



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Establecimiento de un sistema *in vitro* para evaluar la regulación traduccional por microRNA (miRNA) en callos embriogénicos de maíz.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Camacho Hernández Allan Gabriel

TUTOR PRINCIPAL

Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Facultad de Química, UNAM

ASESOR TÉCNICO

Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores, Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Greco Hernández Ramírez, Instituto de Cancerología
Juan Miranda Ríos, Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad de México. Mayo, 2019.



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.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los siguientes Proyectos por el apoyo financiero a este trabajo:

-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN214118

-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Proyecto de Ciencia Básica CB-2014/238439

-Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9118

Así mismo, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado como becario durante la realización de este proyecto.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MAÍZ.	5
<i>El maíz y México.</i>	5
<i>Reproducción sexual del maíz.</i>	7
EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA.	9
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	11
RNAs PEQUEÑOS (sRNAs).	16
MICRORNAs (miRNAs)	17
<i>Biogénesis de miRNAs en plantas</i>	17
<i>Funciones de los miRNAs en plantas.</i>	20
<i>Mecanismo de acción de los miRNAs</i>	21
ESTUDIO DE LA TRADUCCIÓN Y DE LA REGULACIÓN MEDIADA POR miRNAs MEDIANTE EL USO DE LISADOS CELULARES.	28
ANTECEDENTES	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
OBTENCIÓN DE TEJIDOS	33
<i>Siembra de maíz.</i>	33
<i>Obtención de embrión inmaduro e inducción de callo embriogénico</i>	34
OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE CALLO EMBRIOGÉNICO DE MAÍZ.	35
<i>Establecimiento del cultivo madre</i>	35
<i>Digestión de la pared celular</i>	36
OBTENCIÓN DE LISADO CELULAR DE CALLO EMBRIOGÉNICO DE MAÍZ.	37
CARACTERIZACIÓN Y OBTENCIÓN DEL MENSAJERO FLUC PARA ENSAYOS DE TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> .	38
ENSAYOS DE TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> .	41
RESULTADOS	43
OBTENCIÓN DEL TEJIDO DE MAÍZ, CALLOS EMBRIOGÉNICOS Y SUSPENSIONES CELULARES.	43
ENSAYOS DE TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> CON LISADOS DE CALLO EMBRIOGÉNICO DE MAÍZ	50
<i>Estandarización de las condiciones óptimas del sistema de traducción in vitro.</i>	52
<i>Protocolo estandarizado para la obtención de lisados celulares de callo embriogénico de maíz.</i>	55
HERRAMIENTAS PARA EVALUAR LA REGULACIÓN TRADUCCIONAL POR miRNAs	57
<i>Clonación de ZmAGO1c.</i>	57
<i>Amplificación de regiones a clonar de mensajeros blanco de miR528.</i>	58
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS	68
ANEXOS.	82

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) es un proceso único en plantas. En él, células somáticas diferenciadas se dediferencian para formar nuevos embriones, de los cuáles es posible regenerar plantas. Debido a ello, la embriogénesis somática es muy útil para la micropropagación y transformación de plantas. La ES en maíz se realiza mediante una inducción a partir de embriones cigóticos inmaduros con concentraciones altas de auxinas, obteniendo masas de callos embriogénicos que conservan durante largos periodos el potencial para regenerar una planta.

En trabajos previos en el laboratorio, se observó que existe una abundancia diferencial de microRNAs (miRNAs) específicos en callos embriogénicos de maíz dependiendo de la etapa de subcultivo. Se ha reportado que la regulación mediada por miRNAs puede señalar la degradación de sus mRNAs blancos o reprimir su traducción, siendo esta última la menos estudiada en plantas.

El presente trabajo se centró en la obtención de un sistema de traducción *in vitro* a partir de callos embriogénicos de maíz. Con ello se busca determinar el nivel de regulación que ejercen algunos miRNAs específicos relevantes en la ES sobre sus mRNAs blanco predichos. Este sistema se logró llevando a cabo varios pasos fundamentales como la disgregación del callo para generar una suspensión celular, una posterior digestión de la pared de las células en suspensión, y la evacuolización de los protoplastos obtenidos y una lisis eficaz. Finalmente, se estandarizaron cada una de las condiciones ideales (concentración de magnesio, potasio, temperatura) para llevar a cabo una traducción óptima con el sistema generado.

En el futuro, este sistema de traducción *in vitro* ayudará a tener un mejor panorama del funcionamiento de la vía de regulación mediada por miRNAs y su posible implicación durante la inducción de callos embriogénicos de maíz.

INTRODUCCIÓN

Maíz.

El maíz y México.

El maíz ha sido el sustento principal de varias civilizaciones de Mesoamérica. Debido a sus cualidades alimenticias para la producción de proteína animal, el consumo humano y el uso industrial, hoy en día es uno de los productos más importantes en los mercados internacionales. Su relevancia económica y social ha superado a la de otros cultivos, como son el arroz y el trigo. Adicionalmente, el cultivo y transformación del maíz es fuente de empleo y alimento para un número importante de personas en el mundo (Ortega *et al.*, 2013).

Todos los tipos cultivados de maíz se clasifican como *Zea mays ssp. mays*. La evidencia botánica, genética y citológica indica que existe un origen común para todos estos tipos de maíz. La mayoría de los investigadores coincide en que este cultivo se desarrolló a partir de una planta anual llamada teocintle (*Zea perennis*), gramínea muy similar al maíz, que crece de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica. Se considera que las poblaciones de teocintle del centro del México (Kato, 1996) o los que crecen en el trópico seco de la Cuenca del Balsas (Matsuoka *et al.*, 2002), pudieron ser los ancestros de los cuales se domesticó el maíz como planta cultivada; sin embargo, existen otros que se inclinan por que el maíz se originó de un maíz silvestre que ahora está extinto (Cai, 2006).

El maíz como cultivo es un sistema dinámico y continuo. Su polinización es libre y, además, de acuerdo con datos de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), existe un flujo de semilla dado por los agricultores año con año al mantener, intercambiar y experimentar con semilla propia o de vecinos de la misma localidad y/o de regiones distantes. Esto dificulta la distinción de unidades discretas para clasificar su diversidad. Una aproximación a su estudio y entendimiento ha sido seleccionar en este continuo las principales unidades (tipos o formas) que le caracterizan y a las que se han denominado razas (CONABIO, 2011).

El término raza se utiliza en el maíz y en plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo (Anderson y Cutler, 1942; Hernández y Alanís, 1970; Harlan y de Wet, 1971). Las razas se agrupan a su vez en grupos o complejos raciales, los cuales se asocian a una distribución geográfica y climática más o menos definida y a una historia evolutiva común (Goodman y McK. Bird, 1977; McK. Bird y Goodman, 1977; Sánchez, 1989; Sánchez *et al.*, 2000; Ruíz *et al.*, 2008).

