



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN
PROMOTORA DE LA CICLINA D₂;₂ 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 :

CARLOS EVERARDO BRAVO ALBERTO

Tutor: DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS



MÉXICO, D. F.

Agosto 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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos en el laboratorio 104, en el Departamento de Bioquímica 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
Dr. Felipe Cruz García Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandra Alicia Covarrubias Robles Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración de la M. En C. Maria Teresa Olivera Flores, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de transformación y selección de callos embriogénicos de maíz.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Octavio Guerrero Andrade en los experimentos de clonación y caracterización in silico y del Dr. Elpidio Garcia Ramírez en los experimentos de análisis de proteínas.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT 79874 y DGAPA-IN 201309. Durante los estudios de maestría goce 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. Mario Rocha Sosa Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal Dra. Marina Macías Silva Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario Dr. Luis Cárdenas Torres Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra Facultad de Química, UNAM
Suplente Dr. Felipe Cruz García Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos

Por su enorme aportación a mi formación profesional, por dirigir de la mejor manera mi formación científica durante mi estancia en su laboratorio, por la libertad y entera confianza otorgada para realizar este trabajo, por mostrarme el camino hacia el conocimiento científico y su constante crítica basada en el sentido común y sobre todo gracias por su gran aportación a mi formación como ser humano.

Al Dr. Elpidio García Ramírez

Por su constante orientación en el trabajo diario, por sus críticas tan importantes para la elaboración de este trabajo, por su vasta experiencia compartida y sincera amistad.

Al Dr. Octavio Guerrero Andrade

Por el tiempo, trabajo, paciencia y empeño invertido en mi formación, por ser un gran amigo antes que un excelente asesor.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Felipe Cruz García y la Dra. Alejandra Covarrubias, por su apoyo, críticas e ideas propuestas para culminar este trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Mario Rocha Sosa, Dra. Marina Macías Silva, Dr. Luis Cárdenas Torres, Dr. Francisco Javier Plasencia de laParra y Dr. Felipe Cruz García por sus acertados comentarios en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio 114: Manuel, Enrique, Yadith, Tavo, Alfredo, German, Luis, Jorge, Sara, Miguel, Silvia Karina, Paco, Donají, Victor, Jorge, Mingyar, Dago, Nanit, Silvia, Viri, Paulina, Viri, Arturo, Viri, Lupita, Laura, y del departamento de bioquímica: Mari, Diana, Moni, Yuri, Alejandra, Claudia, Florencia, Javier, Alex, Karina, Alicia.

A CONACYT por las becas otorgadas.

Al programa PAPIIT por el apoyo económico que permitió la elaboración del trabajo.

DEDICATORIA

Para Zeus Ulises Bravo, por que has sido mi hermano mayor, has sido un ejemplo al que he tratado de seguir, alcanzar y al que siempre admiraré. Esas largas horas que has dedicado a compartir tu experiencia y llenarme de útiles consejos me han sido de gran utilidad. Es por esto que el arduo trabajo invertido aquí te lo dedico como un sincero agradecimiento.

Carlos Everardo

Para Emigdio Bravo y Florentina Alberto

Mis padres, que son el mas grande apoyo que tengo.

Por su paciencia, amor, confianza, regaños e interminables consejos muchas gracias esto es para ustedes. Los amo.

Para Nana

Porque siempre has tenido una sonrisa para mi y me ayudas en todo momento. Gracias por estar con nosotros y llenar de risas la casa. Te amo hermanita... tus preguntas son las mejores.

Para Neto

Porque eres mi héroe, mi mejor amigo, la persona que mas admiro y a la que mas extraño. Eres mi ejemplo todos los días, muchas gracias por enseñarme como luchar en la vida.

Para Li

El amor de mi vida. Gracias por tu todo apoyo, por tu cariño, por tus consejos, por tu paciencia. Espero que podamos seguir en este camino siempre juntos.

Para mi familia: Gune, Toño, Berna, Canuta, Nico, Enrique, Maque, Lili, Delfino, Cortes, Zeus, Rebeca, Natalia, Liz, Pato, Pollo, María, Cosme, Rojo, Hugo, Leonel, Sele, Benja, Pechuga, Emiliano, Mario, Bety, Camila, Mari, Fran, Botas, Isidra, Fidel, Gaby, Michel, Nacho, Lulú, David, Isra y Chucho.

Gudelia, Catalina, Rocío, Carlos, Paty, Vanesa, Maira, Estefany, Laura, Bladimir, y Yaneth.

Gracias por todo su apoyo, los quiero mucho.

Para Cris y Kike

Que han sido como hermanos y les agradezco por compartir estos años.

Para el árbol: Claudio, Carlos, Sandy, Mitzi, Víctor, Norma, Daniela, Esau, Alondra, Raquel, Ulises, Alejandro, Angel, Erick, Manuel, Alfredo, Gil, Miguel (valv), Arturo, Mauricio, Gaby, Johnatan, Eder, Karla, Aranza. Son lo mejor que la facultad dejo en mi vida.

ÍNDICE

	Página
Índice General	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Abreviaturas	V
 Resumen	 1
1. Introducción	2
1.1 El maíz	2
1.2 Cultivo de tejidos vegetales	4
1.2.1 Medios de Cultivo	4
1.2.2 Reguladores de crecimiento	5
1.2.3 Cultivo de callo	8
1.3. Ciclo celular	9
1.3.1 Cinasas Dependientes de Ciclina	10
1.3.2 Expresión de genes de CDK	11
1.3.3 Inhibidores de CDK	12
1.3.4 Fosforilación de CDK	13
1.3.5 Ciclinas	15
1.3.6 Ciclinas tipo D	15
1.3.7 Regulación de la expresión génica de Ciclinas D	18
1.3.8 Promotores de genes de Ciclinas D	20
 2. Planteamiento del Problema	 22
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos particulares	25
4. Materiales y Métodos	26
4.1 Clonación de las regiones promotoras	26
4.2 Construcción de las fusiones de cada promotor a los genes reporteros GFP y GUS en pBGWFS7.0	27
4.3 Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	28
4.4 Reacciones de recombinación	28
4.5 Modelo de estudio	30
4.5.1 Cultivo de Tejidos Vegetales de los Callos embriogénicos de Maíz	30
4.5.2 Epidermis de Cebolla	31
4.6 Transformación de callos embriogénicos por biobalística	31
4.6.1 Preparación de las partículas de tungsteno	31
4.6.2 Acoplamiento del DNA a las partículas	31
4.6.3 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno	32
4.7 Extracción y cuantificación de proteínas a partir de callos embriogénicos de maíz	32
4.8 Inmunodetección del reportero GFP	33
4.9 Extracción de DNA genómico de callos embriogénicos de maíz	34

	Página
5. Resultados	35
5.1 Obtención de la secuencia del promotor de la CYCD2;2	35
5.2 Caracterización <i>in silico</i> de la región promotora de la CYCD2;2	36
5.3 Fusiones traduccionales a GFP	39
5.4 Transformación de callos embriogénicos de maíz y células de epidermis de cebolla por biobalística	40
5.5 Amplificación de los genes reporteros GFP y GUS en callos de maíz	44
5.6 inmunodetección de los reporteros GFP y GUS	45
6. Discusión	47
6.1 Obtención de la secuencia y análisis <i>in silico</i> del promotor de la CYCD2;2	47
6.2 Transformación de callos embriogénicos de maíz y células de epidermis de cebolla.....	49
7. Conclusiones	55
8. Perspectivas	56
9. Bibliografía	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación gráfica del ciclo celular	9
Figura 2. Modelo especulativo sobre la progresión del ciclo celular en células vegetales	16
Figura 3. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas	18
Figura 4. Esquema de la reacción BP	29
Figura 5. Esquema de la reacción LR	29
Figura 6. Esquema de los <i>cassettes</i> de expresión de los vectores pBGWFs7/promotores de CYCD2;2	30
Figura 7. Amplificación por PCR del promotor largo de 2565 pb de la CYCD2;2	35
Figura 8. El alineamiento entre las secuencias teórica y experimental del promotor de la CYCD2;2 muestra un 98.4 % de identidad	36
Figura 9. Modelo de un promotor de plantas	36
Figura 10. Estructura del promotor de la CYCD2;2	37
Figura 11. Amplificación por PCR de los fragmentos	38
Figura 12. Amplificación por PCR de los fragmentos con los sitios de recombinación	39
Figura 13. PCR en colonia de las clonas de expresión en <i>E. coli</i>	40
Figura 14. Fluorescencia de la proteína GFP en cultivos de callos embriogénicos de maíz transformados	41
Figura 15. Fluorescencia de la proteína GFP-GUS en células de epidermis cebolla transformadas	42
Figura 16. Fluorescencia de la proteína GFP-GUS en células de epidermis de Cebolla transformadas en presencia de ABA o 2,4-D	44
Figura 17. PCR de los genes reporteros GFP-GUS en DNA genómico	45
Figura 18. Western Blot de extractos de proteínas solubles de callos embriogénicos de maíz transformados	45
Figura 19. Estructura génica de la CYCD2;2 de maíz	47
Figura 20. Elementos re respuesta a hormonas vegetales presentes en la región de -1 a -873 del promotor de la CYCD2;2	50
Figura 21. Expresión de la CYCD2;2 de maíz y CYC2;1 de Arabidopsis en distintas tipos celulares	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz	2
Tabla 2. Funciones de los elementos en el desarrollo fisiológico de la planta .	5
Tabla 3. Reguladores de crecimiento vegetal	6
Tabla 4. Motivos conservados en promotores de genes de CYCD en Arabidopsis y poplar	20
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para obtener fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2	26
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para obtener fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2 y realizar las reacciones de recombinación	27
Tabla 7. Curva patrón para la cuantificación de proteínas totales solubles	33
Tabla 8. Fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2 y los tipos de elementos de respuesta presentes en cada uno de ellos	38

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol acético
Arath;CYCD	Gen de ciclina D de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BA	Benciladenina
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CYCD	Ciclina tipo D
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FT	Factor transcripcional
FW	Oligonucleótido <i>forward</i>
G1	Interfase post-mitótica
G2	Interfase post-sintética
GFP	Proteína Verde Fluorescente
M	Fase de mitosis
NCBI	Centro Nacional para Información Biotecnológica
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLACE	Base de datos de elementos cis-reguladores de DNA en plantas
pRB	Proteína de retinoblastoma
promCYCD	Promotor de ciclina D
RACE	Amplificación rápida de extremos de cDNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RV	Oligonucleótido <i>reverse</i>
S	Fase de síntesis de DNA
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UTR	Región no traducida

RESUMEN

Los complejos proteicos formados por ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son fundamentales en el control de la progresión del ciclo celular, permitiendo el paso de la célula a través de las distintas fases del ciclo; la ciclina es la subunidad reguladora y la CDK la catalítica. En plantas, de los distintos tipos de ciclinas, las D (en asociación con CDKA) son las encargadas de regular la transición G1-S; sin embargo, el mecanismo de regulación de los genes de ciclina D es poco conocido. Para evaluar la expresión de CYCDs a nivel transcripcional, se caracterizó la región promotora de la CYCD 2;2 de maíz, cuya expresión ha sido observada desde etapas tempranas de germinación mostrando un aumento hacia la fase S, en presencia de hormonas como auxinas, citocininas y fuente carbonada.

Dicha caracterización se dió identificando elementos de respuesta a fitorreguladores involucrados en el control de múltiples procesos, entre los que destaca la germinación, y a azúcares que regulan la expresión de genes mediante señales extrínsecas.

El uso de diferentes regiones de la secuencia promotora permitió analizar la expresión de la CYCD2;2 en callos de maíz y células de epidermis de cebolla, transformados mediante biobalística, mostrando que un fragmento pequeño del promotor es suficiente para la expresión del gen reportero, dando lugar a la búsqueda de aquellos elementos mínimos necesarios para estabilizar la maquinaria transcripcional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Maíz

El maíz es una planta de origen americano y de importancia fundamental en el desarrollo de las antiguas culturas de América, ya que constituyó su alimento básico y quizá uno de los primeros en ser cultivados. El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays* (ver Tabla 1), es una planta herbácea, monocotiledónea y anual de la familia de las gramíneas (Raven *et al.*, 1992).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i> L., 1753
Especie	<i>Z. mays</i> L., 1753

El genoma del maíz ha experimentado varias rondas de duplicación de genoma, incluyendo aquella del antecesor paleopoliploide hace alrededor de 70 millones de años (Paterson *et al.*, 2004) y un evento adicional de duplicación completa de genoma hace alrededor de 5 a 12 millones de años (Blanc y Wolfe, 2004), la cual distingue al maíz de su mas cercano pariente, *Sorghum bicolor* (Paterson *et al.*, 2009). Los 10 cromosomas del genoma de maíz son estructuralmente diversos y han experimentado cambios dinámicos en cuanto a composición de cromatina. El tamaño del genoma de maíz se ha expandido dramáticamente a 2,3 gigabases (Schnable *et al.*, 2009) durante los últimos 3 millones de años debido a la proliferación de un retrotransposón terminal (San Miguel P *et al.*, 1998).

El centro de origen del maíz es la región de Mesoamérica, probablemente en la zonas altas de México, a partir de donde se extiende rápidamente. Registros arqueológicos y análisis filogenético sugieren que la domesticación comenzó al menos hace 6000 años (Piperno y Flannery, 2001; Matsuoka *et al.*, 2002) y después del descubrimiento de América en el siglo

XV se extendió por el mundo. Durante la domesticación del maíz toda región en la cual ha sido cultivado a través de los siglos ha producido una selección de cultivos de maíz o razas, las cuales han sido mantenidas o mejoradas por el hombre adaptándose a los requerimientos y condiciones locales (Paliwal *et al.*, 2001).

La planta del maíz alcanza de 0.5 m a 6 m de alto. Forma un tallo erguido, hueco, robusto y sin ramificaciones. 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 flores masculinas que se vuelven secas y pardas cuando se dispersa el polen (Paliwal *et al.*, 2001).

El maíz es uno de los granos cultivados por más tiempo y una de las especies cosechadas más productivas con un rendimiento promedio a nivel mundial de más de 4 toneladas por hectárea (Farnham *et al.*, 2003). Puede ser directamente consumido como alimento en varias etapas de desarrollo, desde maíz inmaduro hasta grano maduro. Constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo y está entre los que tienen aplicaciones más diversas. Su uso se centra no sólo en la alimentación humana, sino que también 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, los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, son utilizados como forraje (Paliwal *et al.*, 2001). Puede ser procesado para un rango de aplicaciones como ingrediente en comida o bebidas, por ejemplo jarabe de maíz en refrescos o alimentos de maíz, o para propósitos industriales. Es la fuente principal de almidón a nivel mundial y se utiliza como ingrediente alimentario, en su forma nativa o modificado químicamente (White, 1994). El almidón de maíz se puede fermentar a alcohol, incluyendo el etanol que puede utilizarse como combustible; mientras que la industria de papel es el consumidor no alimenticio más grande del almidón de maíz. El aceite y la proteína tienen valor comercial cuando están como subproductos de la producción del almidón y se utilizan en la fabricación de comida (Zamski y Schaffer, 1996).

1.2 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas mediante las cuales es posible la regeneración de una planta completa a partir de un explante (parte separada de una planta, por ejemplo: hoja, tallo, raíz, semilla, etc.). Estos tejidos se cultivan asépticamente en medios en los que se controla la composición y cantidad de nutrientes, pH, temperatura de incubación y condiciones de fotoperiodo. El cultivo de tejidos es utilizado en diversas aplicaciones que van desde la simple propagación *in vitro*, hasta estudios de fisiología y genética, sistemas de bioconversión, producción de metabolitos secundarios, entre otros. La obtención de un resultado satisfactorio depende en gran medida del tipo de explante utilizado, es por eso que el uso de explantes conteniendo la mayor cantidad de células meristemáticas es recomendado para una producción apropiada de callos (conjunto de células aglomeradas y desdiferenciadas). Podemos decir que el objeto principal de estas técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es la producción ya sea de células, tejidos y plantas que sirvan a la propagación, eliminación de enfermedades o al desarrollo de biotecnología vegetal (George *et al.*, 2008).

1.2.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se componen de tres grupos básicos:

- a) Elementos esenciales o minerales, suplementados con mezclas de sales complejas.
- b) Un suplemento orgánico a base de vitaminas y/o aminoácidos.
- c) Una fuente de carbono usualmente en forma de sacarosa.

De acuerdo con los requerimientos de la planta, los nutrientes se clasifican en:

- 1) Macronutrientes: se requieren en altas concentraciones para un óptimo crecimiento y desarrollo de la planta. Se consideran como macronutrientes al nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio y azufre (ver Tabla 2). El nitrógeno es comúnmente suplementado como una mezcla de nitratos de potasio (KNO_3) y amonio (NH_4NO_3). El

fósforo se agrega al medio de cultivo como iones fosfato de amonio ((NH₄)₃PO₄), sodio (Na₃PO₄) o potasio (K₃PO₄).

- 2) Micronutrientes: estos elementos solo se requieren en trazas para el desarrollo de la planta, y son: manganeso, yodo, cobre, cobalto, boro, molibdeno, hierro y zinc.
- 3) Compuestos Orgánicos: Algunos aminoácidos son comúnmente incluidos en el medio de cultivo, el más usado es la glicina, aunque también se han utilizado arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y glutamina. La caseína hidrolizada es también usada como una mezcla de aminoácidos.
- 4) Fuente de Carbono: La sacarosa es la fuente de carbono mas empleada en cultivo *in vitro* debido a su bajo costo y fácil asimilación, pero en algunos casos se emplean otros carbohidratos como glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol (George *et al.*, 2008).

