zeama;CycD5;3a	
Zeama;CycD5;2	GRMZM2G007130_P01	Zeama;CycD5;3b	
Zeama;CycD5;3	GRMZM2G047637_P01	Zeama;CycD5;1	
Zeama;CycD5;4	GRMZM2G056303_P01	Zeama;CycD5;2a	
Zeama;CycD6;1	GRMZM2G050933_P01	Zeama;CycD6;1	
Zeama;CycD7;1	GRMZM2G058410_P01	Zeama;CycD7;1	
		Zeama;CycD2;2b	Hu <i>et al.</i> no reportan estos cuatro genes que, evidentemente, codifican para ciclinas tipo D
		Zeama;CycD2;3	
		Zeama;CycD3;1a	
		Zeama;CycD5;2b	

Anexo 10. Diferentes formas de splice de los genes de ciclinas tipo D de maíz¹

Ciclina	Número de acceso	Variantes de splice	Longitud de transcrito (nt)	Longitud de proteína (aa)	Organización genómica	¿Amplifica con los primers utilizados? ²
CycD1;1	GRMZM2G476685	1	2507	325		Sí
		2	2388	324		Sí
		3	808	177		No
CycD2;1	GRMZM2G079629	1	1848	345		Sí
CycD2;2a	GRMZM2G075117	1	1884	331		No
		2	1898	360		Sí
CycD2;2b	GRMZM2G000021	1	1902	355		Sí
CycD2;3	AC204669.3_FGP029	1	1041	346		Sí
CycD4;1a	GRMZM2G140633	1	1790	356		Sí
		2	1335	274		Sí
		3	1458	158		Sí
		4	1754	355		Sí
		5	1462	348		Sí
		6	895	218		No
CycD4;1b	GRMZM2G178229	1	1571	361		Sí
		2	1569	290		Sí
		3	1387	291		Sí
CycD4;2	GRMZM2G133413	1	2086	388		Sí
		2	1467	253		Sí
		3	1002	187		No
CycD3;1a	GRMZM2G107377	1	1931	387		Sí
CycD3;1b	GRMZM2G161382	1	2280	270		Sí ³
		2	1899	391		Sí
CycD5;1	GRMZM2G047637	1	1840	349		Sí
CycD5;2a	GRMZM2G056303	1	1431	349		Sí
CycD5;2b	GRMZM2G078192	1	1248	365		Sí
CycD5;3a	GRMZM2G006721	1	1802	353		Sí
		2	1723	354		Sí
CycD5;3b	GRMZM2G007130	1	1864	345		Sí
		2	1649	345		Sí
CycD6;1	GRMZM2G050933	1	1635	307		Sí

		2	1626	304		Sí
		3	1379	190		Sí ³
		4	905	91		No
CycD7;1	GRMZM2G058410	1	1305	431		Sí

¹ En negritas se muestra la variante de splice que origina el transcrito y la proteína más larga para cada gen, y que corresponde con la estructura de una ciclina.

² Para los genes no estudiados en este trabajo (CycD4;2, CycD5;3a y CycD5;3b) se tomaron en cuenta los *primers* utilizados en el trabajo de Quiroz-Figueroa et al, (2006).

³ Amplifica la variante de splice correspondiente pero con un diferente tamaño al esperado para la variante de splice canónica, lo cual permite diferenciar entre ambas formas.