El concepto y la categoría de raza es de gran utilidad como sistema de referencia rápido para comprender la variación del maíz, para organizar el material en las colecciones de bancos de germoplasma y para su uso en el mejoramiento (McClintock, 1981; Wellhausen, 1988), así como para describir la diversidad a nivel de paisaje (Perales y Golicher, 2011). Sin embargo, cada raza puede comprender numerosas variedades diferenciadas en formas de mazorca, color y textura de grano, adaptaciones y diversidad genética. El concepto de “variedad criolla” se emplea para denotar a poblaciones nativas locales con pedigrí desconocido. La mayor parte del maíz cultivado hoy en día es resultado de hibridación entre muchas razas. El mejoramiento de las variedades criollas se ha basado en la selección de individuos específicos y su cruce para formar una siguiente generación (Vielle-Calzada y Padilla, 2009).

Las razas se nombran a partir de distintas características fenotípicas (Cónico, por la forma de la mazorca), tipo de grano (Reventador, por la capacidad del grano para explotar y producir palomitas), por el lugar o región donde inicialmente fueron colectadas o son relevantes (Tuxpeño de Tuxpan, Veracruz; Chalqueño, típico del Valle de Chalco) o por el nombre con que son conocidas por los grupos indígenas o mestizos que las cultivan (Zapalote Chico en el Istmo de Oaxaca o Apachito en la Sierra Tarahumara) (Wellhausen *et al.* 1951; McClintock, 1981).

En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y Bird, 1977), de las cuales 64 se han identificado y descrito en su mayoría para México (Anderson, 1946; Wellhausen *et al.*, 1951; Hernández y Alanís, 1970; Ortega, 1985; Sánchez, 1989; Sánchez *et al.*, 2000).

De acuerdo con la CONABIO, de las 64 razas reportadas de maíz en México, que incluyen nombres como pepitilla, tabloncillo, ancho, pozolero, vandeño, olotillo, conejo, nal-tel, tuxpeño, salpor, cónico, palomero, toluqueño, entre muchas otras, 59 se pueden considerar nativas y las otras 5, que fueron descritas inicialmente en otras regiones (Cubano Amarillo, del Caribe y cuatro razas de Guatemala: Nal Tel de Altura, Serrano, Negro de Chimaltenango y Quicheño), también se colectan o se han reportado en el país. Además, adicionalmente a estas razas de maíz, en México existen cerca de 1400 variedades registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CONABIO, 2011).

Polanco y Flores (2008) mencionan que en México ninguna otra planta cultivada tiene tanta importancia como el maíz. Se siembra en todos los estados, climas y altitudes, pero tiene además importantes valores culturales, simbólicos y espirituales. Por su extraordinaria plasticidad genética, las etnias prehistóricas pudieron adaptarlo a una gran diversidad de condiciones de clima, altitud y latitud, y a partir del siglo XX esta plasticidad genética ha sido estudiada ampliamente (Ortega *et al.*, 2013). El genoma de la variedad B73 de maíz se dio a conocer en el año 2009 por Schnable y colaboradores, posteriormente también el del maíz palomero (Vielle-Calzada *et al.*, 2009), y aunque no ha sido explorada a profundidad la vasta diversidad que el maíz posee, es utilizado extensivamente como modelo en estudios básicos de Biología y Genética.

Reproducción sexual del maíz.

El maíz es una planta monoica, es decir, tiene inflorescencias masculinas y femeninas separadas que se forman en la misma planta (Figura 1). En la parte superior de la planta se desarrolla la inflorescencia masculina o panoja, con una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales que producen abundantes granos de polen, encargados de fecundar el órgano femenino o mazorca, que se forma más abajo a partir de dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta. Cada óvulo fecundado formará un grano que estará agrupado en torno a un eje grueso (olote). El número de granos y de filas de la mazorca dependerá de la variedad y del vigor del maíz (Ortas, 2008)

El polen (gametofito masculino o microgametofito) es una estructura trinuclear; tiene una célula vegetativa y dos gametos masculinos (núcleos espermáticos). La polinización de maíz consiste en la llegada de un grano de polen a los estigmas, que son conductos largos y estrechos, cada uno de los cuales termina en la base de un óvulo. Los estigmas se encuentran cubiertos por pelos o tricomas (estructuras encargadas de retener al polen). El grano de polen germina inmediatamente después de alojarse en los estigmas, generando así el tubo polínico para posteriormente fertilizar al óvulo, que se encuentra dentro del saco embrionario (Paliwal *et al.*, 2001; Pessino y Ortiz, 2010).

La polinización es la primera de las etapas para la formación de la semilla. La siguiente etapa es el desarrollo del tubo polínico que se extiende hasta el saco embrionario. La tercera etapa es la doble fertilización, que es un proceso de fecundación característico de las angiospermas (Figura 1). En la fecundación, participan los dos núcleos espermáticos, uno de ellos se combina con el núcleo del gameto femenino para dar un cigoto diploide y el segundo núcleo se fusiona con los núcleos polares del megagametofito para formar un núcleo triploide ($3n$), que se dividirá para formar un tejido triploide llamado endospermo, que se llenará de reservas para el embrión durante su desarrollo hasta semilla madura (Paliwal *et al.*, 2001; Becraft, 2007).