Tabla 2. Funciones de los elementos en el desarrollo fisiológico de la planta (Slater, 2008)

Elemento	Función
Nitrógeno	Forma parte de la proteínas, ácidos nucleicos y algunas coenzimas
Potasio	Regulador del potencial osmótico y principal catión inorgánico
Calcio	Síntesis de pared celular, funciones de membrana y activación de enzimas dependientes de Ca ²⁺
Magnesio	Cofactor de enzimas, componente de la clorofila
Fósforo	Componente de ácidos nucleicos, intermediarios en respiración y fotosíntesis, transferencia de energía
Azufre	Componente de algunos aminoácidos y cofactores
Cloro	Requerido para la fotosíntesis
Hierro	Transferencia de electrones y componente de citocromo
Manganeso	Cofactor de enzimas
Cobalto	Componente de algunas vitaminas
Cobre	Cofactor de enzimas, transferencia de electrones
Zinc	Cofactor de enzimas, biosíntesis de clorofila

1.2.2 Reguladores de crecimiento

Cuando se habla de reguladores de crecimiento se hace referencia a compuestos naturales (hormonas) y a compuestos sintéticos, que se

asemejan en su estructura a las hormonas endógenas de la planta y que en cultivo de tejidos se agrega a los medios de cultivo para dirigir la morfogénesis de la planta. De acuerdo con su función, las hormonas vegetales se dividen en 6 familias: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides y etileno (Taiz *et al.*, 1991).

Tabla 3. Reguladores de crecimiento vegetal (Salisbury y Ross, 1992)

Regulador de crecimiento	Sitio de Producción en la planta	Principales funciones
Auxinas	Embriones de las semillas, yemas de meristemo apical y radicular así como en hojas jóvenes	A bajas concentraciones estimulan la elongación del tallo, inducen la diferenciación celular y la ramificación, regulan el desarrollo del fruto, aumenta la dominancia apical, regula el fototropismo, promueve la diferenciación del xilema y retarda la abscisión de hojas. A concentraciones elevadas induce la formación de callo.
Citocininas	Principalmente en raíces	Afectan la diferenciación y crecimiento de la raíz, estimulan la diferenciación y crecimiento de las células, la germinación y retardan la senescencia
Giberelinas	En meristemos de las yemas apicales y raíces, hojas jóvenes y embrión de la semilla	Promueven la germinación de semillas y la brotación de yemas, la elongación de los tallos y el crecimiento de hojas. Estimulan la floración y el desarrollo de frutos, afectan el crecimiento y desarrollo de raíces
Brasinoesteroides	Semillas, frutos, ápices, hojas y yemas florales	Inhiben el crecimiento de raíces, retardan la abscisión de hojas y promueven la diferenciación del xilema
Ácido Abscísico	Hojas, tallos, raíces y frutos verdes	Inhibe el crecimiento, cierra los estomas durante el estrés hídrico, promueve la dormancia de semillas
Etileno	Frutos en maduración, nudos de los tallos, hojas viejas y flores	Promueve la maduración de frutos, promueve o inhibe el crecimiento y desarrollo de raíces, hojas y flores dependiendo de la especie

Las familias de reguladores de crecimiento que mas nos interesan son:

Auxinas: son sustancias que ejercen un efecto fisiológico similar al del ácido indol acético (AIA), la primera auxina descubierta. Pueden ser clasificadas como compuestos indólicos, fenoxiácidos (2,4-D), ácidos naftalenacéticos (ANA) o ácidos benzoicos. Las auxinas naturales son producidas en zonas meristemáticas de tallo y transportadas hacia abajo del tallo a otras partes de la planta. La concentración de auxina difiere de planta a planta, en los diferentes tejidos, la estación del año y en la etapa de

crecimiento de la planta. Se han encontrado ampliamente distribuidas en plantas con y sin semilla, así como en bacterias, hongos y algas (George *et al.*, 2008).

Estos compuestos están implicados en procesos fisiológicos tales como la elongación celular, geotropismo, fototropismo, dominancia apical, iniciación de raíz, desarrollo de frutos y pueden estimular la producción de etileno.

En cultivo de tejido vegetal, promueven el crecimiento de callo, de células en suspensión y meristemas de tallos y raíces. En combinación con citocininas, estimulan diferenciación de floema y xilema. El 2,4-D, auxina sintética, es un inductor de la división celular mediante la activación de un sistema de cascada de señales, el cual involucra la unión del ligando (2,4-D) a receptores, segundos mensajeros e integrantes de la transducción de señales, entre ellos proteínas G y fosfolipasa C, que da lugar a que la célula re programe su expresión génica con la activación de genes de proteínas cinasas, ciclinas y el reacomodo de la estructura del citoesqueleto (George *et al.*, 2008).

Citocininas: el término fue propuesto por Skoog y colaboradores y define a un grupo de compuestos que promueven la citocinesis en células vegetales y producen efectos similares a aquellos producidos por la cinetina (Moore, 1989). En la actualidad se han descrito alrededor de 200 tipos de citocininas; entre las naturales se encuentra la zeatina, la cual fue aislada de granos de maíz inmaduros. En forma natural las citocininas se encuentran en altas concentraciones en regiones meristemáticas y tejidos en crecimiento y división como raíces, hojas jóvenes, frutos en desarrollo y semillas. Están ampliamente distribuidas en plantas superiores, musgos, hongos, bacterias y en muchos procariontes (Moore, 1989).

La manifestación fisiológica producida por la planta en respuesta a la aplicación de las citocininas depende mucho de la especie, así como del tipo de citocinina aplicada. Entre los efectos que produce dicha aplicación *in vivo* se encuentran el aumento de la apertura de estambres y se fomenta la inducción de morfogénesis de cloroplastos. Otros efectos son mayor división celular y formación de órganos, germinación de semillas, alargamiento de células, iniciación y crecimiento de raíz, desarrollo de yemas y tallos, retardo

de la senescencia y promoción de la translocación de nutrientes y sustancias orgánicas. En cultivo de tejidos *in vitro* estimulan la división y expansión celular, la morfogénesis, así como el crecimiento de yemas (George *et al.*, 2008).

1.2.3 Cultivo de callo

El tejido callogénico (callo) se define como una masa amorfa de tejidos desdiferenciados, de morfología y coloración variados. Se caracteriza por tener proliferación continua, acelerada y carente de organización, así como por estar constituido de un solo tipo de células (callo homogéneo) o de varios tipos celulares (callo heterogéneo). Se obtiene a partir de fragmentos de tejidos de zonas no diferenciadas.

El callo ha sido utilizado ampliamente como modelo biológico en investigación en fisiología celular, estados de organogénesis, embriogénesis y genética entre otros (Gupta e Ibaraki, 2006).

El callo puede ser obtenido de cambium, cortex, médula, floema secundario y aún xilema. La inducción y proliferación tienen lugar en presencia de auxinas fuertes tales como el ANA o 2,4-D, así como con una citocinina en menor proporción que estimule la división celular.

La inducción tarda de 3 a 5 semanas para dar lugar a la formación de callo, momento en el cual éste será subcultivado, transfiriendo pequeñas piezas de tejido (50-100 mg) a medio fresco y una vez que el callo ha sido establecido, debe ser subdividido y subcultivado a intervalos regulares hasta obtener suficiente material disponible para experimentación.

La cinética de crecimiento de los cultivos de callos es cuantificada mediante los incrementos de peso fresco y peso seco, aunque existen otros parámetros tales como número y volumen celular.

En el cultivo de callo, la división celular está confinada a la periferia del tejido. La proliferación se localiza generalmente en nódulos o en zonas meristemáticas superficiales y es el resultado de la división periclinal. La formación de estas secciones proliferantes se da gracias a que conforme la tasa de división cae, el plano de división del tejido se altera dando inicio a la actividad meristemática solo en ciertas secciones y así iniciando la formación de nódulos. En cultivo de callos esta fase se asocia con el cese de la división

celular. La tasa de respiración declina y la síntesis de RNA y actividad de enzimas clave de la vía de pentosas fosfato decrece. En muchos casos, si el medio nutritivo consumido no es reemplazado, puede ocurrir diferenciación celular. Esto podría involucrar la actividad de regiones meristemáticas dentro del cuerpo del callo, llevando a la regeneración de órganos, lo cual está asociado al incremento en producción de metabolitos secundarios (Gupta e Ibaraki, 2006).

1.3 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 consiste de una serie de eventos ordenados, incluyendo la replicación del DNA y la mitosis, que conducen a la proliferación celular, la que es necesaria para la germinación de la semilla, 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 fuertemente controlada por la progresión del ciclo celular, el cual consta de cuatro fases: la fase post-mitótica (G1), la fase de síntesis de DNA (S), la fase post-sintética (G2) y la fase mitótica (M). Durante la mitosis se divide la célula, posteriormente cada una de las células nuevas comienza su ciclo (Figura 1).

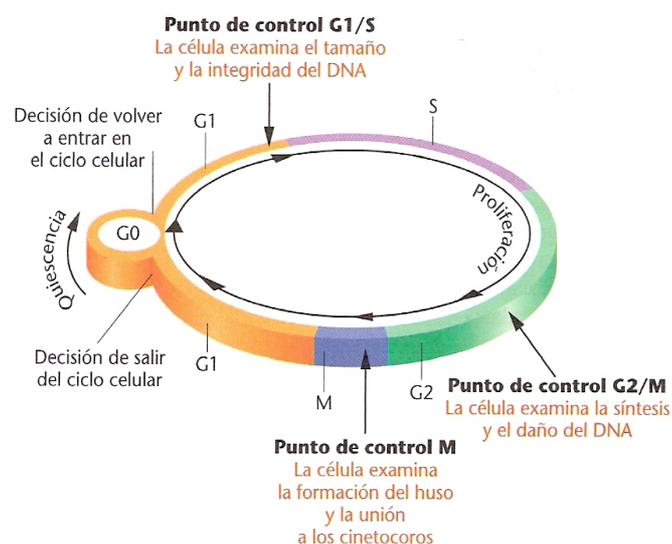


Figura 1. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control (Klug y Cummings, 1999).

La maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular esta comprendida, como en otros organismos eucariontes, por cinasas dependientes de ciclina (CDKs) que junto con diferentes ciclinas (CYC) forman complejos CDK-CYC, los cuales se encargan de fosforilar una gran variedad de sustratos en los puntos de control G1-S y G2-M (Pines, 1995; Huntley y Murray, 1999), regulando el 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 tiene la función de discriminar distintas proteínas como sustratos (Jackman *et al.*, 2003; Inzé y De Veylder, 2006).

1.3.1 Cinasas Dependientes de Ciclina

Las CDKs de plantas pueden ser agrupadas en 8 clases distintas: de CDKA a CDKG (Menges *et al.*, 2005) existiendo 152 genes en 41 especies de plantas (Inzé, 2007; Doonan y Kitsios, 2009).

Todos los organismos eucariontes estudiados poseen al menos una CDK con su motivo PSTAIRE en el dominio de unión a ciclina. En plantas este motivo esta conservado y es característico de la CDKA, que juega un papel fundamental en la regulación de los puntos de transición G1-S y G2-M. Los niveles proteicos de CDKA permanecen constantes a lo largo de todo el ciclo celular (Magyar,1997), además de ser capaz de complementar funcionalmente mutantes en levadura deficientes de *cdc2* (Dyson, 1998). Se ha observado que una reducción en la producción de CDKA en plantas de tabaco conduce a una reducción en la velocidad de división celular, produciendo plantas de menor tamaño. También se ha descrito otro tipo de CDK exclusivo de plantas denominado CDKB, el cual presenta un motivo PPTALRE o PPTTLRE, lo que da lugar a la presencia de dos subgrupos, CDKB1 y CDKB2 respectivamente. Ambos subgrupos se encuentran tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, sugiriendo una función conservada única para cada subgrupo de la CDKB en la regulación del ciclo celular. La expresión de la CDKB se observa desde el término de la fase S hasta M (Porceddu, 2001).

La actividad de CDK es regulada por fosforilación de la Thr160 o residuos equivalentes. Dicha fosforilación induce un cambio conformacional que permite el reconocimiento apropiado de sustratos y es llevada a cabo por cinasas activadoras de CDKs (CAKs). Arabidopsis contiene 4 genes que codifican para CAKs, los cuales son divididos en dos tipos, CDKD y CDKF (Vandepoele *et al.*, 2002). CDKD esta funcionalmente relacionada a las CAKs de animales, mientras que CDKF es específica de plantas y funcionalmente similar a la CAK de levadura (Umeda *et al.*, 2005). Las diferencias funcionales entre los dos tipos de CAKs son ejemplificados por sus sustratos específicos y su dependencia de distintas ciclinas. CDKD es la encargada de fosforilar el dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II; mientras que la activación de CDKF necesita la unión a la ciclina H para posteriormente fosforilar y activar a CDKD (Yamaguchi, 2003). Por otro lado, se ha observado que una disminución en los niveles de CDKF lleva a una disminución en la actividad de CDK y una prematura diferenciación de células de meristemas de raíz (Inzé y De Veylder, 2006).

1.3.2 Expresión de genes de CDK

La regulación transcripcional de un gen de control de ciclo celular es un componente esencial en la compleja maquinaria regulatoria, asegurando la progresión del ciclo y su coordinación con programas morfogénicos y extracelulares (Inzé, 2007). La expresión génica periódica es considerada una característica general de los genes de ciclo celular en eucariontes, los que dependen de múltiples elementos regulatorios contenidos en la región promotora y su correspondiente interacción con proteínas activadoras o represoras (Zhu *et al.*, 2004, Ito, 2005).

Mientras los genes de CDKs de las familias A, C, D y E muestran expresión constitutiva en células sincronizadas de distintos órganos de plantas, los transcritos de CDKB son acumulados en células en G2/M, característica única de genes de cinasas no PSTAIRE en plantas (Umeda *et al.*, 1999, Freeman *et al.*, 2003, Espinosa-Ruiz *et al.*, 2004). La adición de sacarosa activa a los genes de CDK con distintos perfiles de expresión. Los genes de CDKB son activamente transcritos durante la fase S, mientras que

CDKC;1, CDKD;1 y CDKG;1 responden en la transición G0/G1 (Breyne *et al.*, 2002).

La expresión de genes de CDK puede ser modificada por hormonas vegetales o factores reguladores de crecimiento. El tratamiento de protoplastos de hojas de mesófilo o raíz de alfalfa con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) activa la expresión del gen de CDKA; dicha acumulación correlaciona con el elevado nivel de incorporación de [³H] (Magyar *et al.*, 1993).

La presencia de citocininas incrementa la actividad de GUS regulada por el promotor de la CDKA;1 en células del cilindro vascular. Este promotor es también muy activo en callos inducidos con 2,4-D e inhibido completamente por la presencia de ABA.

Un análisis del promotor de la CDK de alfalfa, específica de mitosis, (CDKB2;1) detectó algunos elementos en cis de respuesta, tales como MSA (activador específico de mitosis), ABRE (elemento de respuesta a ABA), sitios de unión a E2F, ERE (elemento de respuesta a etileno) y TCA (respuesta a daño) (Zhiponova *et al.*, 2006).

1.3.3 Inhibidores de CDK

Las CDKs, esenciales para la regulación del ciclo celular en eucariontes, pueden ser inhibidas por interacción proteica y por fosforilación y desfosforilación a nivel de proteína (Morgan, 1997). El término *inhibidor de CDK* (CKI) generalmente se refiere a una proteína que sea capaz de inhibir la actividad de CDK a través de la unión con el complejo CDK. Los genes inhibidores de CDKs fueron identificados inicialmente en mamíferos y levaduras y son clasificados dentro de las familias de Cip/Kip e INK4, basado en la similitud estructural y especificidad de inhibición de CDK (Sherr y Roberts, 1995). La familia Cip/Kip esta formada por las proteínas p27^{Kip1}, p21^{Cip1} y p57^{Kip2}, mientras que la familia INK4 por p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}.

En plantas, la actividad de inhibidor de CDK fue inicialmente observada durante el desarrollo de endospermo (Grafi y Larkins, 1995); mientras que el primer gen inhibidor de CDK fue identificado en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 1997). Estos genes inhibidores de CDK han sido reportados

para diversas especies de plantas, donde se ha observado que todos contienen un dominio carboxilo terminal que comparte similitud con la familia de genes inhibidores Cip/Kip de mamíferos en una región de 30 residuos importante para la inhibición (Wang *et al.*, 1997).

La familia ICK/KRP de siete genes inhibidores de CDK de Arabidopsis es la mejor descrita y está compuesta por ICK1 y 2 (Inhibidor de CDK) (Wang *et al.*, 1997, Lui *et al.*, 2000) y KRP3 a KRP7 (Proteínas relacionadas a Kip) (De Veylder *et al.*, 2001).

Se ha observado que estos genes tienen una expresión diferente en distintos tejidos tales como hoja, raíz, inflorescencia y flor (Wang *et al.*, 1998; De Veylder *et al.*, 2001). Interesantemente la *ICK1* de Arabidopsis muestra mayores niveles de expresión en hojas en plantas de 5 días (Wang *et al.*, 1998); mientras que la *NtKIS1a* de Tabaco lo hace en brotes viejos de flor (Jasinski *et al.*, 2002), indicando que ambos genes de inhibidores de CDK son sobreexpresados en tejidos no proliferativos.

La división celular en plantas es inhibida por ABA y estrés abiótico (Bögre *et al.*, 2000). La expresión de *ICK1* es inducida por ABA y tratamientos de bajas temperaturas; este fenómeno fue observado también en alfalfa así como la respuesta de estos genes a estrés salino (Wang *et al.*, 1998; Ruggiero *et al.*, 2004).

1.3.4 Fosforilación de CDK

Similar a como ocurre en levaduras y mamíferos, la actividad de los complejos CDK/CYC es regulada también por fosforilación y desfosforilación y la interacción con proteínas reguladoras. Complejos de CDK/CYC en levadura son sujetos de una fosforilación inhibitoria de una tirosina en el amino terminal en la subunidad de CDK, mientras que en vertebrados las CDKs son fosforiladas en una Tyr y un residuo de Thr en el amino terminal (Inzé y De Veylder, 2006).

En plantas la fosforilación sobre Tyr de la CDKA ha sido detectada inequívocamente y muestra una regulación negativa al disminuir la actividad de cinasa en bajos niveles de citocinina, en estrés osmótico y cuando hay daño en el DNA (Schuppler *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996). Los sitios de fosforilación están también conservados en CDKs tipo B.