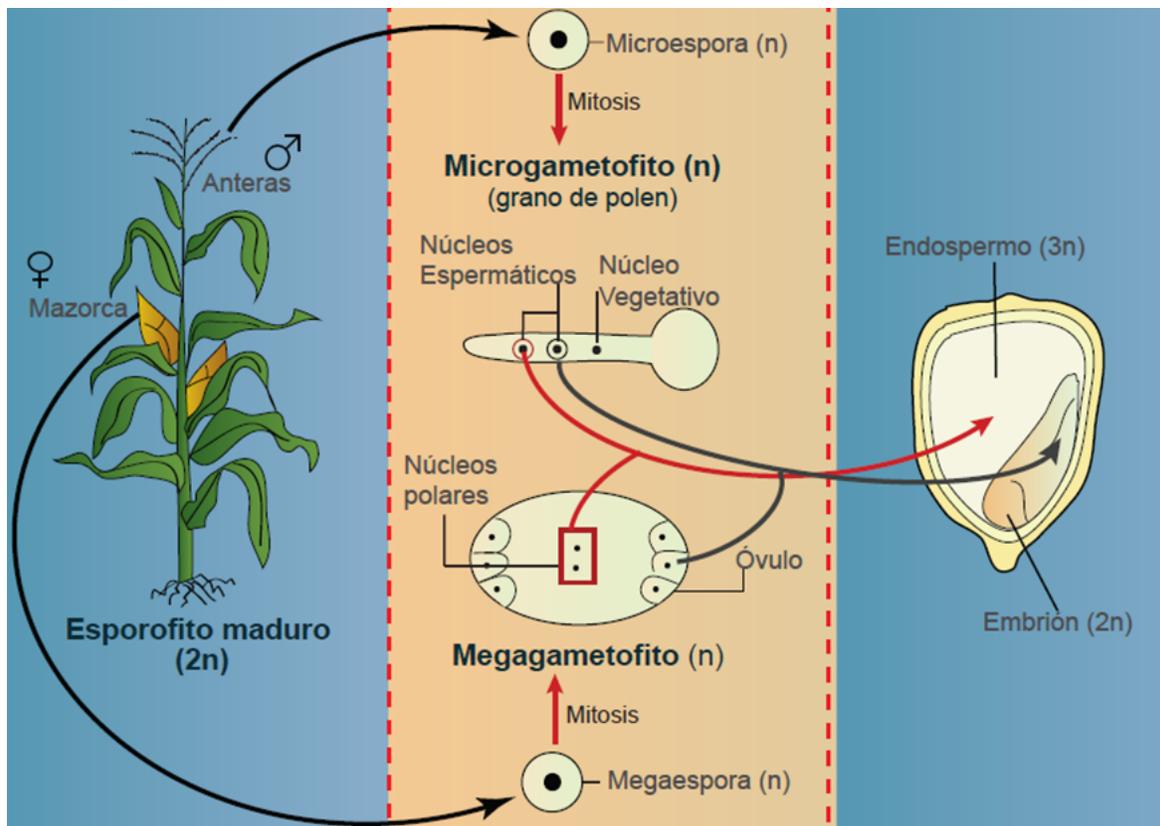


Figura 1. Modelo de reproducción sexual de maíz. Se muestran las inflorescencias femeninas (jilote) y masculina (espiga) (izquierda); el proceso de doble fertilización a nivel de gametos (centro) y la semilla de maíz (derecha) (Modificado de Walbot y Evans, 2003).

Embriogénesis Cigótica.

La embriogénesis se puede definir como la suma de todos los procesos de crecimiento y diferenciación que se dan durante el desarrollo del cigoto (que es unicelular), hasta la formación de un embrión maduro (estructura multicelular) (Vernoud *et al.*, 2005; Yang y Zhang, 2010). La formación del cigoto que se da a partir de la fertilización del óvulo por una célula espermática, marca la transición de la generación gametofítica (haploide) a la generación esporofítica (diploide). Al igual que en otras plantas, la embriogénesis del maíz puede ser dividida en tres grandes fases. La primera está dedicada a eventos de desarrollo, como patrones de formación responsables de la polaridad y la posición de los órganos, morfogénesis y diferenciación. La segunda etapa (maduración) está marcada por el crecimiento del embrión y por la acumulación de sustancias de reserva, aunque también existen

algunos eventos adicionales de desarrollo. Durante la tercera etapa, el embrión se deshidrata y entra en dormancia para así prepararse para la separación de la planta madre durante la dispersión de las semillas. Finalmente, durante la germinación, el embrión consumirá sus propias sustancias de reserva, así como las almacenadas en el endospermo (Vernoud *et al.*, 2005).

Se han caracterizado diversas fases del desarrollo durante la embriogénesis cigótica de maíz. A grandes rasgos, la primera fase es llamada etapa proembrionaria, donde las primeras divisiones celulares del cigoto (que es diploide) son asimétricas y dan origen a una célula apical que se desarrollará en el embrión, y una célula basal que formará al suspensor. La siguiente etapa es la de transición, donde el embrión y el suspensor se alargan mediante más divisiones celulares. Las células originadas a partir de la célula apical son pequeñas y ricas en citoplasma, mientras que las células del suspensor son largas y vacuolizadas.

Al comienzo de la etapa coleoptilar, el meristemo apical del brote (SAM, shoot apical meristem) y el meristemo apical radicular (RAM, root apical meristem) pueden distinguirse y pronto también puede notarse una pequeña protuberancia que es de donde emerge la punta del coleóptilo. Al final de la etapa coleoptilar, el escutelo se alarga apical, basal y lateralmente. Las etapas tardías de la embriogénesis se nombran acorde al número de primordios de hoja presentes en el embrión, que van desde la 1 hasta la 6. La última fase de la embriogénesis es la maduración, donde productos como lípidos acumulados en el escutelo aumentan y conforman una parte significativa del embrión, mientras que el suspensor es degradado mediante apoptosis (Figura 2) (Vernaud *et al.*, 2005; Nardmann y Werr, 2009).

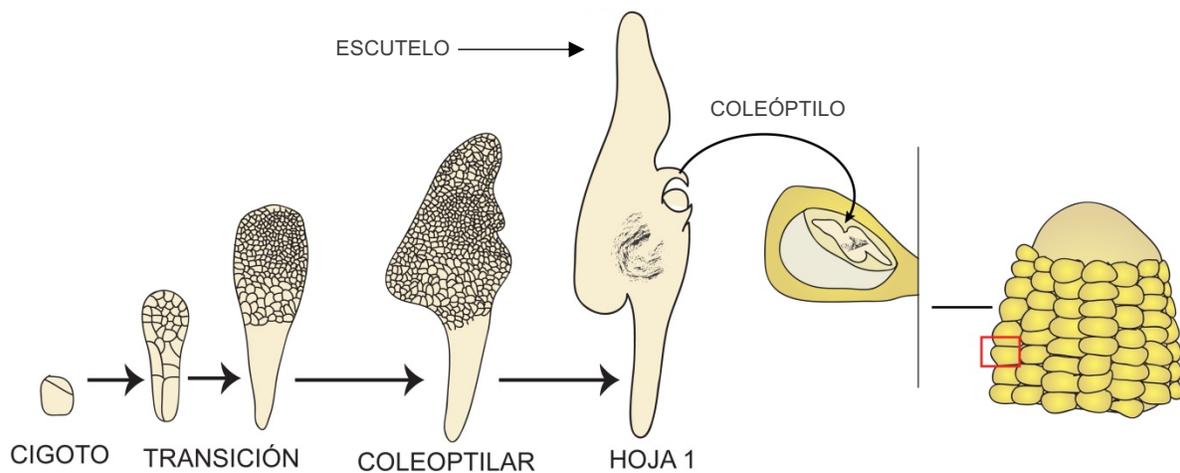


Figura 2. Modelo de embriogénesis cigótica en *Z. mays*. Diferentes etapas características del maíz (Modificado de Nardmann y Werr, 2009).

Embriogénesis Somática.

Las células vegetales poseen la capacidad de regenerar plantas completas a través de la embriogénesis somática (SE, Somatic embryogenesis) y organogénesis *de novo in vitro*, un fenómeno conocido como totipotencialidad (Ikeuchi *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2017). La organogénesis *de novo* es el proceso mediante el cual raíces o brotes son originados a partir de explantes ya sea directa o indirectamente (formación de callo), mientras que la SE se refiere al proceso mediante el cual células somáticas primero se desdiferencian y después se diferencian en células embrionarias que generan embriones y que, subsecuentemente, producen una planta (Long *et al.*, 2018). La SE es un medio útil y efectivo para la regeneración *in vitro* de especies que tienen un ciclo reproductivo muy largo o un bajo establecimiento de semillas (Smertenko y Bozhkov, 2014). Al ser un ejemplo clásico de la totipotencialidad de las células de las plantas, la SE ha llamado la atención por mucho tiempo y ha sido extensamente estudiada en muchas especies (Long *et al.*, 2018).

Cuando una especie vegetal es cultivada sobre un medio sintético, los explantes de los cuales se parte para iniciar el cultivo *in vitro* se van a desdiferenciar, posteriormente proliferarán en forma de células con la capacidad de generar

embriones somáticos, a este cúmulo de células indiferenciadas se les denomina callos embriogénicos (Bai *et al.*, 2000).