La cinasa WEE1, presente también en plantas, es la encargada de la fosforilación inhibitoria de las CDKs (Sorrell *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 1999). Se ha observado que la sobreexpresión de los genes *WEE1* de *Arabidopsis* y maíz en *S. pombe* causa arresto del ciclo celular (Sorrell *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 1999).

Recientemente se ha encontrado que en *Arabidopsis* existe un gen que codifica una proteína parecida a la fosfatasa CDC25, capaz de unir a los residuos fosforilados Thr14 y Tyr15 e inducir la actividad de CDK de *Arabidopsis* (Landrieu *et al.*, 2004), mostrando la conservación de un nivel de regulación más en el ciclo celular de distintos eucariontes.

Por otro lado la actividad de CDK también puede ser activada mediante fosforilación. La fosforilación en la Thr160 de las CDKs induce un cambio conformacional permitiendo un reconocimiento apropiado; dicha fosforilación es realizada por cinasas activadoras de CDK (CAKs). En el genoma de *Arabidopsis* hay cuatro genes que codifican para CAKs que son divididas en dos clases, CDKD y CDKF (Umeda *et al.*, 1998; Umeda *et al.*, 2005; Vandepoele *et al.*, 2002).

La familia de CDKDs es funcionalmente parecida a la de las CAKs de vertebrados, mientras que la CDKF es una CAK específica de plantas. La diversidad funcional entre ambas clases de CAK es debida a su sustrato o ciclina a la que se unen. La activación de CDKF no requiere la unión con CYCH, mientras que la activación de CDKDs si. Es la CDKF la encargada de activar al complejo CDKD/CYCH y éste a su vez es el único capaz de fosforilar al dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II (Shimotohno *et al.*, 2004).

A través de la regulación sobre la actividad de CDK, se ha demostrado que las CAKs son importantes reguladores del ciclo celular en respuesta a gradientes endógenos de hormonas (Yamaguchi *et al.*, 2003). Una inducción de la represión en la actividad de CDKF resulta en una gradual reducción en la actividad de CDK y diferenciación prematura en células del meristemo de raíz (Umeda *et al.*, 2000), mientras que la sobreexpresión de la CDKD;1 de arroz acelera la progresión de la fase S y el crecimiento en general de células en suspensión (Fabian-Marwedel *et al.*, 2002). Estos datos indican que las CAKs tienen un papel muy importante en la determinación de la velocidad de

crecimiento y el estado de diferenciación de células por el control que tienen sobre el nivel de actividad de CDK.

1.3.5 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 eucariontes.

La mayor parte de los organismos cuenta con diferentes grupos de ciclinas, las cuales tienen funciones especializadas. Por ejemplo, en células animales las ciclinas B están implicadas en la entrada a mitosis (Minshull *et al.*, 1989), mientras que las ciclinas D tienen un rol especial en la reentrada al ciclo celular en respuesta a señales extracelulares (Sherr, 1994) y las ciclinas E promueven la entrada a fase S (Geng *et al.*, 2003).

De acuerdo a su similitud con las ciclinas de animales, las ciclinas de plantas se han clasificado como tipos A, B, C, D, H y L (Barroco *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004). Mediante el análisis del genoma completo de *Arabidopsis* se identificaron diez genes de ciclinas D, que se agrupan en seis o siete 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).

El análisis de la familia de ciclinas en el genoma completo de arroz mostró que esta especie contiene 49 ciclinas agrupadas en 9 tipos: A, B, D, F, SDS, H, L, T y P, siendo el tipo D el que comprende un mayor número de ciclinas con 14 (La *et al.*, 2006). Asimismo, se han identificado 90 proteínas de arroz que pertenecen a proteínas del ciclo, CDK, E2F, CKI, CKS, RB y Wee, que podrían estar involucradas en el control del ciclo celular (Guo *et al.*, 2007).

1.3.6 Ciclinas tipo D

El primer punto de control durante el ciclo celular de plantas es la transición G1/S, por lo que las ciclinas D tienen una función especial en el control de la reentrada al ciclo celular, ya que se consideran los sensores primarios del entorno, al percibir señales externas y del desarrollo y

acoplarlas a las señales de proliferación, para así controlar la regulación del primer punto de control en plantas, dirigiendo la fosforilación de la proteína RBR (Dewitte y Murray, 2003, de Jager *et al.*, 2005, Inzé y De Veylder, 2006), la cual es una limitante para la entrada a la fase S (Menges *et al.*, 2006).

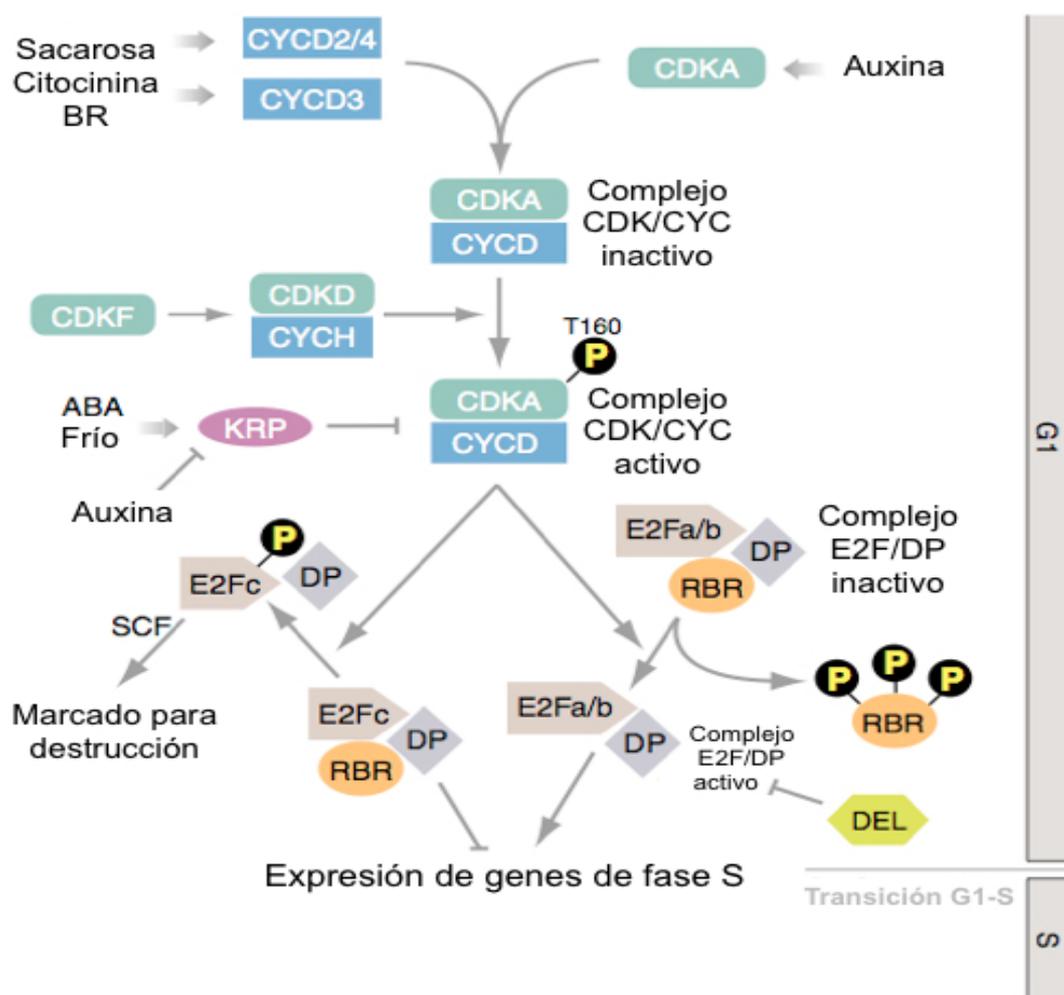


Figura 2. Modelo especulativo sobre la progresión del ciclo celular en células vegetales (Inzé y De Veylder, 2006).

En animales, las ciclinas 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 nivel 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.

Se ha reportado que en plantas existe un patrón similar al de la vía ciclinas/pRB presente en animales (Nakagami *et al.*, 1999; Ramírez-Parra *et al.*, 1999; Shen 2002). Las ciclinas tipo D controlan la ruta en la que están involucradas la proteína retinoblastoma (RB, en animales) o proteínas parecidas a RB (RBR, en plantas) y los factores de transcripción E2F / DP (Figura 2). En células que no están en proliferación, 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).

Sabemos que dentro del genoma de *Arabidopsis* existen 10 genes que codifican para ciclina D los cuales son clasificados dentro de 6 o 7 subgrupos que son CYCD1 a CYCD7 (Oakenfull *et al.*, 2002), mientras que en arroz el cual esta separado de *Arabidopsis* por al menos 150 millones de años de evolución, existen 14 genes de CYCD que caen dentro de los mismos subgrupos conservados (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007). En maíz son 17 los genes de CYCD presentes en el genoma (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), mientras que en células de humano sólo existen 3 (Sherr, 1995). No es clara la razón de la existencia de tantas ciclinas, aunque se puede especular que cada una tiene un tiempo específico de acción, o bien un tejido específico, o principal, de acción. También es probable que tengan funciones redundantes

Las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de plantas, al igual que las de otros eucariotes, muestran una misma organización estructural típica (Figura 3), 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 (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Menges

et al., 2007). El dominio amino terminal tiene una longitud aproximada de 120 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. Otra característica de las ciclinas es la presencia del motivo LxCxE de unión a la proteína RB, el cual también se encuentra cercano al extremo N terminal y está presente en casi todas las secuencias de ciclinas D. El dominio carboxilo terminal está presente en muchas, pero no en todas las ciclinas, lo que sugiere una función específica pero quizá no crítica. Algunas ciclinas D de plantas también poseen cajas PEST que permiten su degradación por ubiquitinación; sin embargo, solo 10 de las 17 ciclinas D de maíz contienen esta secuencia (Inzé y De Veylder, 2006; Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

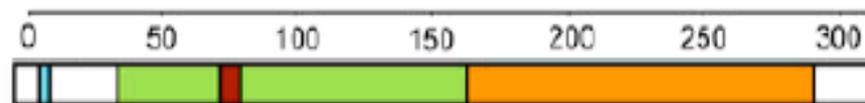


Figura 3. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas. ■ Dominio ciclina-N-terminal, ■ dominio ciclina-C-terminal, ■ caja ciclina, ■ motivo LxCxE. Escala en número de aminoácidos.

1.3.7 Regulación y expresión génica de Ciclinas D

El control de la expresión génica puede ocurrir a varios niveles, siendo el nivel primario el que involucra la transcripción. Para que comience este proceso se requiere una estructura apropiada de la cromatina, así como la presencia de las secuencias promotoras y de las secuencias que modulan la transcripción de cada gen. Una vez que se transcribe el RNAm, éste debe ser procesado a un mensajero maduro y exportado fuera del núcleo de manera que permita la traducción por la maquinaria ribosomal. Los puntos finales de control se ejercen a nivel de la proteína mediante modificaciones que afectan su función (Cullis-Wiley, 2004).

No todos los genes se encuentran prendidos todo el tiempo en el ciclo de vida de una planta; es decir, se requieren diferentes genes durante las distintas etapas de desarrollo y maduración sexual. A grandes rasgos, existen dos tipos de control para la expresión génica:

- Regulación temporal. Cuando un gen es expresado únicamente en un período específico del desarrollo, como por ejemplo durante el desarrollo de la flor.
- Regulación espacial. Cuando un gen es únicamente expresado en un lugar o tejido específico en la planta (Cullis-Wiley, 2004).

En el 2007 se demostró que los genes de CYCD3 y CYCD6;1 de *Arabidopsis* están altamente correlacionados en su expresión con ciclinas mitóticas, indicando que estos niveles puede ser un reflejo del número de células en división (Menges y Murray, 2008). Por otro lado la CYCD1;1 muestra la mayor abundancia en flor y ápice de tallo, mientras que las CYCD3;3 y CYCD4;1 tienen mayor expresión en raíz y la CYCD2;2, aunque más o menos expresada constantemente, muestra los niveles de expresión más elevados en polen maduro (Menges and Murray, 2008).

En arroz la CYCD2;1 es fuertemente expresada en desarrollo y semillas germinando en presencia de luz, pero no se expresa en oscuridad (Nakano *et al.*, 2006). Durante esta etapa únicamente se observó la expresión adicional de la CYCD5;1 que de igual manera se expresaba en raíces maduras y ovarios (Nakano *et al.*, 2006).

Por otro lado, en maíz las CYCD 2;1, 4;1, 5,1 y 5;2 tienen patrones diferentes de expresión durante la germinación de semillas. La CYCD5,2 es expresada durante etapas tempranas y la CYCD4;1 muestra una acumulación desde niveles casi indetectables en semilla seca (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). La adición de auxinas y citocininas, encargadas de acelerar el proceso de germinación, modifican el patrón de expresión de todas las ciclinas estudiadas, siendo las citocininas las encargadas de producir un incremento en las primeras horas de germinación (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).

Recientemente se estudió el patrón de expresión de las 13 CYCDs restantes de maíz; observándose que casi todas se expresan durante la germinación; su expresión también se estudió en plántulas, donde fue claro que se acumulan a niveles más elevados en raíz (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

1.3.8 Promotores de genes de Ciclinas D

Para la regulación de la expresión génica se requieren secuencias promotoras específicas, que pueden ser constitutivas o inducibles. Un promotor constitutivo es aquel que funciona en todos los tejidos bajo cualquier condición, mientras que uno inducible es únicamente activado en respuesta a estímulos específicos. Un promotor constitutivo puede manejar diferentes niveles de expresión pero no puede ser completamente silenciado en ningún tejido (Lessard *et al.*, 2002). El lugar y tiempo específico en el que se da la expresión de cada gen depende de las características de su región promotora y la presencia de los factores de transcripción.

Tabla 4. Motivos conservados en promotores de genes de CYCD en *Arabidopsis* y poplar. Modificada de Menges *et al.*, 2007.

Subgrupo CYCD	Motivo	Posición	Sitio de Unión
CYCD1	TAACCGTCTCTC	-135	No encontrado
	GCAACAACACCA	-113	No encontrado
	ATAAATAAAAAC	-96	Caja TATA
CYCD2	TTACTTTG	-948	Proteína de unión a DNA en papa
	GGTGGTAG	-645	Proteína de dedos de zinc en raíz de alfalfa, regula tolerancia a sal
	ACGTTACC	-440	Factor GT-3 ^a
	AGGTGTTTAAGA	-930	No encontrado
	TAATTA ACTTAA	-795	SBF-1
	TGACAAAATATT	-780	No encontrado
	CYCD3	TTTCACGC	Consenso
TTTCTCGCGC		Consenso	E2F clase 1
CYCD5	TTTGGCGGCACC	-189	Complejo E2F
	TAACCGCT	-229	MSA
	CAAATAAAACCT	-278	Parecido a caja ccaat/tata
	AACTAAATGATT	-926	Proteína de unión a DNA específica de plantas
CYCD6	TTAAATAC	-417	Específico de L1
	AAACA ACT	-622	Elemento rico en CA
	TCTAATAAAAAC	-665	No encontrado
	TTATGAATATTT	-569	No encontrado
	TTATAAAAACAC	-493	Caja TATA
CYCD7	ATTTACCGCGTTTCA-TGTGGGACG	-467	GT1(en tabaco) y GT2 (en arroz)
	CGACGTCT	-445	Factor bZIP
	TTAAAGCT	-931	Factor Dof 2
	CGTGGA CT CACG	-569	No encontrado
CYCD3/6	TTTCCCGCGC	Consenso	Factor E2F

Para un gen de respuesta temprana, que además está encargado de la regulación del progreso del ciclo celular como lo es el de una CYCD, los elementos de respuesta presentes en su promotor deberían responder a factores estimuladores de proliferación; sin embargo, el estudio de estos elementos reguladores en promotores de ciclinas de plantas es prácticamente nulo por lo que la información acumulada hasta el momento se resume en la tabla 4; en ésta se describen los datos mostrados para estudios de reconocimiento de motivos reguladores dentro de genes de CYCD, donde podemos resaltar que solo en los promotores de los subgrupos CYCD3 y CYCD5 se encuentra presente el motivo de unión del factor E2F (Ito *et al.*, 200), factor requerido por genes esenciales de la fase S (van den Heuvel y Dyson, 2008). Sin embargo, el resto de los elementos mostrados en esta tabla no indican que el gen responda a factores reguladores de crecimiento como pueden ser hormonas, fuente carbonada o condiciones ambientales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios sobre ciclo celular en plantas han involucrado fundamentalmente especies de dicotiledóneas. Se conoce muy poco sobre la regulación del ciclo celular en monocotiledóneas, aunque el trabajo en arroz comienza a ser importante. De hecho, la tendencia actual de la investigación mundial en plantas es la de involucrar especies comercialmente importantes como las gramíneas.

Recientemente, se demostró que la expresión ectópica de la CYCD2;1 de trigo en *Arabidopsis* afecta la morfología vegetal y retarda el crecimiento (Wang *et al.*, 2006). Por otra parte, en plantas de tabaco que sobre-expresan *Arath*;CYCD2;1, la longitud de la fase G1 se reduce y el ciclo celular es más rápido derivando en plantas transgénicas con una tasa mayor de iniciación de hojas, aceleramiento del desarrollo y mayor número de raíces, sin ninguna alteración morfológica (Cockcroft *et al.*, 2000). En contraste, la sobre-expresión de *Arath*;CYCD3;1 trajo como consecuencia hojas curvadas por un incremento en el número de células con menor tamaño y pérdida parcial de la organización celular en *Arabidopsis* (Meijer y Murray, 2001). También la sobre-expresión de *Arath*;CYCD3;1 lleva a la inhibición de la salida del ciclo celular y de la diferenciación de los tejidos foliares, por lo que retarda el desarrollo vegetal (Dewitte *et al.*, 2003). De esta manera, se ha propuesto que la sobre-expresión de *Arath*;CYCD2;1 promueve la división celular, pero no altera los patrones de desarrollo; mientras que la sobreexpresión de *Arath*;CYCD3;1 tiene efectos sobre la morfogénesis (Meijer y Murray, 2001; Dewitte *et al.*, 2003).

El grupo de trabajo del doctor 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 la germinación de la semilla. En los últimos años se han dirigido los esfuerzos a caracterizar ciclinas D, como reguladoras fundamentales de la fase G1 del ciclo, debido a que creemos que están relacionados con el establecimiento y avance de la germinación de semillas. Como parte de los trabajos anteriores, primero se clonaron cuatro diferentes ciclinas D de maíz, que han sido llamadas CYCD2;1, CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2 (Renombradas por Buendía-Monreal en el 2011 como CYCD2;2, CYCD4;2, CYCD5;3A y CYCD5;3B respectivamente), y se estudió

su patrón de expresión durante la germinación. Todas estas ciclinas D muestran niveles diferentes de RNAm y este patrón es regulado positivamente, en algunos casos drásticamente, por la adición de fitohormonas como las citocininas y las auxinas (BA e AIA, respectivamente), sugiriendo que no actúan en forma redundante (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Posteriormente, se demostró la existencia de 13 ciclinas D adicionales a las reportadas en el 2006; donde se demuestra que sus mensajeros tienen patrones de acumulación casi en todos los casos y que estas responden a la adición de hormonas vegetales principalmente siendo reprimidas por la adición de ABA (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). 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 y AIA exógeno. Sin embargo, la adición de fitorreguladores (AIA, BA) no modifica significativamente la cantidad de ninguna de las ciclinas, y por el contrario, algunas muestran una ligera reducción de niveles. Por lo tanto, es difícil establecer asociación entre el nivel de RNAm y la cantidad de proteína observable para ninguna de estas ciclinas (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2008). Notablemente, la actividad de cinasa asociada a los complejos CDK-CYCD sí responde positivamente a la adición de AIA y BA, por lo que se concluye que los fitorreguladores actúan tanto a nivel de expresión génica en las ciclinas como a nivel de activación de los complejos CDK-CYCD (Lara *et al.*, 2008).

Aunado a esto, la CYCD2;2 es capaz de unirse a dos diferentes tipos de CDKA de maíz y estos complejos fosforilan a la proteína RBR (Gutiérrez *et al.*, 2005), lo que hace a este gen interesante para su estudio debido a la confirmada participación en la regulación de la transición hacia la fase S.

Dada esta evidencia, podemos notar que fitohormonas como auxinas y citocininas, encargadas de la regulación del ciclo celular, de la proliferación celular, del desarrollo y establecimiento de la planta; tienen un impacto sobre la regulación de la expresión de genes de CYCD más que sobre la acumulación de las propias proteínas, muy probablemente debido a la constitución de sus regiones promotoras, que son las encargadas de percibir las respuestas estimulantes o represoras que en conjunto producirán los

niveles esenciales de mensajeros de CYCD en los distintos estados metabólicos de las células.

Es por esto y por la muy pobre información existente en cuanto a la regulación a nivel transcripcional de los genes de CYCD (Tabla 4), que consideramos importante conocer la estructura y función de un promotor de ciclina D, esto con el propósito de generar mas información que pueda ayudarnos en el entendimiento de la regulación del paso de las células por el ciclo celular y sus principales puntos de transición.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los elementos *cis* reguladores dentro del promotor de la CYCD2;2 de maíz capaces de regular la expresión génica.

3.2 Objetivos particulares

- Clonar la región promotora de la CYCD2;2 y determinar la posición, número y tipos de elementos de control encontrados en esta región.
- Analizar diferentes regiones del promotor de la CYCD2;2 mediante su fusión a GFP.
- Transformar mediante biobalística callos embriogénicos de maíz y células de epidermis de cebolla con las construcciones de las distintas regiones del promotor de la CYCD2;2.
- Comparar la actividad de los fragmentos del promotor de CYCD2;2 con el promotor CaMV35S mediante la expresión de GFP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Clonación de las regiones promotoras

Conociendo la secuencia del promotor de la ciclina CYCD2;2, así como los putativos elementos reguladores presentes en ésta y sus dos posibles sitios de inicio de la transcripción ubicados en -333 y -144 (posiciones en la región 5' del inicio de la traducción), se realizaron construcciones con la región promotora larga (-2565 a -1) y versiones truncadas, las cuales fueron denominadas promotor distal (-873 a -1), promotor proximal (-407 a -1), promotor medio (-340 a -1), promotor núcleo (-189 a -1) y promotor UTR (135 a -1). Se diseñaron cebadores específicos (Tabla 5) para aislar cinco fragmentos distintos. Dichos fragmentos fueron amplificados por PCR y clonados en un vector de clonación (pGEM-TEasy).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para obtener fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2. Se resalta en negritas el sitio de corte para las enzimas de restricción HindIII y XbaI.

Promotor de ciclina	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	Fragmento esperado
promCYCD2;2 UTR	FW AAG CTT GAG TAG CAA ATC CAG ACT CCA RV TCT AGA ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	135
promCYCD2;2 núcleo	FW AAG CTT GAG TAG CAA ATC CAG ACT CCA RV TCT AGA ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	190
promCYCD2;2 medio	FW AAG CTT GAG TAG CAA ATC CAG ACT CCA RV TCT AGA ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	351
promCYCD2;2 proximal	FW AAG CTT TCA CTA TTC ACT AGG CAC AGC G RV TCT AGA ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	407
promCYCD2;2 distal	FW AAG CTT TCA CTA TTC ACT AGG CAC AGC G RV TCT AGA ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	873
promCYCD2;2 largo	RV TCT AGA TGA GAA TCC GTC TCG GCT CAT RV TCT AGA ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	2565

A estos cebadores se les añadió un sitio de corte específico para las enzimas de restricción HindIII (a los oligonucleótidos *forward*) y XbaI (para los oligonucleótidos *reverse*) con el fin de poder clonar cada una de las secuencias promotoras en el vector pGEM-TEasy utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante (www.promega.com; Robles y Doers, 1994), secuenciarlas para su corroboración y darle dirección a esta clonación y a las posteriores. Las condiciones de los ensayos de PCR utilizando AccuPrimeTMSuperMixII son las recomendadas por el fabricante: Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de reacción (Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C, Alineamiento: 1 minuto a 59 °C y

Extensión: 1 minuto por cada 1000 pb a 72 °C) y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

4.2 Construcción de las fusiones de cada promotor a los genes reporteros GFP y GUS en pBGWFS7.0 (Sistema Gateway)

Las regiones promotoras, ya clonadas en el vector pGEM-TEasy, fueron subclonadas en un vector de expresión para células vegetales, pBGWFS7.0 utilizando la tecnología Gateway®, que es un método universal de clonación basado en las propiedades de recombinación sitio-específico del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Para esto se tomaron los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3, y se les añadió el sitio de recombinación (Tabla 6). Se amplificaron los fragmentos por PCR.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para obtener fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2 y realizar las reacciones de recombinación. En negritas se muestra la región de recombinación.

Promotor de ciclina	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	Fragmento esperado
promCYCD2;2 UTR	FW GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGA GTA GCA AAT CCA GAC TCC A RV G GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG CAC CAT GCT TGC CAC GCC ACC	185
promCYCD2;2 núcleo	FW GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT GAT TAA ATC AAG AAG AGG AAG A RV G GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG CAC CAT GCT TGC CAC GCC ACC	250
promCYCD2;2 medio	FW GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT CCA CTA GTC TCT CTC CTA CTG T RV G GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG CAC CAT GCT TGC CAC GCC ACC	401
promCYCD2;2 proximal	FW GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC ACT ATT CAC TAG GCA CAG CG RV G GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG CAC CAT GCT TGC CAC GCC ACC	457
promCYCD2;2 distal	FW GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGC AAT AAA ACT CCA CTC GGG A RV G GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG CAC CAT GCT TGC CAC GCC ACC	933
promCYCD2;2 largo	FW GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAC GCC ACC TAC TTG CCG AA RV G GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG CAC CAT GCT TGC CAC GCC ACC	2615

4.3 Preparación y transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Se inocula una colonia aislada de un Stock de glicerol de la cepa de *E. coli* en 10 mL de caldo Luria (LB) en un matraz de 125 mL y se incuban a 37 °C y 250 rpm por toda la noche. Posteriormente se transfieren 2 mL del cultivo a 200 mL de LB en un matraz de 1 L y se incuban a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcance una absorbancia a 590 nm de 0.375.

Después de esto el cultivo es transferido a 4 tubos Falcon de 50 mL estériles y se dejan 10 minutos a 4 °C. Se centrifugan a 3000 rpm a 4 °C por 7 minutos y se resuspende cada botón celular en 10 mL de CaCl₂ (60 mM/glicerol 15 %) frío.

Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm a 4 °C por 5 minutos y se resuspende cada botón celular en 10 mL de CaCl₂ (60 mM/glicerol 15 %) frío y se mantiene en hielo por 30 minutos. (Nota: El contenido de los tubos puede juntarse en un mismo tubo). El tubo restante se centrifuga a 3000 rpm a 4 °C por 7 minutos, se resuspende el botón celular en 2.5 mL de solución de CaCl₂ (60 mM/glicerol 15 %) fría y se hacen alícuotas de 100 μ L en tubos eppendorf las cuales se sumergen en N₂ líquido hasta congelar y se almacenan a -70 °C.

Para transformar la cepa se toma una alícuota de células competentes y se le adiciona de 0.1 a 1.0 μ g de DNA plasmídico, se incuban en hielo por 20 minutos y se da un choque térmico a 42 °C por 2 minutos y posteriormente se adiciona 1 ml de caldo Luria e incuba por 30 minutos a 37 °C. Se plaquea 0.1 mL de la muestra sobre una caja con medio LB agar con el antibiótico apropiado.

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el *illustra*TM plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) y con PureLinkTM HiPure Plasmid Maxiprep Kit siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

4.4 Reacciones de Recombinación

Una vez obtenidos los fragmentos de los tamaños mostrados en la Tabla 4, se realizó la primer reacción de recombinación utilizando como vector donador al plásmido pDNRTM/Zeo con el BP ClonaseTM II Enzyme Mix, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 4), y de esta manera se

obtuvo la clona de entrada con la que se transformó *E. coli* DH5 α (ver sección 4.3) y se plaqueó en cajas de LB Zeocina 50 $\mu\text{g/ml}$.

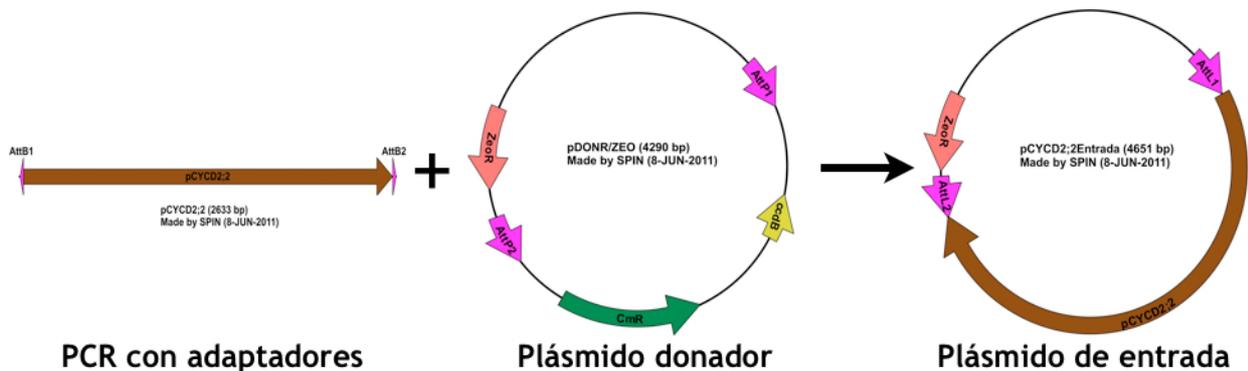


Figura 4. Esquema de la reacción BP

Las colonias obtenidas que corresponden a células transformadas se rayaron en cajas con medio LB/zeocina y duplicaron en cajas con LB/zeocina/cloranfenicol (50 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$), eligiendo aquellas que crecieron únicamente en la caja con zeocina. Se realizó PCR en colonia para confirmar la presencia del inserto y se extrajo el plásmido con PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit. Con las clonas de entrada obtenidas, se realizó la segunda reacción de recombinación utilizando como plásmido destino a pBGWFS7.0 con el LR Clonase™ II Enzyme Mix, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 5), obteniendo como producto final la clona de expresión que es el vector pBGWFS7.0 al cual se le insertó alguno de los fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2 fusionado en marco de lectura con el gen reportero GFP.

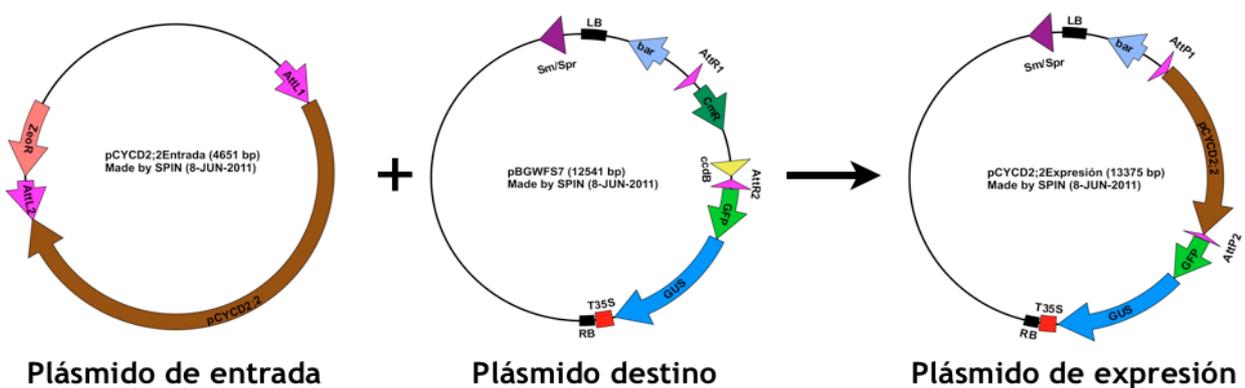


Figura 5. Esquema de la reacción LR

Las colonias obtenidas que corresponden a células transformadas se rayaron en cajas con medio LB/espectinomicina (100 $\mu\text{g/ml}$) y duplicaron en cajas con LB/espectinomicina/cloranfenicol (100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$), eligiendo aquellas que crecieron únicamente en la caja con espectinomicina. Se realizó PCR en colonia para confirmar la presencia del inserto y se extrajo el plásmido con PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit, obteniendo así las construcciones con las que se transformará el material biológico (una se adiciona con el promotor 35S que se utilizará como control de transformación).

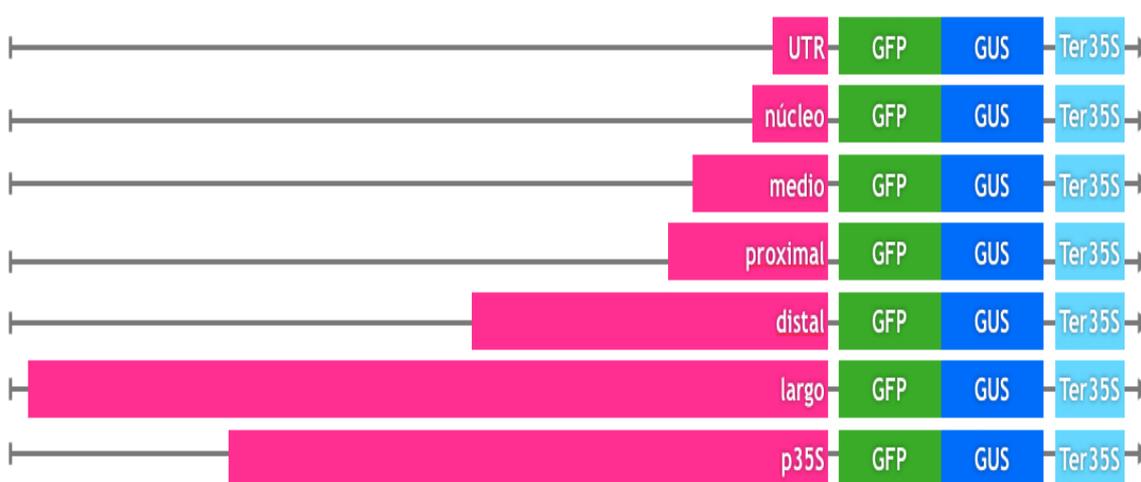


Figura 6. Esquema de los *cassettes* de expresión de los vectores pBGWFS7/promotores de CYCD2;2. Ter35S, terminador del virus de mosaico de la coliflor.

4.5 Modelos de Estudio

4.5.1 Cultivo de Tejidos Vegetales de los Callos embriogénicos de Maíz.

El material biológico utilizado para la transformación genética fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. Los callos embriogénicos tipo II de maíz fueron obtenidos de embriones inmaduros de 8-10 días de edad. El medio N6P fue empleado para su inducción y proliferación (Chu *et al.*, 1975). Los cultivos celulares de maíz fueron mantenidos en crecimiento durante 3-4 meses previo a la transformación genética.

Las células transformadas se seleccionaron pasando los callos dos días después del bombardeo a medio de proliferación N6P líquido primero

por dos semanas y sólido después (Guerrero-Andrade, 1998), adicionado con 3 mg/L de glufosinato de amonio, manteniendo periodos de resiembra de dos semanas.

4.5.2 Epidermis de Cebolla

Se tomó una cebolla entera la cual fue sometida a un proceso de desinfección que consiste en sumergir la cebolla en una solución de agua estéril con 10 % de hipoclorito de sodio y unas gotas de tween 20 y desinfectante de verduras. Se mantuvo en agitación constante por un periodo de 15 minutos.

Al término de esto se hace un lavado con agua estéril por 10 minutos en agitación constante y finalmente se escurre el exceso de agua y se hacen cortes para obtener la capa de la epidermis en fragmentos de 1 cm² aproximadamente. Los cortes se colocan en una caja con medio MS y se transforman por biobalística.