La embriogénesis somática juega un papel importante en la propagación clonal (Jakubekova *et al.*, 2011). Los embriones tienen un origen celular único, aunque por lo general se desarrollan a partir de masas multicelulares proembriogénicas, esto permite obtener plantas que conservan el genotipo (Garrocho-Villegas *et al.* 2012). Cuando se integra con los programas convencionales de mejoramiento y técnicas de Biología Celular y Molecular, la embriogénesis somática se convierte en una herramienta valiosa para el mejoramiento genético de cultivos comerciales, dado que los callos embriogénicos son más susceptibles a la transformación (González *et al.*, 2012). Además, el desarrollo de embriones somáticos se asemeja mucho al de embriones cigóticos, tanto morfológica como fisiológicamente, por lo que la embriogénesis somática se utiliza ampliamente como un sistema experimental para examinar los acontecimientos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos durante la embriogénesis cigótica. De igual forma, los sistemas de cultivo de tejidos de embriogénesis somática pueden ser utilizados como sistemas modelo para examinar los mecanismos que regulan la expresión de genes y otros eventos moleculares (Zimmerman, 1993).

Un paso clave en la inducción de embriogénesis somática es la modulación de factores físicos y químicos específicos que cambian la vía de desarrollo. Se ha visto que los reguladores de crecimiento y el estrés tienen un papel crucial en la cascada de señales transducidas para una reprogramación de la expresión genética, seguida de una serie de divisiones celulares que puede inducir tanto a un callo desorganizado como a un crecimiento polarizado que lleve a la embriogénesis somática (Yang y Zhang, 2010).

Una de las limitaciones que se ha visto en este proceso es que la capacidad de producir callos embriogénicos parece ser dependiente del genotipo y tejido. Estas disparidades entre la capacidad embriogénica podrían reflejar las diferencias entre el funcionamiento de elementos clave en las vías embriogénicas (Merkle *et al.*, 1995). En el maíz, el tipo de explante y el fondo genético de la variedad son determinantes en el establecimiento de cultivos embriogénicos, ya que no todas las variedades de maíz son embriogénicas y, además, no se puede establecer a partir

de cualquier tejido. Los embriones inmaduros, cosechados en un periodo entre 12 y 18 días después de la polinización, son los mejores explantes para el establecimiento de cultivos embriogénicos, debido a que los callos que se obtienen de estos tejidos muestran una alta eficiencia de regeneración (Garrocho-Villegas *et al.* 2012).

Se ha visto que el estrés y/o las hormonas son factores comunes que inducen la formación de embriones somáticos (Fehér, 2015). Para la iniciación y proliferación de callos embriogénicos, se usan hormonas que regulan la reprogramación del desarrollo. En este sentido, las auxinas y citocininas son los mejores reguladores, ya que están relacionadas con la regulación de la división y diferenciación celular (Jakubekova *et al.*, 2011).

Las auxinas se refieren a un grupo importante de fitohormonas que están implicadas en la mayor parte de los cambios debidos al crecimiento durante el ciclo de vida de una planta. Éstas no sólo pueden tener una influencia directa en el crecimiento celular, sino que controlan numerosos y diversos aspectos del desarrollo de una planta (Teale *et al.*, 2006).

El ácido 3-indolacético (IAA) es la auxina predominante en plantas, y es indispensable en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de la planta. Existen derivados sintéticos de auxinas, éstos son muy usados como herbicidas y también para imitar la acción de estas hormonas, tal es el caso del ácido 2,4-diclorofenoxiacético. El efecto de la auxina en el crecimiento de la planta depende del tipo de auxina aplicada y de su concentración. Las auxinas influyen en aspectos de la división celular, elongación de las células y diferenciación; la manera exacta en la que están involucradas en cada proceso no está completamente entendido (Teale *et al.*, 2006).

Las citocininas (CK) naturales son derivados de adenina que unen ya sea un derivado isoprenoide o un derivado aromático. En ambos grupos existen pequeñas variaciones dentro de la estructura de la cadena, como la ausencia o presencia de grupos hidroxilo, además de los respectivos isómeros; y el efecto fisiológico de muchas de estas variaciones no ha sido dilucidado. Su biosíntesis y homeostasis está finamente controlada por factores internos y externos, como otras fitohormonas y fuentes de nitrógeno inorgánico (Mok y Mok, 2001; Sakakibara, 2006).

Las citocininas desempeñan un papel crucial en la regulación de la proliferación y diferenciación de células de planta, y también controlan varios procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como el retraso de la senescencia, la transducción de señales nutricionales y el incremento de la productividad del cultivo (Sakakibara, 2006).

Estudios en tejidos y plantas completas han demostrado que existe sinergismo, antagonismo e interacciones aditivas ente auxinas y citocininas. Ambas hormonas tienen funciones coordinadas como mensajeros a larga distancia, así como señales locales; son sintetizadas principalmente en las puntas de las raíces y actúan en varios sitios en el cuerpo de la planta; sin embargo, la diferenciación fisiológica y los mecanismos de las señales de este sistema dual no han sido completamente dilucidados, ya que el modo de interacción entre ellas es frecuentemente dependiente de la especie de la planta y el tipo de tejido (Coenen y Lomax, 1997; Sakakibara, 2006; Teale *et al.*, 2006).

En la embriogénesis somática, las auxinas tienen un rol fundamental ya que son capaces de alterar el programa genético fisiológico de los tejidos explante. Las células responden a las auxinas, se reprograman y comienzan a dividirse. Se sabe que la aplicación de ciertas auxinas causa la hipermetilación del DNA, sugiriendo que este mecanismo epigenético es clave para la reprogramación y desdiferenciación de células (Machakova *et al.*, 2008). Sin importar la naturaleza de la auxina, ésta es percibida por receptores celulares para desencadenar una cascada de transducción de señales con un efecto fisiológico marcado: expansión celular, aumento de la división, desdiferenciación y/u organogénesis, dependiendo de la concentración de la auxina aplicada (Teale *et al.*, 2006).

En el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de UNAM, se ha desarrollado un protocolo de embriogénesis somática indirecta (Figura 3; Garrocho-Villegas *et al.* 2012). Se utilizan embriones inmaduros de maíz cosechados en un periodo entre 14 y 18 días después de la polinización para generar la inducción de cultivos de callos embriogénicos. Para la iniciación y la proliferación se utiliza medio N6, el cual tiene la capacidad de mejorar la formación, crecimiento y diferenciación de callos embriogénicos al ser enriquecido con auxinas sintéticas como el ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) y condiciones de

oscuridad. Transcurridos 7 días de la inducción, se subcultivan los embriones en medio N6 con cinetina, una citocinina que en conjunto con el 2,4-D potencia la división celular y proliferación de callos embriogénicos. En este medio, se realizan los subcultivos cada dos semanas. Estos cultivos pueden mantenerse en proliferación hasta por dos años y regenerar una planta al retirarse la auxina, la cinetina y exponiendo los tejidos a la luz (Jakubekova *et al.*, 2012).