4.6 Transformación de callos embriogénicos por biobalística

4.6.1 Preparación de las partículas de tungsteno

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 mm de diámetro (M5) y se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 mL, después se añadieron 2 mL de HNO₃ 0.1 M y se sonicó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se eliminó el HNO₃, se añadió 1 mL de agua desionizada estéril y la muestra se transfirió a un tubo de 2 mL sonicándose brevemente.

Las micropartículas se centrifugaron 30 segundos a 10 000 rpm, se eliminó el agua y se agregó 1 mL de etanol absoluto (100%). Nuevamente se sonicó brevemente, seguido de una centrifugación a 10 000 rpm durante 30 segundos para eliminar el etanol. Posteriormente se agregó 1 mL de agua desionizada estéril, y se sonicó brevemente. Se colocaron 200 mL de la suspensión de micropartículas en tubos eppendorf y se agregaron 750 mL de agua desionizada estéril a cada tubo, almacenándolos a -20°C hasta su uso.

4.6.2 Acoplamiento del DNA a las partículas

En un tubo eppendorf se colocaron 50 mL de la suspensión de micropartículas de tungsteno, después se agregó cada uno de los siguientes

reactivos agitando la suspensión entre adiciones: primero se añadieron 5 μL de DNA (1 mg/mL), evitando que el DNA se mezclara con las partículas hasta la adición de 50 μL de cloruro de calcio 2.5 M, seguida de 20 μL de espermidina 0.1 M. Esta mezcla se agitó durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó durante 10 segundos. Se eliminaron 100 μL del sobrenadante resuspendiendo las partículas en el líquido restante. Finalmente se aplicaron 5 μL de las micropartículas cubiertas con el DNA en el centro del filtro del dispositivo de bombardeo.

4.6.3 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno

La transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13 cm entre el filtro del dispositivo de bombardeo y el tejido blanco, en un vacío de 20-22 in Hg.

Se tomaron los callos embriogénicos 10 días después del subcultivo y se colocaron, un día antes del bombardeo, en cajas petri de 60 x 15 mm con 15 mL de medio gelificado con 2.8 g/L de Gel-gro. Se colocó una porción extendida de callo embriogénico de 1 cm de diámetro (una capa delgada de aproximadamente 3 mm de espesor) en el centro de la caja. Una vez bombardeados los callos, se sellaron las cajas y se mantuvo en incubación a 27 ± 1 °C con fotoperíodo de 12 h luz / 12 h oscuridad.

Dos días después del bombardeo se eligieron al azar algunos callos para medir la expresión transitoria del gen *gus* y los demás se colocaron en medio de cultivo adicionado con glufosinato de amonio para selección de células transformadas.

4.7 Extracción y cuantificación de proteínas a partir de callos embriogénicos de maíz

Una muestra de callos embriogénicos es congelada con nitrógeno líquido y molida hasta polvo, la muestra puede ser almacenada a -70 °C. En un tubo de 1,5 ml se pesan 250 μg del tejido molido sin descongelar y se adiciona 250 μl de Buffer de extracción (Tris-HCl 70 mM, MgCl_2 1 mM, KCl 25 mM, Na_2EDTA 5 mM, sacarosa 0,25 mM, DTT 7,5 mM y Tritón X-100 0,1 %); hasta este punto la muestra debe seguir congelada. Los tubos se colocan en el vortex por 5 minutos y se centrifugan 15 minutos a 13 000 rpm y 4 °C, se

pasa el sobrenadante a un tubo nuevo y con este se continúa para hacer la cuantificación.

Se realiza una curva estándar utilizando una solución de ASB 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la siguiente manera:

Tabla 7. Curva patrón para la cuantificación de proteínas totales solubles

Punto de la Curva [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Volumen ABS (μl)	Volumen H ₂ O (μl)
0	0	10
1	1	9
2	2	8
4	4	6
6	6	4
8	8	2
10	10	0

Para las muestras se toma 1 μl de la extracción y 9 μl de H₂O y al igual que para los puntos de la curva se hace por duplicado. Una vez hechas las mezclas se toman 10 μl de cada una y se colocan en placas por duplicado de manera horizontal. A cada muestra se le adiciona 190 μl de colorante de Bradford en cada pozo y se procede a la lectura a 595 nm.

4.8 Inmunodetección de los reporteros GFP y GUS

Para la detección de la GFP-GUS se corren 200 μg de proteína total soluble en un gel de poliacrilamida al 10 % por 1,5 h a 120 V. Posteriormente se transfieren a una membrana de PVDF de 0,45 μm de poro previamente hidrolizada con metanol, utilizando como buffer de transferencia CAPS 1X por 1,5 h a 75 mA.

Una vez hecha la transferencia se bloquea la membrana con suero fetal bovino por media hora en agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se hacen tres lavados de 10 minutos con PBS 1X (Tween 20 0,5 %). Se adiciona el primer anticuerpo anti- β -Glucuronidasa (fracción de IgG de conejo) de Invitrogen 1:1000 en una solución de PBS 1X (leche 5 % y Tween 20 0,5 %) y se incuba a temperatura ambiente por 1 h en agitación constante. Después se hacen tres lavados de 10 minutos con PBS 1X (Tween 20 0,5 %) y se adiciona el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa alcalina de Sigma 1:40000 en una solución de PBS

1X (leche 5 % y Tween 20 0,5 %) y se incuba a temperatura ambiente por 1 h en agitación constante y se lava nuevamente por triplicado.

La identificación de las proteínas se lleva a cabo con el sistema de quimioluminiscencia (Amersham); para eso se deja incubar la membrana por 2 minutos en presencia del sustrato (luminol), se expone la película de rayos X por 5 minutos sobre la membrana y finalmente se revela.

4.9 Extracción de DNA genómico de callos embriogénicos de maíz

Se muele una muestra del tejido al que se le va a extraer el DNA y se pesan 350 mg en un tubo estéril de 15 ml. Después se adicionan 9 ml de buffer CTAB modificado (2 % CTAB, 1,5 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris y 2 % 2-mercaptoetanol) y se resuspende el tejido molido. Posteriormente se incuba a 60 °C por 90 minutos en agitación continua, una vez terminado el tiempo se dejan enfriar los tubos y se adiciona 4,5 ml de cloroformo-octanol (24:1) y se agita lentamente por 10 minutos. Se centrifuga a 12 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se decanta la fase acuosa (superior) en un tubo nuevo para repetir la extracción con cloroformo-octanol.

Se centrifuga nuevamente por 10 minutos a 12 000 rpm y la fase acuosa se pasa a un tubo nuevo con 6 ml de isopropanol y se mezcla por inversión. Con una punta de pipeta Pasteur se colecta el DNA y se lava en 2 ml de EtOH 76 %, 0,2 M NaOAc por 20 minutos, después, en 2 ml de EtOH 76 %, 10 mM NH₄OAc. Se deja secar (papel) el pellet, se resuspende en TE (50-400 µl) y se almacena a 4 °C por una noche. Finalmente se centrifuga por 10 minutos para separar los sólidos en una microcentrífuga y se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo para ser almacenado a 4 °C o -20 °C.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de la secuencia del promotor de la CYCD2;2

En un principio se contaba con la secuencia de cDNA de la ciclina tipo D 2;2 (CYCD2;2) de maíz. Para obtener la secuencia de la región promotora se realizó una búsqueda BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en la base de datos de secuencias genómicas (gss) de maíz; se eligieron aquellas secuencias que permitieran extender el extremo 5' del gen de ciclina y se alinearon de forma manual con la secuencia respectiva de cDNA, utilizando Seaview v4.2.6 y Geneious 5.0.3.

La secuencia obtenida como posible región promotora se acotó a un tamaño de 2565 pb. Mediante el diseño de cebadores específicos (Tabla 5), y utilizando PCR, la secuencia promotora se amplificó (Figura 7) y clonó en el vector pGEM-TEasy y se secuenció para su corroboración.

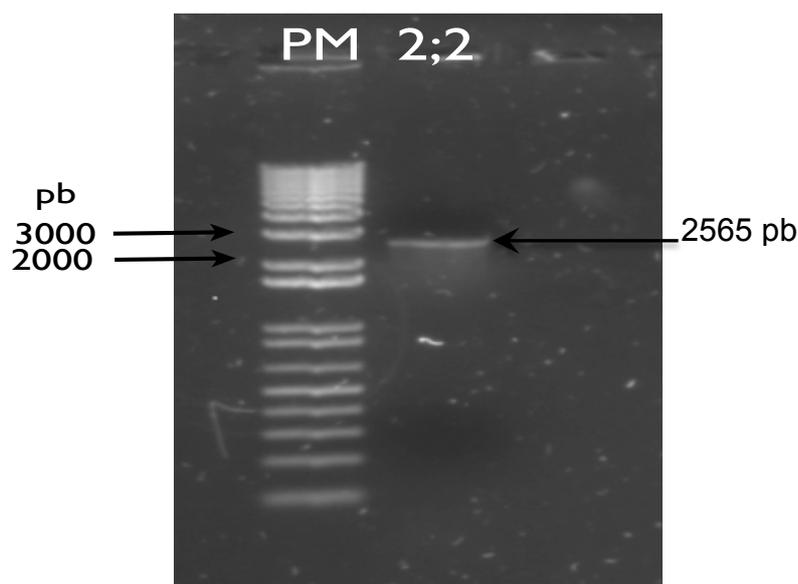


Figura 7. Amplificación por PCR del promotor largo de 2565 pb de la CYCD2;2.

Posteriormente se hizo un alineamiento de la secuencia promotora putativa de la ciclina D2;2 del maíz variedad B73, obtenida mediante alineamientos con el BLAST del NCBI, y la secuencia promotora de la ciclina D2;2 de maíz, variedad Chalqueño, clonada en pGEM-TEasy. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias fue del 98.4 % (Figura 8).

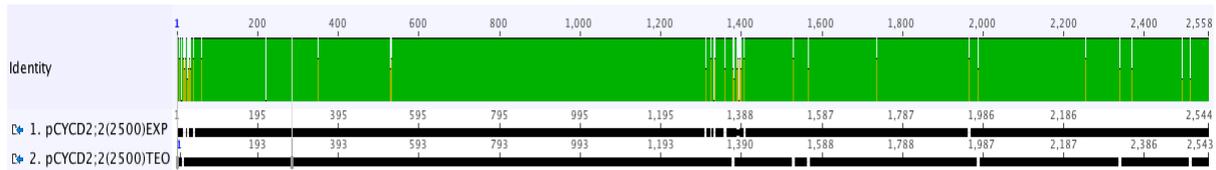


Figura 8. El alineamiento entre las secuencias teórica y experimental del promotor de la CYCD2;2 muestra un 98.4 % de identidad.

5.2 Caracterización *in silico* de la región promotora de la CYCD2;2

La secuencia obtenida como posible promotor de la CYCD2;2 fue sometida a un análisis *in silico* para primero corroborar que efectivamente se trataba de un promotor de plantas. Para esto, se utilizó el modelo propuesto por Yoshiharu en el 2007 (Figura 9A), donde se especifica que un promotor de plantas contiene marcadores como un sitio de inicio de transcripción (TSS), un parche de pirimidinas o parche Y, una caja TATA y una zona de regulación múltiple denominada regulón. En la figura 9B se observa que la secuencia obtenida cumple con todas las características previamente mencionada por lo que si es considerada como un promotor.

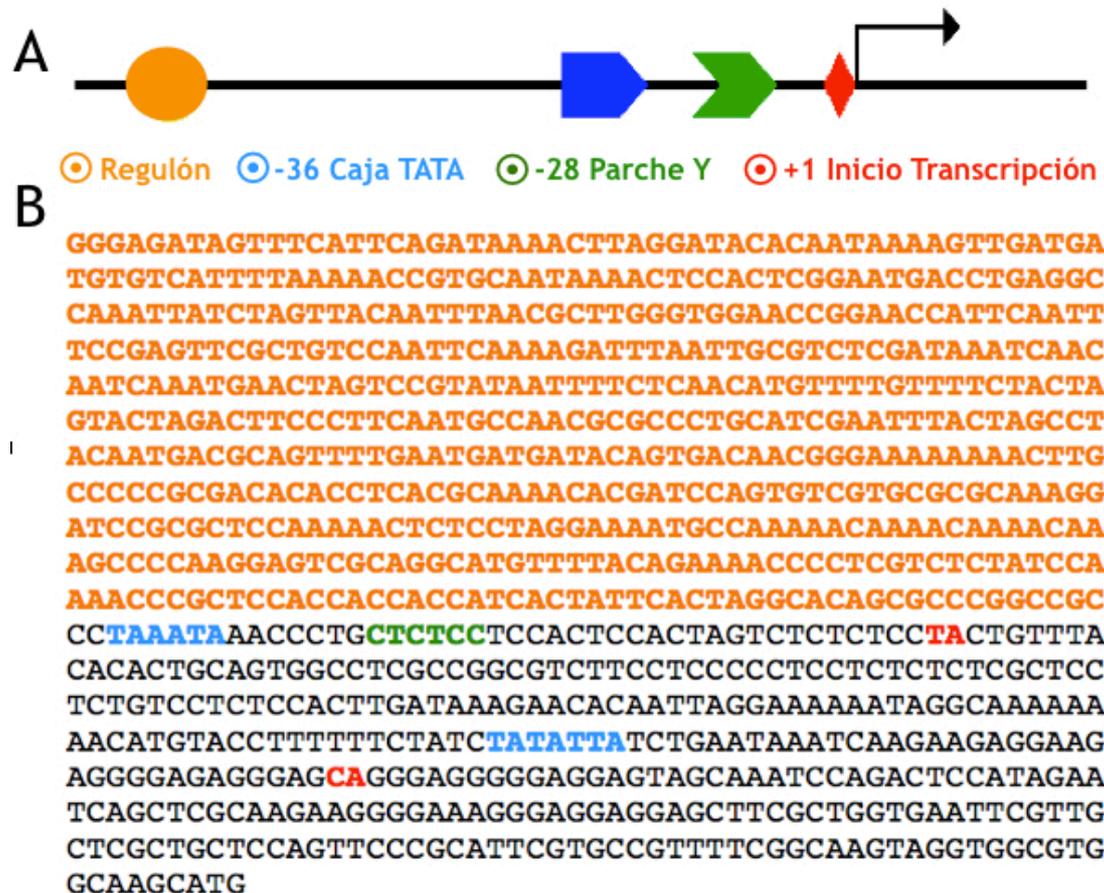


Figura 9. A) Modelo de un promotor de plantas. B) El promotor de la CYCD2;2 tiene 2 TSS, 1 Parche YR, 2 cajas TATA y una región de Regulón.

Se observó la presencia de dos sitios de inicio de transcripción ubicados en -144 y -333 (Bravo y Buendía, 2008), un parche YR en -356, dos cajas TATA en -180 y -369 y la presencia de una zona denominada regulón, la cual esta compuesta por distintos elementos de respuesta, de la cual se hizo un segundo análisis en la base de datos PLACE, para saber el número, la posición y el tipo de elementos de respuesta que se encuentran incluidos en dicha secuencia. Los resultados resumidos (Figura 10) muestran que se encontraron, entre otros, elementos de respuesta a factores de crecimiento como hormonas (auxinas, citocininas, ácido giberélico, ácido abscísico) y azúcares. También se encontraron elementos de respuesta a factores de transcripción implicados en el desarrollo vegetal como los MYB y DOF, además de otros que responden a luz y a invasión de agentes patógenos.

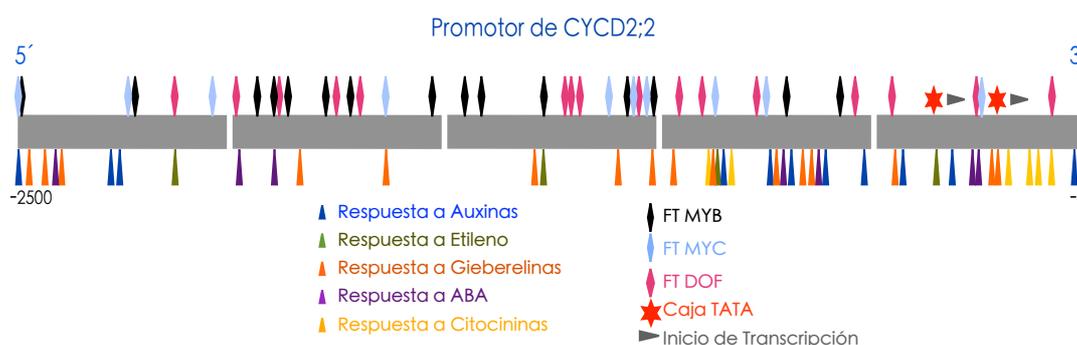


Figura 10. Estructura del promotor de la CYCD2;2.

A partir de la secuencia y de los dos sitios de inicio de la transcripción reportados para la ciclina CYCD2;2 de maíz (Bravo y Buendía, 2008) y de la posición que tienen los distintos elementos de respuesta, se decidió fraccionar dicho promotor para poder determinar la región en la que se encuentran los elementos reguladores mínimos para expresión del gen, los cuales fueron denominados promotor distal (CYCD2;2d de -873 a -1), promotor proximal (CYCD2;2p de -407 a -1), promotor medio (CYCD2;2m de -340 a -1), promotor núcleo (CYCD2;2n de -189 a -1) y promotor UTR (CYCD2;2UTR de -135 a -1), siendo los fragmentos núcleo y proximal los que contienen a los dos sitios de inicio de la transcripción en las posiciones -144 y -333. En la Tabla 8 se muestra un resumen de los elementos reguladores presentes en cada fragmento del promotor de la ciclina CYCD2;2.

Tabla 8. Fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;2 y los tipos de elementos de respuesta presentes en cada uno de ellos.

Contenido de los fragmentos del promotor de la CYCD2;2				
Distal (-873 a -1)	Proximal (-407 a -1)	Medio (-340 a -1)	Núcleo (-189 a -1)	UTR (-135 a -1)
Caja TATA -369 Caja TATA -180 Caja CAAT 2 TSS	Caja TATA -369 Caja TATA -180 Caja CAAT 2 TSS	Caja TATA -180 Caja CAAT 2 TSS	Caja TATA -180 Caja CAAT 1 TSS	
Cajas de respuesta a hormonas como citocininas, ABA, auxinas, etileno y giberelinas	Cajas de respuesta a hormonas como citocininas, ABA, auxinas, etileno y giberelinas	Cajas de respuesta a hormonas como citocininas, ABA, auxinas	Cajas de respuesta a hormonas como citocininas	Cajas de respuesta a hormonas como citocininas
Cajas de respuesta a fuente carbonada	Cajas de respuesta a fuente carbonada			
Cajas de respuesta a Frío y Luz				
Elementos reconocidos por FT como DOF, MYC y MYB	Elementos reconocidos por FT como DOF, MYC y MYB	Elementos reconocidos por FT como DOF y MYC	Elementos reconocidos por FT como DOF y MYC	Elementos reconocidos por FT DOF

Para amplificar los fragmentos propuestos para el estudio del promotor se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla 5 y los productos de PCR fueron monitoreados en un gel de agarosa al 1 % (Figura 11).

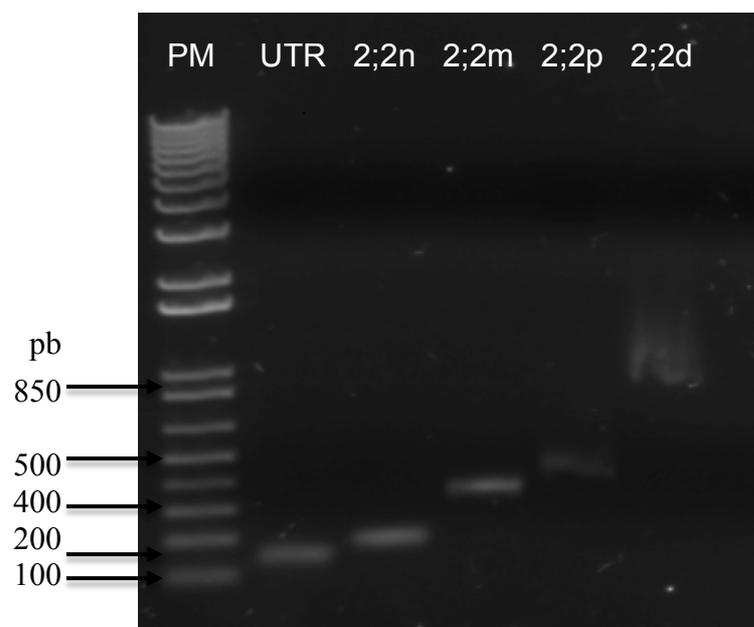


Figura 11. Amplificación por PCR de los fragmentos. Se observan las bandas correspondientes a CYCD2;2UTR 135 pb, CYCD2;2n 189 pb, CYCD2;2m 340 pb, CYCD2;2p 407 pb y CYCD2;2d 876 pb.

5.3 Fusiones traduccionales a GFP

Los productos de PCR mostrados en la figura 11 fueron clonados y purificados de pGEM-TEasy. Posteriormente se les añadió el sitio de recombinación para poder realizar las reacciones de recombinación; dichos sitios fueron adicionados mediante PCR. Los fragmentos amplificados (Figura 12) fueron purificados y cuantificados para posteriormente hacer las reacciones de recombinación e incluir estos insertos en el vector donador pDONR/ZEO y posteriormente en el de expresión pBGWFS7.0.

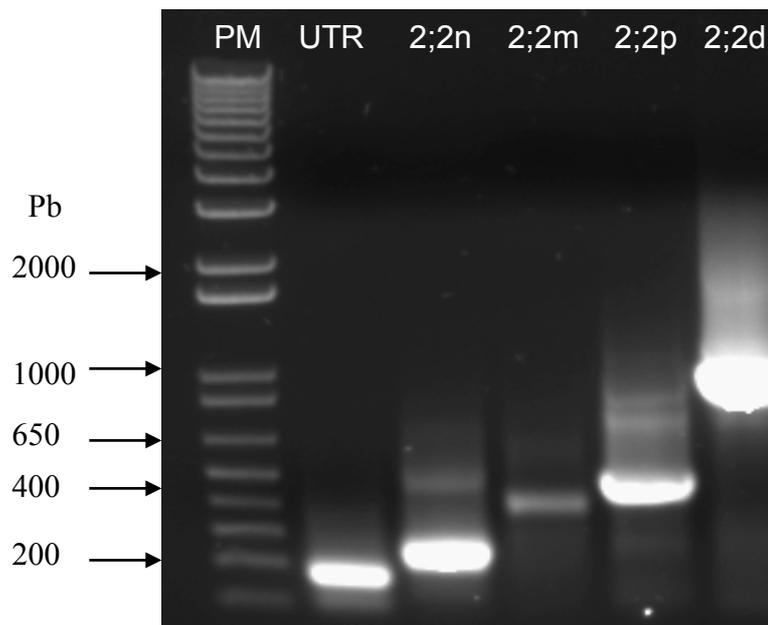


Figura 12. Amplificación por PCR de los fragmentos con los sitios de recombinación correspondientes a CYCD2;2UTR 185 pb, CYCD2;2n 250 pb, CYCD2;2m 401 pb, CYCD2;2p 457 pb y CYCD2;2d 933 pb.

Se puede observar de la figura anterior que las seis bandas amplificadas corresponden a los tamaños esperados, por lo que se asumió que los sitios de recombinación fueron añadidos de manera exitosa dando lugar al siguiente experimento que es la recombinación de Gateway.

Después de realizar las recombinaciones necesarias se obtuvieron las construcciones deseadas, en las cuales se demuestra la presencia del inserto de cada uno de estos fragmentos por medio de PCR en colonia (Figura 13) y amplificando el inserto de los cinco fragmentos del promotor de la CYCD2;2.

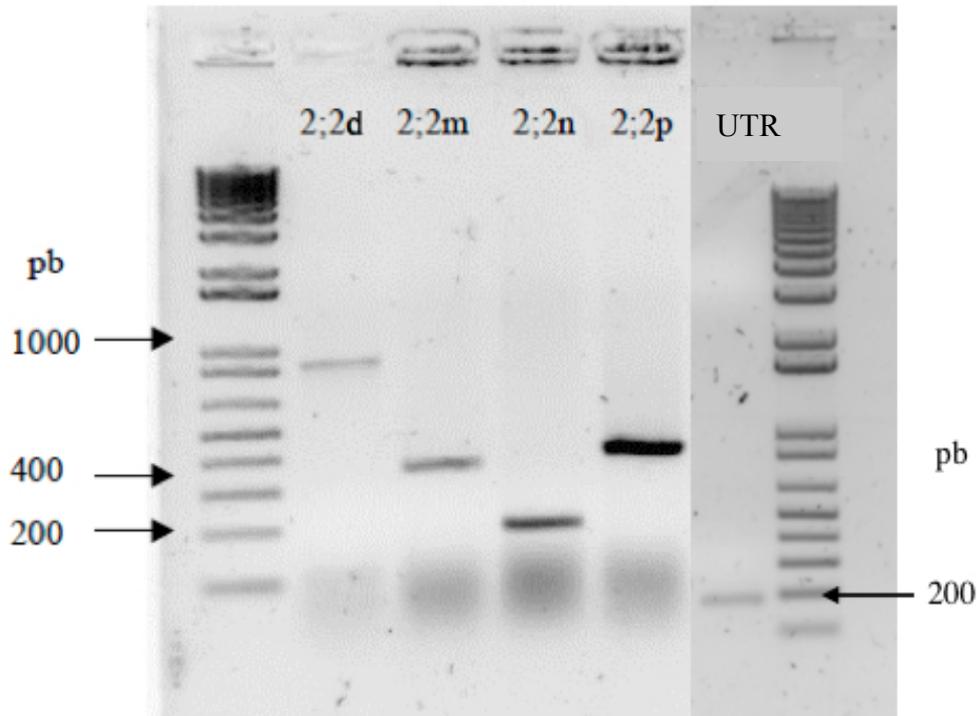


Figura 13. PCR en colonia de las clonas de expresión en *E. coli*. Podemos observar las bandas correspondientes a CYCD2;2d 933pb, CYCD2;2m 401 pb, CYCD2;2n 250 pb, CYCD2;2p 457 pb y CYCD2;2UTR 185 pb.

Se puede observar que se obtuvieron las cinco fusiones traduccionales que son las de los fragmentos CYCD2;2c, CYCD2;2p, CYCD2;2m, CYCD2;2n y CYCD2;2UTR y que en los cinco casos las bandas amplificadas correspondientes al inserto tienen un tamaño de acuerdo al esperado. Con estas construcciones es posible hacer el bombardeo de callos embriogénicos de maíz para realizar los estudios de actividad de GUS, o bien observar GFP en cultivos celulares, así como medir los niveles de ambos reporteros por medio de Western blot utilizando anticuerpos comerciales dirigidos contra GFP o a GUS.

5.4 Transformación de callos embriogénicos de maíz y células de epidermis de cebolla por biobalística

Utilizando una cámara de baja presión se transformaron callos embriogénicos de maíz con las construcciones obtenidas de los fragmentos CYCD2;2n, CYCD2;2p y CYCD2;2c. Posterior al bombardeo, los callos transformados fueron sometidos a un periodo de selección (glufosinato de amonio) para favorecer el crecimiento de las células transformadas. Después

de 2 meses de selección se buscó la presencia de la proteína GFP, visualizando los tejidos celulares por microscopía confocal

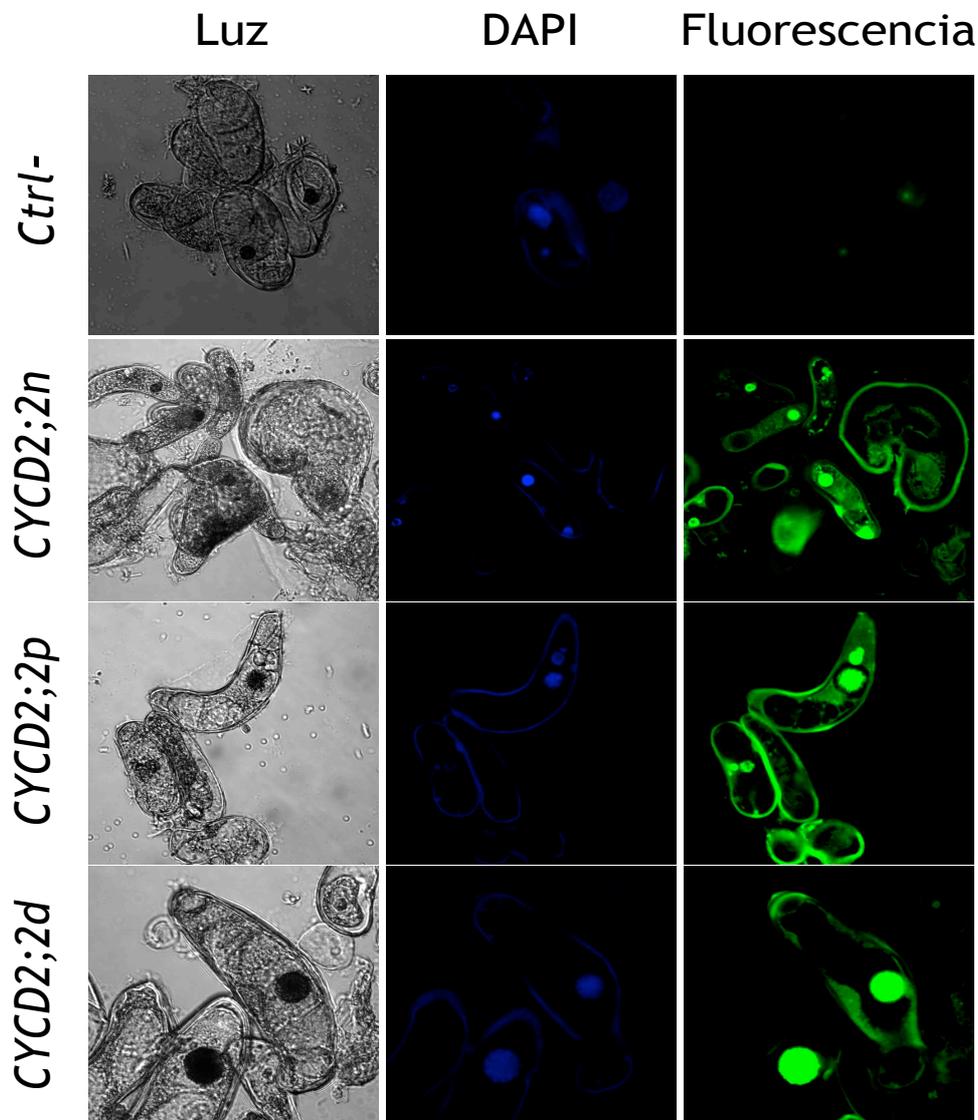


Figura 14. Fluorescencia de la proteína GFP en cultivos de callos embriogénicos de maíz transformados con el vector pBGWFS7.0 (Ctrl.-), CYCD2;2n, CYCD2;2p y CYCD2;2d.

La figura 14 permite ver la señal emitida por de la proteína verde fluorescente en los callos transformados con los fragmentos núcleo, proximal y completo del promotor de la CYCD2;2, mas no en el control. Al comparar la fluorescencia emitida en las células control sin transformar con las transformadas con los diferentes fragmentos de promotor, se nota un importante incremento de la fluorescencia en las células que son capaces de expresar primero al mensajero y posteriormente a la proteína GFP incluso

bajo el control del promotor núcleo, el cual contiene únicamente 45 pb de promotor, donde se encuentra una caja TATA, 1 TSS y 144 pb de UTR.

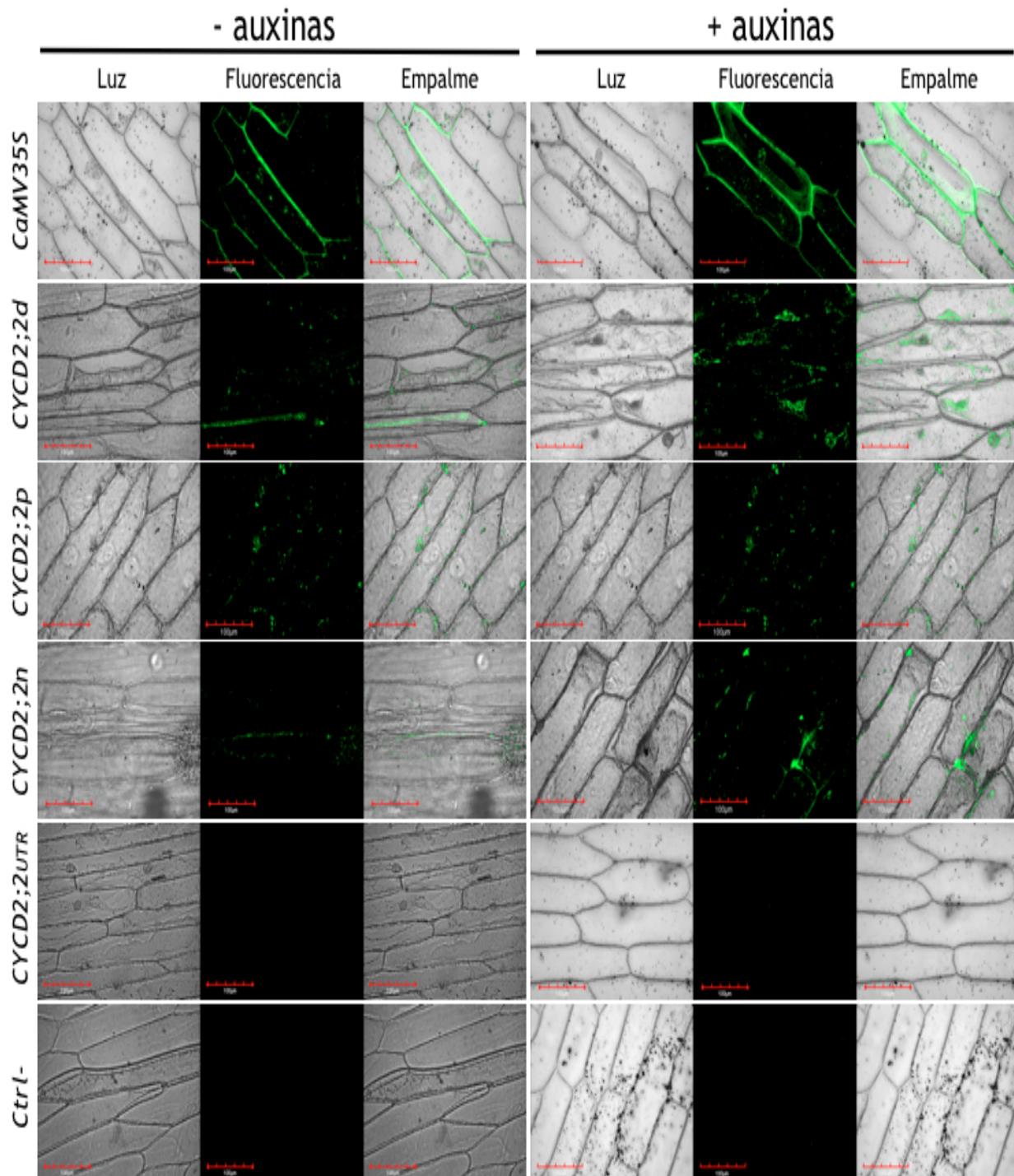


Figura 15. Fluorescencia de la proteína GFP-GUS en células de epidermis de cebolla transformadas con el vector pBGWFS7.0 (Ctrl.-), CaMV35S, CYCD2;2d, CYCD2;2p, CYCD2;2n y CYCD2;2UTR

Tratando de evaluar la participación de esta zona de 45 pb contenidos en el promotor núcleo, se diseñó la construcción CYCD2;2UTR que

estrictamente contiene 135 pb pero que corresponden a la región no traducida 5' (ver tabla 8), es decir, no hay región promotora debido a que se eliminaron los elementos basales reconocidos por la maquinaria transcripcional. Con esta construcción adicional y las anteriormente mostradas, se bombardearon células de epidermis de cebolla (Figura 15), debido a que ensayos de expresión transitoria pueden realizarse en este modelo y analizarse un día después de la transformación; además de permitir variaciones en la concentración de hormonas vegetales en el medio de cultivo. En la figura 15 se puede observar que la proteína verde fluorescente esta presente cuando se transforma con los promotores distal, proximal y núcleo, además del control positivo CaMV35S y no se observa en células transformadas con el control negativo. Cuando se transforma con la construcción pCYCD2;2_{UTR} la proteína verde fluorescente esta ausente, lo que indica que los elementos basales de expresión genética no están presentes y por lo tanto no es posible la transcripción y por consecuencia la expresión del reportero.