Desde el primer reporte de SE en zanahoria (Steward *et al.*, 1958), los estudios iniciales se centraron en la manipulación para inducir embriones somáticos en muchas otras especies de plantas, mientras que en años recientes se han hecho esfuerzos por entender los mecanismos que pueden estar regulando la SE.

Se ha propuesto que uno de los posibles mecanismos regulatorios involucrados en la inducción de la embriogénesis somática, incluyendo maíz, es el mediado por RNAs pequeños (sRNAs). Éstas moléculas son clave en el desarrollo, crecimiento y respuestas a condiciones adversas de las plantas (Ramachandran y Chen, 2008; Chen, 2009; Borges y Martienssen, 2015; Brant y Budak, 2018)

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

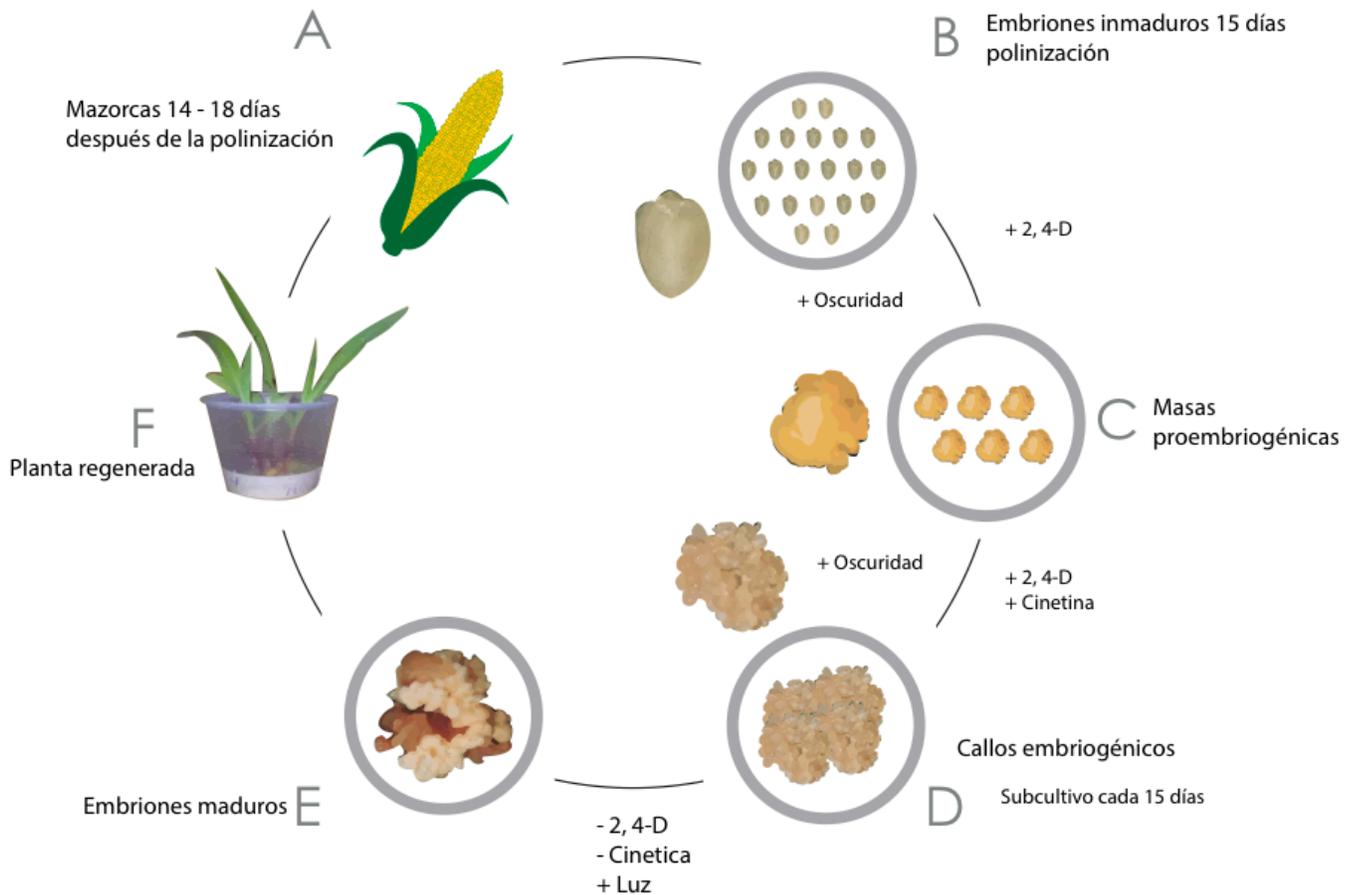


Figura 3. Esquema de la inducción, proliferación y regeneración en embriogénesis somática de maíz (Jakubekova *et al.*, 2012).

RNAs pequeños (sRNAs).

Los RNAs pequeños (sRNAs) de plantas son moléculas de 19 a 27 nucleótidos que se originan de precursores de RNA de cadena sencilla con estructura tallo-asa (hpRNA) o de RNA de doble cadena (dsRNAs) (Cárdenas-Monroy *et al.*, 2016). Estos transcritos juegan un papel crucial en una gran variedad de procesos de regulación biológica, incluyendo el desarrollo y defensa de la planta, además de modificaciones epigenéticas (Simon y Meyers, 2011).

Los sRNAs en plantas pueden ser clasificados principalmente en: microRNAs (miRNAs); RNAs pequeños interferentes heterocromáticos (hc-siRNAs); RNAs

pequeños interferentes producidos en fase (phasiRNAs); y RNAs pequeños interferentes derivados de transcritos naturales antisentido (NAT-siRNAs). Estas categorías son definidas de acuerdo su origen y biogénesis (Tabla 1) (Chen, 2009; Axtell, 2013).

La función de los sRNAs en plantas está íntimamente ligada a su biogénesis, particularmente a la acción de las enzimas Dicer-like (DCL) encargadas de generar el dúplex de sRNA de tamaño definido (21-24 nt), Argonauta (AGO) encargada de seleccionar la cadena efectora, llevarla a su mRNA diana y completar su función reguladora, así como las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR) que generan los dsRNA precursores de phasiRNAs y hc-siRNAs (Czech y Hannon, 2011).

Tabla 1. Principales clases de sRNAs en plantas.				
Clase	Descripción	Tamaño	Origen Genómico	Función.
miRNAs	microRNAs	21 nt	Genes MIR	Regulación de la estabilidad del mRNA y su traducción.
phasiRNAs	RNAs pequeños de interferencia en fase	21 nt	Loci PHAS	Regulación postranscripcional.
hc-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia heterocromáticos	24 nt	Secuencias repetidas y transposones	Regulación transcripcional (modificación de la cromatina)
NAT-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia naturales antisentido	21 o 22 nt	Transcritos bidireccionales inducidos por estrés	Regulación de genes de respuesta a estrés.