También en la figura 15 se puede observar que al adicionar auxinas al ensayo de expresión transitoria se produce una inducción de la expresión del gen reportero, muy probablemente debida a los elementos de respuesta a auxinas presentes en los distintos fragmentos del promotor de CYCD2;2 y por esto la fluorescencia detectada en células tratadas con auxinas es mayor que la detectada en células sin adición de auxinas. Además, en ambos tratamientos se observa que el promotor CaMV35S produce mayor respuesta que cualquier fragmento del promotor de la CYCD2;2, y que a mayor tamaño del promotor CYCD2;2 la respuesta producida incrementa, es decir, el promotor distal produce mayor expresión de GFP que el proximal y éste a su vez mas que el núcleo.

Observando la respuesta del promotor CYCD2;2d a la adición de auxinas, se decidió evaluar la respuesta de este a la presencia de ABA, la cual reprime el avance del ciclo celular. En la figura 16 podemos observar que la respuesta del promotor CaMV35S no se modifica notablemente con la adición de ABA o auxinas. Mientras que la respuesta del promotor CYCD2;2d varía notablemente de acuerdo a la presencia de una u otra hormona vegetal; en estos, en comparación al tratamiento control, disminuye notablemente la

expresión de GFP en presencia de ABA e incrementa en presencia de auxinas.

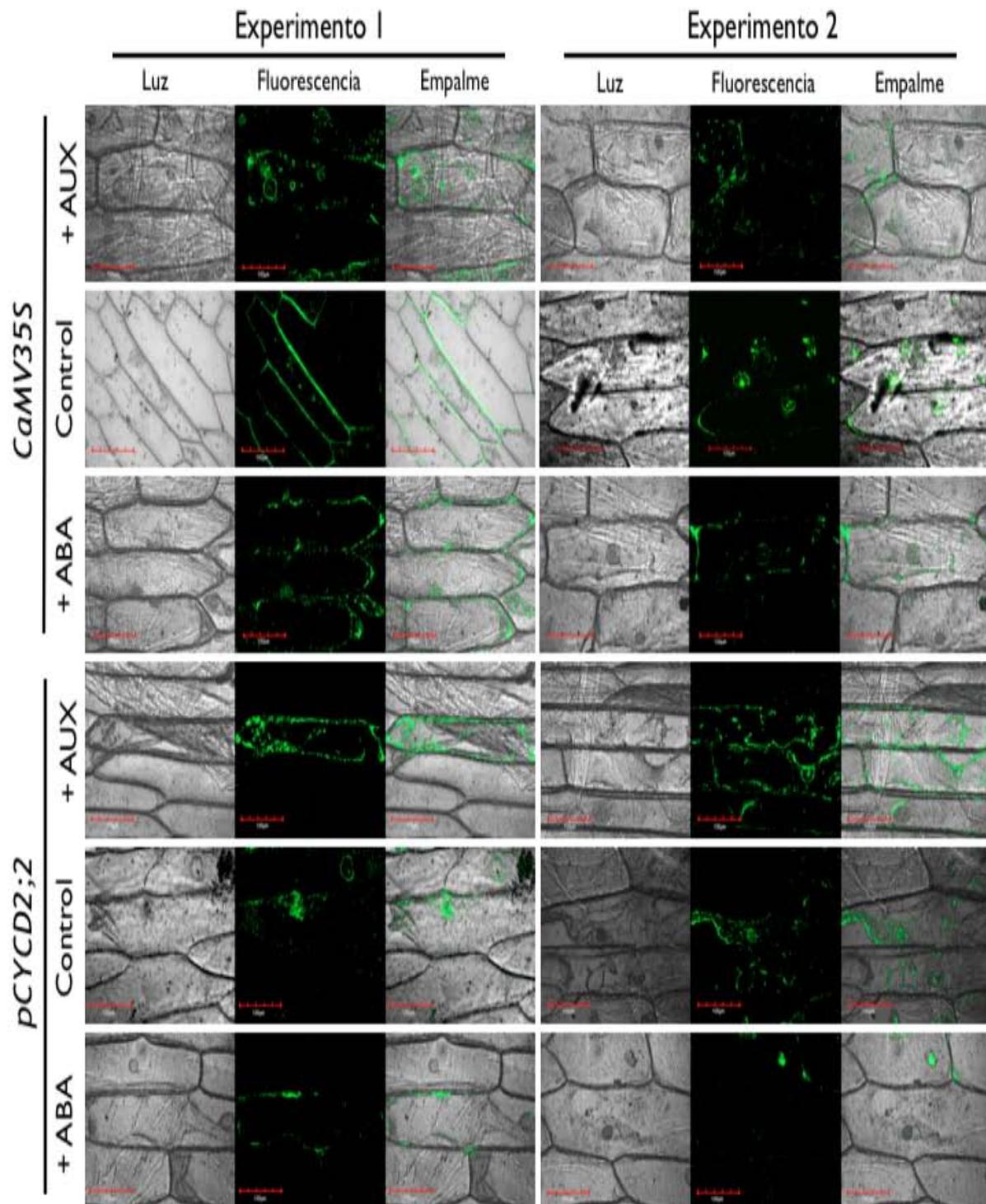


Figura 16. Fluorescencia de la proteína GFP-GUS en células de epidermis de cebolla transformadas con el vector CaMV35S y CYCD2;2d en presencia de ABA o 2,4-D.

5.5 Amplificación de los genes reporteros GFP y GUS en callos de maíz

A partir de la extracción de DNA genómico de callos embriogénicos de maíz transformados con las distintas construcciones de CYCD2;2, se verificó la inserción estable de los genes reporteros por medio de amplificación por PCR de cada una de las muestras. Los resultados en la figura 17 indican que efectivamente, después del periodo de selección, los genes correspondientes a GFP y GUS se encuentran insertados en el genoma, ya que los oligonucleótidos específicos permiten la amplificación de fragmentos de 700 pb para GFP (Figura 17A) y 400 pb para GUS (Figura 17B).

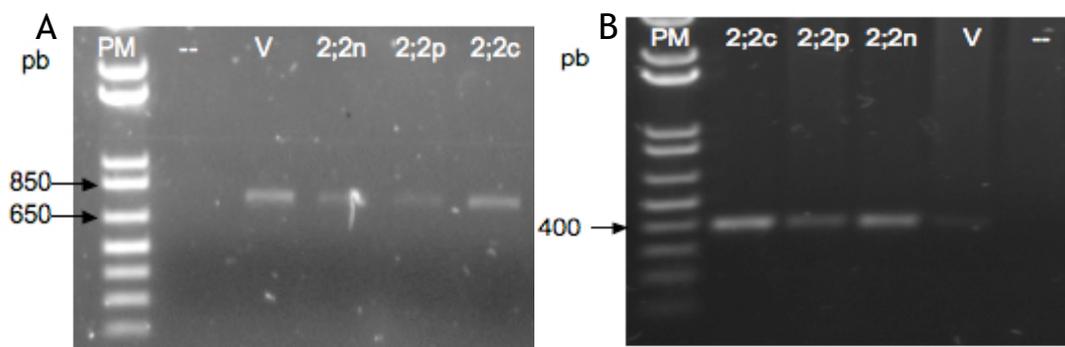


Figura 17. PCR de los genes reporteros GFP-GUS en DNA genómico. A) Se observa la banda de GFP (700 pb) en muestras de callos de maíz transformadas con V: pBGWFS7.0, CYCD2;2n, CYCD2;2p y CYCD2;2d. B) Se observa la banda de GUS (400 pb) en muestras de callos de maíz transformadas con V: pBGWFS7.0, CYCD2;2n, CYCD2;2p y CYCD2;2d

5.6 Inmunodetección de los reporteros GFP y GUS

Sabiendo que los callos transformados emiten fluorescencia, es necesario corroborar que es debida a la expresión de GFP-GUS mediante su inmunodetección a partir de extractos de proteínas solubles de los callos embriogénicos que fueron seleccionados durante 4 meses con glufosinato de amonio. Para esto se realizaron ensayos de Western Blot utilizando un anticuerpo comercial que reconoce a la proteína GUS.

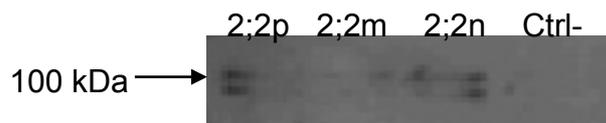


Figura 18. Western Blot de extractos de proteínas solubles de callos embriogénicos de maíz transformados. Se observa una banda en el peso de 98 kDa detectada por el anticuerpo dirigido a β -Glucuronidasa.

En la figura 18 observamos la presencia de la proteína reportera GUS que se encuentra fusionada a GFP con un peso de 98 kDa en los callos transformados con los tres fragmentos del promotor de la ciclina D 2;2, la cual no es detectada en el tratamiento control. Este resultado junto con la fluorescencia detectada debido a la presencia de la proteína GFP demuestran que la transformación de los callos embriogénicos fue exitosa para los tres tratamientos evaluados y que los pequeños fragmentos del promotor de la ciclina D 2;2 permiten la expresión génica que conduce a la síntesis de la proteína reportera.

6. DISCUSIÓN

6.1 Obtención y análisis *in silico* de la secuencia del promotor de la CYCD2;2

Mediante una búsqueda por BLAST, en la base de datos del NCBI se obtuvo la secuencia del gen de la CYCD2;2 de maíz, el cual está ubicado en el cromosoma 5 y mantiene las características de un gen de Ciclinas de plantas, específicamente de uno de la familia D2/4 con 6 exones y 5 intrones. Además, el gen tiene dos posibles UTRs en el extremo 5' de 144 pb y 333 pb y para el análisis *in silico* se tomó una región promotora de 2565 pb (Figura 19).



Figura 19. Estructura génica de la CYCD2;2 de maíz.

Esta estructura génica mostrada por la CYD2;2 corrobora una conservación a nivel estructural muy amplia tanto en dicotiledoneas (*Arabidopsis*) como en monocotiledoneas (arroz y maíz) dentro del grupo de ciclinas D 2/4, lo que tal vez implique una función especializada (Menges *et al.*, 2007).

La secuencia obtenida del promotor de la CYCD2;2 es de un tamaño muy parecido al esperado de 2565 pb (Figura 7) y la secuenciación muestra que a pesar de haber sido obtenida experimentalmente de una variedad distinta (chalqueño) a la reportada en la base de datos del NCBI (B73), la identidad entre éstas es muy elevada (98.4 %, Figura 8). Atribuimos estas pequeñas diferencias a la variación genética presente en ambas variedades de maíz

El análisis *in silico* realizado sobre la secuencia obtenida como promotor de la CYCD2;2 muestra resultados interesantes. Primero, el modelo propuesto en el 2007 por Yoshiharu para un promotor de plantas se cumple en su totalidad dentro de la secuencia obtenida (Figura 9); es decir, contamos con la presencia del sitio de inicio de transcripción, la caja TATA que será el primer motivo reconocido por la maquinaria transcripcional basal,

el parche Y que, debido a su naturaleza química, es una zona de fácil apertura, que permitirá el posicionamiento de la maquinaria transcripcional y finalmente el regulón cuya función será la de atraer a los factores transcripcionales responsables de regular la expresión o represión del gen de acuerdo con las condiciones metabólicas en que las células se encuentren.

La estructura a nivel de elementos de respuesta mostrada por el promotor de la CYCD2;2 (Figura 10 y Tabla 8) apoya la teoría de que efectivamente es un gen de ciclo celular el que se está regulando. Esto debido a que pudimos encontrar a nivel de secuencia elementos que serán reconocidos por FTs que responden en presencia de hormonas vegetales como auxinas (ARE), citocininas o giberelinas, las cuales son las encargadas de conducir a las células a un estado de proliferación y por tanto de división celular durante distintas etapas del desarrollo de la planta; o bien de hormonas como el ABA, encargada de la inhibición del crecimiento y detención del ciclo celular mediante inhibición de genes esenciales para el paso de una célula a lo largo de las fases del ciclo (Inzé y De Veylder, 2006, Benková y Hejác̃ko, 2009, Kieffer *et al.*, 2010). En el presente trabajo, a diferencia del mostrado por Menges *et al.*, en el 2007 (Tabla 4), es el primero en el que se propone que la expresión de los genes de ciclinas D de plantas efectivamente podría ser regulada por hormonas y factores reguladores del crecimiento y proliferación debido a la presencia de elementos de respuesta en la región promotora (Figura 10 y Tabla 8).

Esta evidencia, apoya y concuerda con la teoría que pone a las ciclinas D como los sensores primarios de las condiciones externas, al percibir señales externas y del desarrollo y acoplarlas a las señales de proliferación (Dewitte y Murray, 2003, de Jager *et al.*, 2005, Inzé y De Veylder, 2006). Además, coloca a las ciclinas D como familia de genes importantes para el establecimiento de ciclo celular y para un exitoso cruce a través del primer gran punto de control del ciclo, la transición G1/S.

La distribución mostrada de los elementos de respuesta a hormonas vegetales dentro del promotor de CYCD2;2 (Figura 10) indica que es dentro de los primeros 1000 pb del promotor donde se encuentra la mayor densidad de estos elementos, lo que sugiere que es esta la zona que mas atención requiere para su estudio en cuanto a la regulación de la expresión del gen y

que podría ser la que este mas fuertemente regulada por la señalización hormonal, hecho que implicaría que la zona promotora próxima a la región codificante es la responsable de regular los niveles de mensajero presentes en células en proliferación, como en las zonas meristemáticas, que son las que necesitan atravesar las distintas fases del ciclo para lograr un crecimiento del tejido y de la planta en general (Benková y Hejátko, 2009, Kieffer *et al.*, 2010).

Es por esto que centramos nuestro interés en la zona de los primeros 900 pb del promotor. Para facilitar su estudio se diseñaron 5 fragmentos de esta zona, los cuales fueron llamados distal, proximal, medio, núcleo y UTR (Tabla 8). Ya que la construcción con el pCYCD2;2_{UTR} no contiene elementos básicos reconocidos por la maquinaria transcripcional (Tabla 8) y únicamente es parte de la región UTR5', esperabamos que esta zona no mostrara actividad de promotor, lo cual así ocurrió. La construcción con el pCYCD2;2_{núcleo} únicamente contiene a los elementos basales como son TSS, caja TATA y algunos elementos de respuesta a citocininas (Tabla 8) que esperábamos fueran necesarios para la expresión de los genes reporteros. Las construcciones pCYCD2;2_{medio} y pCYCD2;2_{proximal} están teóricamente reguladas por elementos de respuesta hormonal y por fuente carbonada mientras que el pCYCD2;2_{distal} contiene además elementos de regulación por condiciones ambientales y factores transcripcionales como MYC y MYB, que en ocasiones estimulan la síntesis de proteínas encargadas de regular el ciclo celular. En la figura 11 se muestra que los fragmentos fueron obtenidos y clonados en el vector de expresión (Figura 13), lo que nos permite pasar a la transformación.

6.2 Transformación de callos embriogénicos de maíz y células de epidermis de cebolla

Una vez que se obtuvieron los plásmidos con las construcciones antes mencionadas para la transformación, se verificó su integridad y se procedió al uso de la pistola de baja presión proporcionada por el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Química.

Podemos observar (Figura 14) que las líneas de callos transformadas efectivamente son capaces de expresar a la GFP sin importar el tamaño del

Por otro lado, podemos notar que para observar a la proteína reportera GFP, los primeros 189 pb son suficientes (Figura 14), mostrando que los elementos de respuesta a citocininas aunados a la caja TATA y el Sitio de inicio de transcripción mostrados en la figura 20 y tabla 8 son probablemente los encargados de regular positivamente la expresión del gen bajo las condiciones experimentales, mostrando que únicamente 45 pb de promotor son suficientes, ya que sabemos que los primeros 144 pb son los encargados de conformar a la región UTR5' (Bravo y Buendía, 2008). Con esto confirmamos que los elementos de reconocimiento basales de la maquinaria transcripcional (caja TATA y TSS) son suficientes para expresar al gen y que los elementos cis de respuesta adicionales ayudan a mantener un estado de expresión o respuesta a factores metabólicos o ambientales.

Tratando de evaluar la participación de esta zona de 45 pb del promotor núcleo, se diseñó la construcción CYCD2;2UTR que estrictamente contiene 135 pb pero que corresponden a la región no traducida 5' (Tabla 8), es decir, no hay región promotora debido a que se eliminaron los elementos basales reconocidos por la maquinaria transcripcional, y con esta construcción adicional se bombardearon células de epidermis de cebolla (Figura 15).