MicroRNAs (miRNAs)

Biogénesis de miRNAs en plantas

Los miRNAs se derivan de precursores de RNA de cadena sencilla (ssRNA) que se pliegan formando una estructura secundaria de stem-loop, a las cuales se les denomina pri-miRNAs. Los pri-miRNAs son transcritos por la RNA PolIII a partir de genes específicos, llamados genes MIR, que por lo general no codifican para

proteínas. Del mismo modo que los transcritos codificantes, los pri-miRNAs tienen estructuras típicas de transcritos de PolIII, una estructura cap en el extremo 5', una cola de poli(A) en su extremo 3' y comúnmente contienen intrones (Jones-Rhoades *et al.*, 2005). Los pri-miRNAs son procesados en miRNAs maduros por Dicer-like 1 (DCL1) en *Arabidopsis*. Este proceso requiere además de la actividad adicional de varias proteínas, incluyendo a la Proteínas de unión a Cap 20 (CBP20) y CBP80/ABH1, la proteína de dedos de zinc Serrate (SE), la proteína de unión a dsRNA e Hyponastic leaves 1 (DRB1/HYL1), el dominio asociado forkhead (FHA) que contiene a la proteína Dawdle (DDL), la proteína Tough (TGH), la proteína rica en prolina Sickle (SIC) y la proteína de unión a RNA Modifier of SNC1 2 (MOS2). Los miRNAs conservados son procesados por DCL1 y DRB1 a partir de pequeños stem-loops imperfectamente apareados; mientras que los no conservados, por ejemplo, los miRNAs jóvenes, son procesados por DCL4 y DRB4 a partir de stem-loops largos casi perfectamente apareados, lo que sugiere que los genes MIR se derivan de secuencias repetidas invertidas probablemente resultado de duplicaciones genómicas (De Alba *et al.*, 2013).

Una vez que se ha procesado el pri-miRNA, se convierte en pre-miRNA, y éste es cortado por DCL1 y HYL1 en dúplex de miRNA 5p /miRNA 3p; estos dúplex tienen dos nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' de cada cadena y pueden ser fácilmente degradados por una exonucleasa llamada SDN (por sus siglas en inglés: Small RNA Degrading Nuclease). Para estabilizar el dúplex, una metiltransferasa de RNA llamada HEN1 (por sus siglas en inglés: Hua Enhancer1) metila los nucleótidos terminales 3' de cada cadena del dúplex para prevenir su degradación. Después, el dúplex de miRNA 5p/miRNA 3p es transportado del núcleo al citoplasma por una proteína llamada HASTY a través de un poro nuclear en un proceso dependiente de ATP. En el citoplasma, el dúplex es separado y una de las cadenas es incorporada en una proteína AGO específica que funciona como el elemento central en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), mientras que la otra cadena es degradada por un mecanismo aún desconocido (Figura 4; Czech y Hannon, 2011; Sun, 2012).

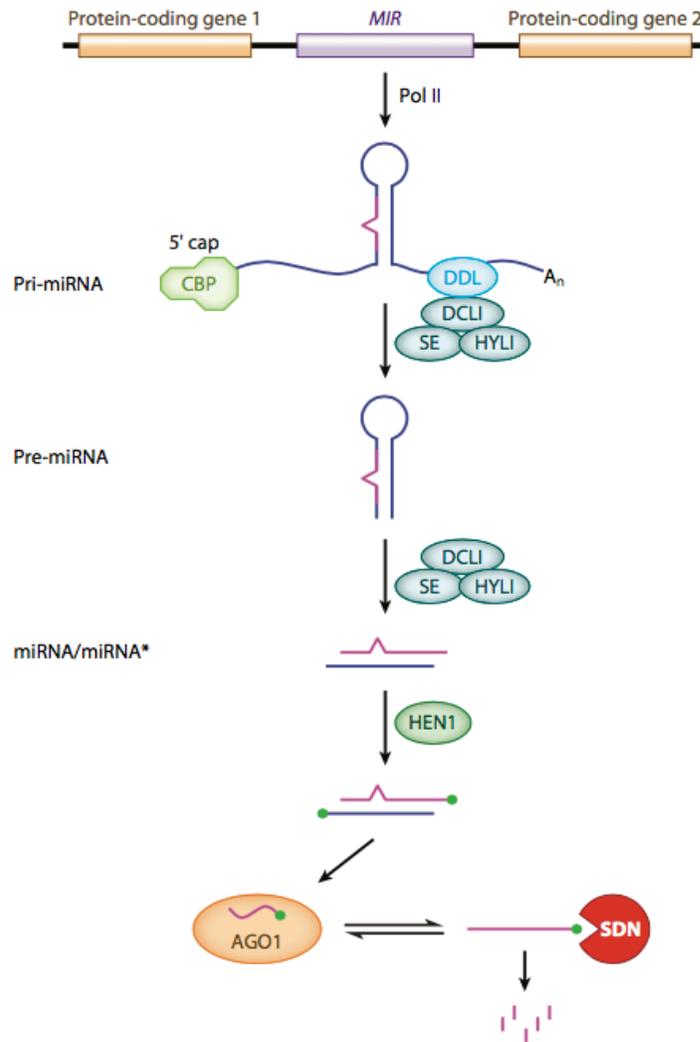


Figura 4. Biogénesis y degradación de miRNAs. El gen para microRNA (*MIR*) de planta está localizado entre dos genes codificantes. El gen *MIR* es transcrito en un pri-miRNA, se le agrega un cap y es poliadenilado. El pri-miRNA es procesado en pre-miRNA, el cual es posteriormente procesado en el dúplex miRNA-5P/miRNA-3P. El dúplex es metilado por HEN1 y el miRNA-5P es cargado en el complejo AGO1. El complejo heterodimérico de unión a cap (CBP) y la proteína de unión a RNA DDL promueven la biogénesis del miRNA pero no son esenciales (DDL, DAWDLE; DCL1, DICER-LIKE1; SE, SERRATE; HYL1, HYPOPLASTIC LEAVES1; AGO1, ARGONAUTE1; SDN, SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE; Chen, 2009).

Funciones de los miRNAs en plantas.

El conocimiento actual acerca del rol regulatorio de los miRNAs y sus blancos apunta a funciones fundamentales en varios aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la señalización por auxinas, formación de meristemas y especialización de órganos, desarrollo de hoja y su polaridad, formación de raíces laterales, transiciones de fases juveniles-vegetativa-floración, entre otros (Zhang *et al.*,2009). Las familias de miRNAs están definidas por la secuencia de los productos maduros de los genes *MIR* que son biológicamente activos. Algunas familias de miRNAs se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, lo que es indicativo de su origen ancestral. Los miRNAs homólogos entre distintas especies de plantas tienen blancos similares y funciones conservadas (Mica *et al.*,2006). Esto es práctico ya que la mayor parte de los estudios sobre miRNAs están desarrollados en *Arabidopsis thaliana* y éstos sirven de guía para el desarrollo de nuevo conocimiento en otras especies de plantas. Sin embargo, no todas las familias de miRNAs están conservadas y los blancos de estos miRNAs no conservados tienen funciones poco conocidas (Qin *et al.*,2014).