De acuerdo a lo observado, corroboramos ahora en un sistema distinto a maíz que los fragmentos del promotor evaluados son funcionales, pero que sin embargo tienen una fuerza menor que el promotor CaMV35S, siendo éste un promotor constitutivo que produce una expresión elevada de los genes que regula. Por otro lado, podemos observar que nuevamente el promotor CYCD2;2n induce la expresión de GFP y que si a este fragmento le quitamos los elementos reconocidos por la maquinaria transcripcional basal la expresión se apaga (Figura 15, CYCD2;2135), lo que implica que los primeros 45 pb del promotor de la CYCD2;2 son necesarios y suficientes para inducir la expresión génica, ya que la presencia de la región no traducible en la construcción CYCD2;2135 no puede producir la expresión de GFP. Podemos deducir también que los elementos de respuesta actúan de manera cooperativa, es decir a mayor número de elementos presentes en el promotor, la inducción de la expresión del gen reportero es mayor. Además, muy importante es el hecho de que al adicionar 2,4-D (auxina), la respuesta

del promotor de la CYCD2;2 se incrementa en comparación a cuando esta ausente (Figura 15, comparación entre tratamientos con la misma construcción). Podemos sugerir que los elementos de respuesta a auxinas presentes en los distintos fragmentos efectivamente responden a esta familias de hormonas y logran inducir una expresión del gen reportero e implícitamente sobre el gen de CYCD2;2. Nuevamente, el efecto de cooperatividad de los elementos cis de respuesta esta presente.

Con la finalidad de demostrar que los niveles de GFP y sus variaciones observadas son debidas a que el promotor de la CYCD2;2 responde a hormonas vegetales como las auxinas y ABA, se hizo una comparación entre la respuesta del promotor CaMV35S y el promotor CYCD2;2_{distal} bajo distintas condiciones como son la adición de 2,4-D (auxina) o ABA al medio de cultivo en el que se transforman las células de cebolla. Los resultados de la figura 16 indican que el promotor CaMV35S no es afectado por la presencia de una u otra hormona vegetal, ya que los niveles de GFP parecen no variar entre los tres tratamientos distintos (control, ABA y AUX) y los dos experimentos independientes mostrados. Sin embargo, cuando GFP esta regulada por el promotor CYCD2;2_{distal}, podemos observar que los niveles de GFP observados varían de acuerdo a la hormona que se adicione; es decir, en los tratamientos con ABA la fluorescencia observada es menor a la del control y a la del tratamiento con 2,4-D (Figura 16), y la fluorescencia presente en el tratamiento de 2,4-D es mayor a la de los otros dos tratamientos. De esta manera se demuestra que el promotor CYCD2;2_{distal} responde positivamente al 2,4-D y negativamente al ABA. Se sugiere que dicha variación de la cantidad de GFP, es debida a los elementos de respuesta del promotor CYCD2;2_{distal}. El análisis de expresión de genes de ciclinas D mostrado por Buendía-Monreal *et al.* en el 2011, muestra que efectivamente el gen de la CYCD2;2 se comporta de igual manera a la reportada en este trabajo en presencia de AIA y ABA pero durante distintos tiempos de germinación de ejes embrionarios de maíz. Dicha acumulación de evidencia sugiere de manera *in vivo* el gen de la CYCD2;2 puede estar regulado por estas dos familias hormonales. Permitiendo la expresión elevada de este gen en zonas donde la proliferación celular es elevada y

reprimiéndola en zonas celulares diferenciadas, como lo podemos observar en la figura 21.

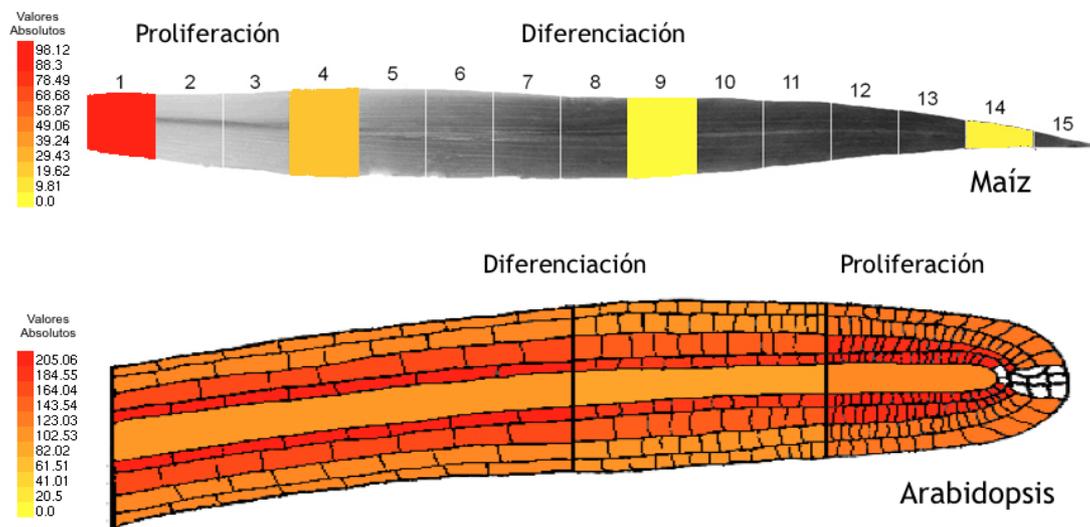


Figura 21. Expresión de la CYCD2;2 de maíz y CYC2;1 de Arabidopsis en distintos tipos celulares. Obtenida de las bases de datos: Maize eFP Browser y Arabidopsis eFP Browser.

La expresión de la CYCD2;2 de maíz es elevada en células que se encuentran en división constante y esta disminuye conforme las células se alejan de la zona de proliferación y se acercan a la zona de diferenciación y crecimiento celular (Figura 21)(Li *et al.*, 2010). La expresión de la CYCD2;1, el gen mas parecido de Arabidopsis a la CYCD2;2, muestra el mismo patrón de expresión elevada en la zona meristemática (proliferación elevada), lugar donde se sintetizan las auxinas y a partir del cual se distribuyen al resto de la planta; y una expresión disminuida en la zona de diferenciación donde la concentración de auxinas es menor (Winter *et al.*, 2007).

Los resultados mostrados por la base de datos AtGenExpress Visualization Tool (AVT) indican que la expresión del gen de la CYCD2;1 de Arabidopsis reduce sus niveles cuando se adiciona ABA al ensayo, e incrementa con AIA. Este mismo resultado es obtenido en este trabajo (Figura 16) cuando se evalúa la respuesta del promotor de la CYCD2;2 de maíz a las hormonas vegetales ABA y 2,4-D y por Buendia-Monreal *et al.* en el 2011. Esta variación, podría estar regulada por el reconocimiento de factores transcripcionales específicos sobre los elementos de respuesta encontrados de manera *in silico* en el promotor de la CYCD2;2 (Figura 10).

Este patrón de respuesta ha sido observado en genes que llevan a las células a través de la transición G1/S, como son CDKA, CYCD2;1, CYCD3;1 de *Arabidopsis* (Inzé, 2007), y en la mayoría de los casos se ha propuesto que es debido a la estructura de sus promotores. Sin embargo, no se ha demostrado que elementos comparten todos estos genes en sus regiones promotoras, ni cuales de estos son funcionales.

Los resultados mostrados aquí, en conjunto con reportes previos de este mismo grupo conducen a proponer fuertemente que este gen efectivamente responde a la adición de auxinas y ABA, postulando al gen de la CYCD2;2 de maíz como un gen de respuesta temprana a entrada a ciclo celular y muy posiblemente responsable de llevar a las células hacia la fase S en acción conjunta con una CDKA (Gutiérrez *et al.*, 2005, Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006 y Buendía Monreal *et al.*, 2011).

La inserción estable de los genes reporteros a los callos transformados (Figura 17), la fluorescencia emitida por las células transformadas (Figuras 14, 15 y 16) y la detección por Western Blot (Figura 18) de la proteína GFP-GUS, nos indican una expresión estable de esta proteína, la cual estaría siendo regulada por cada uno de los fragmentos del promotor de la ciclina D 2;2, indicando la presencia de estas construcciones en el genoma de los callos de maíz. Lo anterior nos lleva a proponer que el método de transformación de maíz fue establecido con éxito en callos embriogénicos, dejando la ventana abierta a la regeneración de plantas a partir de estos cultivos transgénicos para poder determinar la expresión de este gen en espacio y tiempo desde la germinación de semillas hasta el establecimiento de la planta madura.

7. CONCLUSIONES

El promotor de la CYCD2;2 es un promotor canónico de plantas con un parche de Pirimidinas, una caja TATA y un sitio de inicio de transcripción que sigue la regla YR. Además es un promotor de un gen de respuesta primaria a la entrada de ciclo celular que contiene elementos de respuesta a hormonas vegetales como auxinas y citocininas, encargadas de la señalización de inicio de proliferación, crecimiento y desarrollo de la planta.

El gen de la ciclina CYCD2;2 de maíz aparentemente tiene dos sitios de inicio de la transcripción ubicados en -333 pb y -144 pb a partir del sitio de inicio de traducción.

Se obtuvieron las fusiones traduccionales a los genes reporteros GFP-GUS de los 5 fragmentos propuestos para el promotor de la CYCD2;2 de maíz y se observó una expresión estable de la proteína GFP-GUS en líneas de callos embriogénicos de maíz, y expresión transitoria en células de epidermis de cebolla.

Los primeros 45 pb del promotor de CYCD2;2 son necesarios para expresar al gen reportero GFP-GUS (bajo las condiciones evaluadas). La región que comprende de -135 a -189 contiene elementos fundamentales para la expresión génica y actúa como el núcleo del promotor de la CYCD2;2.

El gen de la CYCD2;2 es inducido por auxinas y regulado negativamente por ABA. Su respuesta es debida muy probablemente a los AREs y ABREs presentes en su región promotora, los cuales actúan de manera cooperativa en la regulación de la expresión genética.

8. PERSPECTIVAS

Clonar en *E. coli* utilizando el vector de expresión pBGWFS7 la secuencia de 2500pb del promotor de la CYCD2;2 para posteriormente purificarlo y evaluar la respuesta del promotor CYCD2;2_{largo} tanto en células de cebolla, como en callos embriogénicos de maíz.

Regenerar plantas transgénicas de maíz a partir de las líneas de callos transformados con la finalidad de observar la expresión tejido específica de la CYCD2;2 de maíz desde la germinación de una semilla, hasta el establecimiento de la planta mediante el seguimiento de los genes reporteros GFP y GUS.

Mutar de manera específica ciertos grupos de elementos de respuesta para probar su funcionalidad en la regulación de la expresión de esta familia de genes, y poder así demostrar su participación e importancia en el avance del ciclo celular y el establecimiento de una planta.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **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
- **Benková E, Hejácíko J** (2009) Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol Biol* **69**: 383-396
- **Bewley JD, Black M** (1994) In seeds, physiology of development and germination. Ed. Plenum Press, NY.
- **Blanc G, Wolfe KH** (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16**: 1667
- **Bravo Alberto CE, Buendía Monreal M** (2008) Estudio de la región promotora de cuatro ciclinas D de maíz, Facultad de Química, UNAM México, pp 50.
- **Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K** (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 14825-14830
- **Cockcroft CE, den Boer BG, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* **405**: 575–579
- **Buendia-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla L, García E, Vázquez-Ramos J** (2011) The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum*
- **Cullis-Wiley CA** (2004) *Plant Genomics and Proteomics*. John Wiley and Sons, Inc. Biblioteca web del IBT-UNAM, pp 89-102
- **De Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA** (2005) The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol* **16**: 385-396
- **De Veylder L, Beeckman T, Beemster GTS, et al.** (2001) functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1653-1668
- **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
- **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
- **Doonan JH, Kitsios G** (2009) Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Mol Biotechnol* **42**: 14-29
- **Dyson N** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**: 2245-2262
- **Esponosa-Ruiz A, Saxena S, Schmidt J** (2004) Differential stage-specific regulation of cyclin-dependent kinases during cambial dormancy in hybrid aspen. *Plant J* **38**: 603-615
- **Fabian-Marwedel T, Umeda M, Sauter M** (2002) The rice cyclin-dependent-kinase—activating kinase R2 regulates S-phase progression. *Plant Cell* **14**:197–210
- **Farnham, DE, Benson GO, Pearce RB** (2003). Corn perspective and culture. Chapter 1. In: White PJ, Johnson LA eds. *Corn: chemistry and technology*, Edition 2nd. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp 1- 33.
- **Freeman D, Riou-Khamlichi C, Oakenfull EA, Murray JAH** (2003) Isolation, characterization and expression of cyclin-dependent kinases genes in Jerusalem artichoke. *J Exp Bot* **54**: 303-308
- **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
- **George EF, Hall MA, De Klerk GJ** (2008) *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Edition. Springer
- **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

- **Grafi G, Larkins BA** (1995) Endoreduplication in maize endosperm: involvement of M-phase promoting factor inhibition and induction of S-phase-related kinases. *Science* **269**: 1262-1264
- **Guerrero-Andrade O** (1998) “Transformación de células de maíz (*Zea mays* raza tuxpeño) por medio del bombardeo de partículas”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM
- **Gupta SD, Ibaraki Y** (2006) *Plant Tissue Culture Engineering. Focus on Biotechnology* **6**
- **Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F y 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
- **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
- **Inzé D** (2007) Cell cycle control and plant development. *Annual Plant Reviews* **32**
- **Ito M** (2005) Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J Plant Res* **118**: 61-69
- **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
- **Jones NB, van Staden J, Bayley AD** (1993) Somatic embryogenesis in *Pinus patula*. *J. Plant Physiol.* **142**: 366–372
- **Kieffer M, Neve J, Kepinski S** (2010) Defining auxin response contexts in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 12-20
- **Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, Fitzpatrick-McElligott S** (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* **10**: 286-291
- **Klug SW, Cummings MR** (1999) *Conceptos de genética*. Ed. Prentice Hall, Madrid, pp 43

- **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
- **Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, Dewitte F, Vandepoele K, et al.** (2004) A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 13380–13385. Erratum. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 16391
- **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
- **Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ** (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng* **4**: 67–79
- **Li P, Ponnala L, Gandotra N, et al.,** (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature Genetics*, **42**: 1060-1067
- **Lui H, Wang H, DeLong C, Fowke LC, Crosby WL, Fobert PR** (2000) The *Arabidopsis* Cdc2q-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of Cyclin-dependent kinase activity *in-vitro*. *Plant J.* **21**: 379-385
- **Magyar Z, Bakó L, Bögre L, Dedeoglu D, Kapros T, Dudits D** (1993) Active Cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J* **4**: 151-161
- **Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, et al.** (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**:223–35
- **Mayer AM, Poljakoff A** (1975) *The germination of seeds*. Ed. Pergamon Press, pp 21-26
- **Meijer M, Murray JAH** (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 44–49
- **Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JAH** (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 cycle control. *Plant J* **41**: 546-566

- **Menges M, Samland AK, Planchais S, Murra JA** (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, Murray JAH** (2007) Plant D-type cyclins: structure, roles and functions. *SEB Exp Biol Ser* **59**:1-28.
- **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
- **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
- **Morgan DO**, (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-191
- **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
- **Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC** (2006) Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res* **34**: D731–D735
- **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
- **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 et al.**, (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* **457**: 551-556
- **Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR** (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal – 28 -de
- **Pines J** (1995) Cyclins and cyclin dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308**: 697–711

- **Porceddu A, Stals H, Reichheld JP, Segers G, De Veylder L, et al.** (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* 276:36354–60
- **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
- **Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE** (1992) *Biology of Plants*. Worth Publishers, Inc. NY, pp 545-562
- **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
- **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
- **Ruggiero B, Koiwa H, Manabe Y, et al.** (2004) Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**: 3134-3147
- **Salisbury FB, Ross CW** (1992) *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont
- **San Miguel P, Gaut BS, Tikhonov Y, Nakajima Y, Bennetzen JL** (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat. Genet.* **20**: 43-45.
- **Schnable PS, et al.**, (2009) The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics *Science* **326**: 1112
- **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**: 667–78

- **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
- **Shen WH** (2002). The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* **7**: 505–511
- **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** (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**:1149-1163
- **Sherr CJ, Roberts JM** (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**: 2699–2711
- **Shimotohno A, Umeda-Hara C, Bisova K, Uchimiya H, Umeda M** (2004) The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2954–66
- **Slater A, Nigel W, Scott and Mark R** (2008) Plant biotechnology, the genetic manipulation of plants, 2^a edición, Cap. 2 pp 35-53
- **Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D** (2002) A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 518–22
- **Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, et al.**, (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4180–85
- **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
- **Taiz L, Zeiger E** (1991) *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. U.S.A.
- **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

- **Umeda M, Bhalerao RP, Schell J, Uchimiya H, Koncz C** (1998) A distinct cyclin- dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 5021–26
- **Umeda M, Umeda-Hara C, Yamaguchi M, Hashimoto J, Uchimiya H** (1999) Differential Expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. Plant Physiol **119**: 31-40
- **Umeda M, Umeda-Hara C, Uchimiya H** (2000) A cyclin-dependent kinase- activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 13396–400
- **Umeda M, Shimotohno A, Yamaguchi M** (2005) Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. Plant Cell Physiol. **46**, 1437–1442.
- **van den Heuvel S, Dyson NJ** (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. Nat Rev Mol Cell Biol **9**: 713-24.
- **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
- **Wang GF, Fowke LC, Crosby WL** (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. Nature **386**: 451-452
- **Wang GF, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CYCD3 and its expression is induced by abscisic acid. Plant J **15**: 501-510
- **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 F, Huo SN, Guo J, Zhang XS** (2006) Wheat D-type cyclin Triae;CYCD2;1 regulate development of transgenic *Arabidopsis* plants. Planta **224**:1129-1140.
- **White PJ** (1994). Properties of corn starch. Chapter 2. In: Hallauer AR, ed. Specialty corns. CRC Press Inc Boca Raton, USA. pp 29-54

- **Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: e718
- **Yamaguchi M, Kato H, Yoshida S, Yamamura S, Uchimiya H, Umeda M** (2003) Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:8019–23
- **Yamamoto YY, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T et al.** (2007) Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics* **8**: 67
- **Zamski E, Schaffer AA** (1996) Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships. CRC Press pp 341-368
- **Zhang K, Letham DS, John PCL** (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**: 2–12
- **Zhiponova MK, Pettkó-Szandtner A, Stelkovics É, et al.** (2006) Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (Medsa;CDKB2;1) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner. *Plant Physiol* **140**: 693-703
- **Zhu W, Giangrande PH, Nevins JR** (2004) E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J* **23**: 4615-4626