Las funciones de las familias de miRNAs conservados en plantas se pueden clasificar en tres grandes categorías de acuerdo a su función: procesos de desarrollo, respuestas de adaptación a estrés y regulación de la biogénesis y función de miRNAs (Mallory y Vaucheret, 2006) (Figura 5). La mayor parte de los miRNAs en plantas, afectan la expresión de factores de transcripción que influyen y determinan el destino celular. Actualmente, cerca del 50% de los blancos de miRNAs han sido identificados como factores de transcripción. En maíz se ha reportado la existencia de 29 familias distintas de miRNAs (Chávez-Hernández, 2015), de las cuales 28 son conservadas con respecto al arroz (*Oriza sativa*) y 22 con respecto a *Arabidopsis thaliana*. Es importante señalar que los genes blanco de estas familias conservadas, también se encuentran conservados.

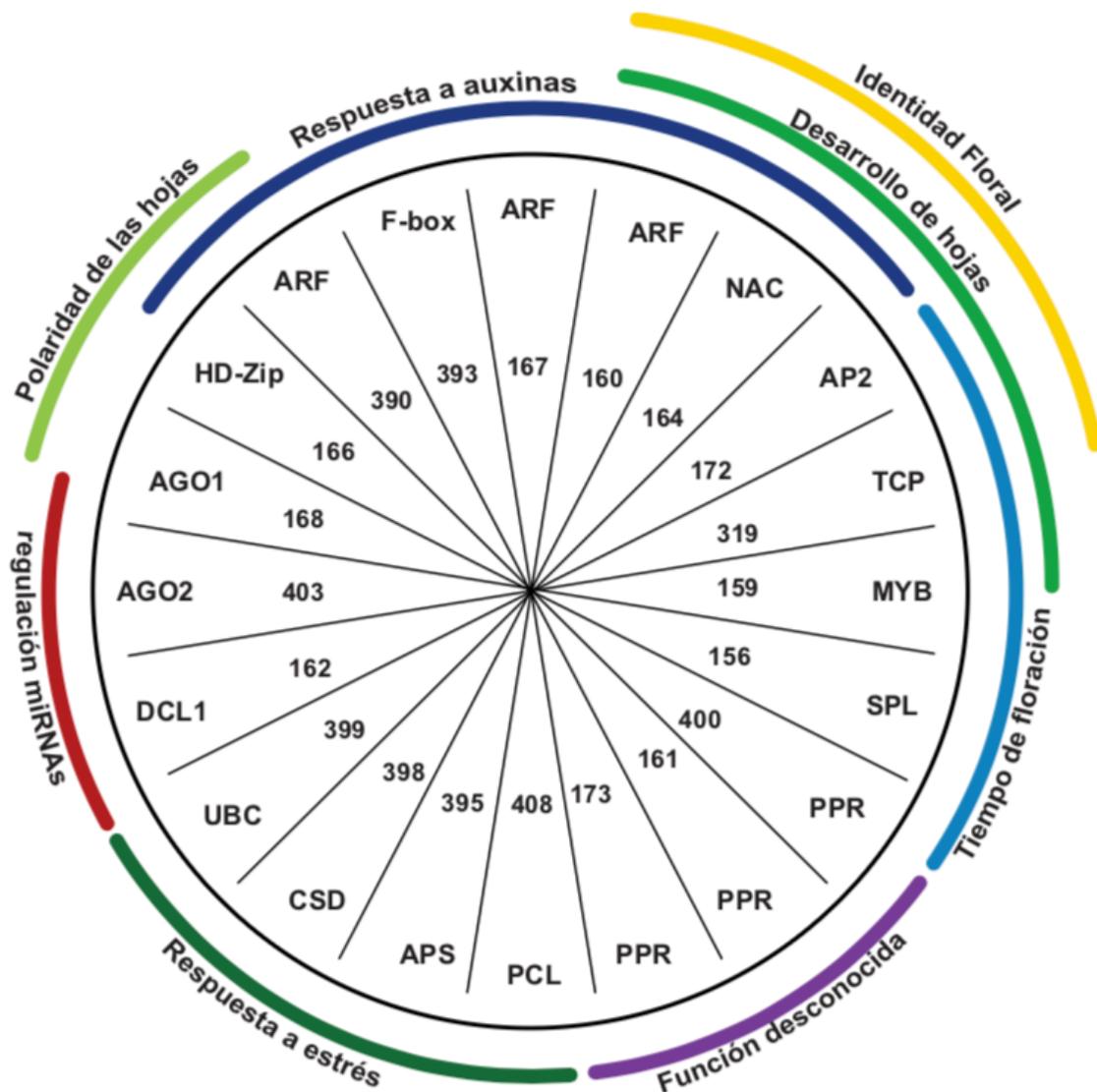


Figura 5. Procesos regulados por miRNAs. Los miRNAs se encuentran agrupados de acuerdo con los mRNAs blanco que regulan (en los bordes del círculo) y su función (líneas de colores) en programas de desarrollo, respuestas adaptativas al estrés y la regulación de la vía de miRNAs por sí misma (Modificado de Mallory y Vaucheret, 2006).

Mecanismo de acción de los miRNAs

En los últimos años, se ha tenido un progreso importante en el entendimiento de la biogenesis de miRNAs y su función; sin embargo, los mecanismos que usan para regular la expresión genética permanecen sin ser aclarados y en controversia (Carthew y Sontheimer, 2009; Wu y Belasco, 2008; Eulalio *et al.*, 2009). En

animales, la evidencia inicial sugería que los miRNAs reprimían a sus blancos a nivel de traducción, con pequeña o nula influencia en los niveles de mRNA. Por el contrario, en plantas, se creía que los miRNAs actuaban casi siempre promoviendo el corte endonucleolítico del blanco y su degradación. Estas diferencias en la regulación entre plantas y animales provienen del hecho de que el apareamiento de bases entre los miRNAs y sus blancos es menor en animales que en plantas (Figura 6) (Huntzinger e Izaurralde, 2011). No obstante, a pesar de las diferencias en el reconocimiento de los blancos, se ha visto que los miRNAs pueden inducir la degradación de los mensajeros en animales, y reprimir la traducción en plantas. Esto ha llevado a preguntarse si el silenciamiento de los blancos ocurre predominantemente vía degradación del mensajero o a nivel traduccional, donde existe mucha controversia, con diferentes líneas de investigación que respaldan ambos puntos de vista (Carthew y Sontheimer, 2009; Wu y Belasco, 2008; Eulalio *et al.*, 2009).

En animales, los sitios blanco de los miRNAs son comúnmente encontrados dentro de la región 3' no traducible (UTR) de los mRNAs blanco (Bartel, 2009). La región 5' UTR y los marcos abiertos de lectura (ORF) blanco también son sitios funcionales, pero de menor manera, y ocurre con mucha menos frecuencia (Grimson *et al.*, 2007; Lytle *et al.*, 2007). Muchos sitios blanco de miRNAs en animales forman siete consecutivos pares de bases de la posición 2 a 8 (contando desde el extremo 5' del miRNA alineado); esta región se denomina semilla.

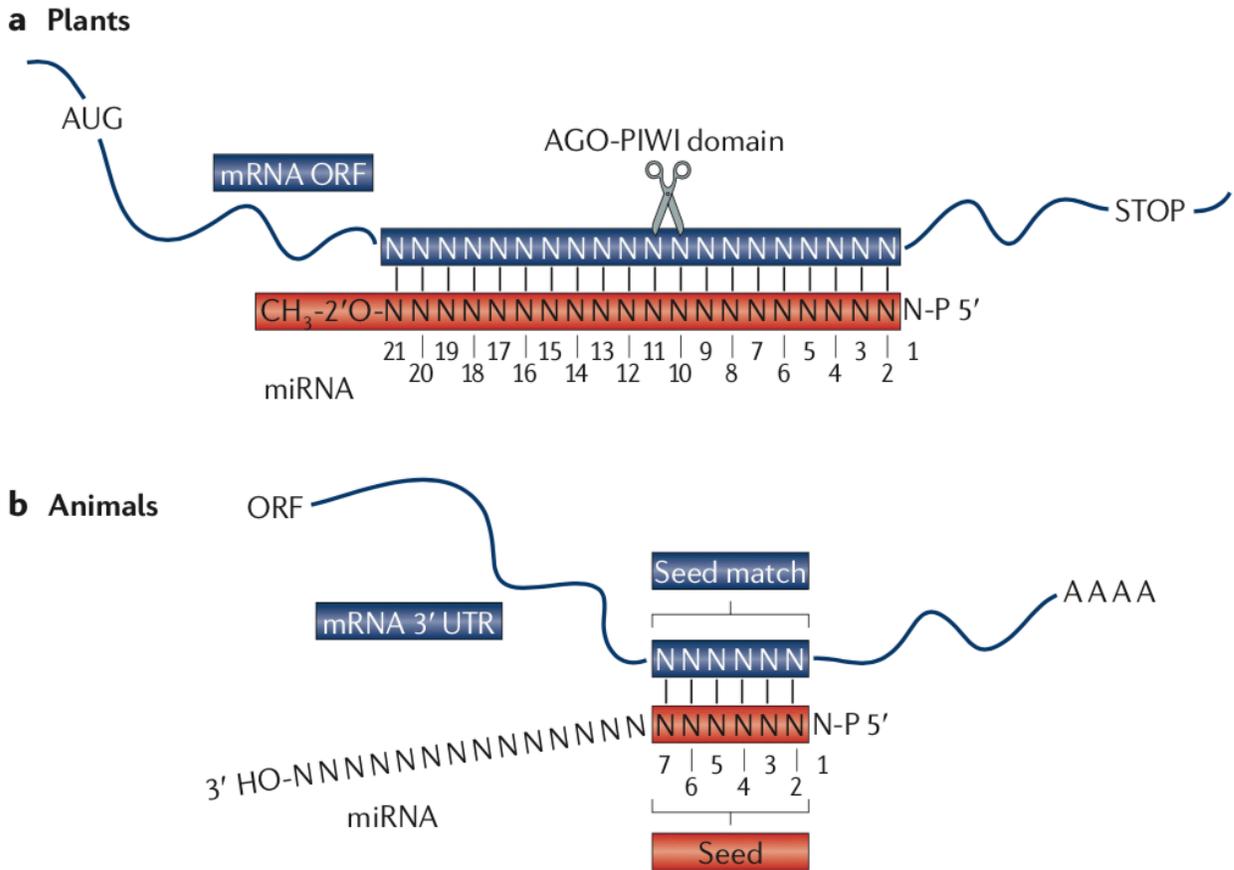


Figura 6. Reconocimiento del mRNA blanco en plantas y animales. Los miRNAs reconocen a sus blancos mediante apareamiento de bases tipo Watson-Crick. **a.** Los miRNAs de plantas reconocen completa o casi completamente a sus sitios blanco. Los nucleótidos 9-12 usualmente se encuentran apareados, lo cual permite el corte mediado por las proteínas AGO. **b.** Los miRNAs en animales reconocen sitios parcialmente complementarios, los cuales están localizados usualmente en la región 3'UTR. La región semilla contiene a los nucleótidos 2-7, y es la mayor determinante para el reconocimiento y suficiente para promover el corte (Huntzinger e Izaurralde, 2011).

Las regiones semilla apareadas de manera perfecta e imperfecta son ocasionalmente acompañadas por apareamientos adicionales en la región 3' del miRNA, lo que resulta en un mejor reconocimiento del blanco (Grimson et al., 2007). En pocos casos, sitios centrados que comprenden apareamiento en posiciones 4 a 15, también median la represión de los blancos (Shin et al., 2010). En contraste, la mayor parte de sitios blancos de miRNA verificados en plantas son sitios localizados

en ORFs, con algunas excepciones en 5'UTR, 3'UTR o RNAs no codificantes (Allen et al., 2005; Addo-Quaye *et al.*, 2008; German *et al.*, 2008). Además, en contraste con los sitios blanco de miRNA en animales, una complementariedad extensiva (normalmente ≤ 5 desapareamientos) es lo que distingue a los sitios blanco funcionales validados en plantas. El apareamiento de bases en la región 5' del miRNA (de las posiciones 2-13) es crítica para la represión de los blancos con el apareamiento en la vecindad en el sitio catalítico de AGO (posiciones 9-11) siendo especialmente importante. Los desapareamientos en la región 3' son menos importantes que aquellos en la región 5' o región central (Mallory et al., 2004; Parizotto et al., 2004; Schwab et al., 2005; Iwakawa y Tomari, 2015).

La represión traduccional por miRNAs es común en animales e involucra la inhibición del inicio de la traducción (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Mathonnet et al., 2007), seguida por una deadenilación en el extremo 3' y remoción de la estructura 5' cap del mensajero (Wakiyama et al., 2007; Iwasaki et al., 2009). Todos los mRNAs eucarióticos transcritos en el núcleo contienen una estructura 5' m⁷GpppN (donde N es cualquier nucleótido) comúnmente llamada 5'cap, que interactúa con el factor de inicio de la traducción eIF4E (Sonenberg y Hinnebusch, 2009). eIF4E, junto con otros eIFs, recluta a los ribosomas para iniciar la traducción del mRNA. Se ha reportado que el miRISC inhibe la traducción cap-dependiente a nivel de inicio interfiriendo con el reclutamiento del ribosoma (Wang, Yanez y Novina, 2008; Mathonnet *et al.*, 2007) y a nivel de post inicio (Nottrott, Simard y Richter, 2006).

En plantas, aunque muchos sitios blanco de miRNAs son sujetos a corte endonucleolítico por las AGOs, se ha sugerido que los que muestran una menor complementariedad podrían ser enviados exclusivamente a represión traduccional sin desestabilización detectable del mensajero (Dugas y Bartel, 2008). Sin embargo, casi todos los casos documentados de represión traduccional mediada por miRNAs en plantas involucran sitios blanco con una canónica alta complementariedad (Aukerman y Sakai, 2003; Chen, 2004; Gandikota et al., 2007; Brodersen et al., 2008; Yang et al., 2012; J.-F. Li et al., 2013; S. Li et al., 2013).

En un sistema *in vitro*, la represión traduccional puede ser observada para sitios con complementariedad perfecta sólo cuando los residuos de AGO que catalizan el corte del blanco están mutados, o en sitios que tienen desapareamientos centrales localizados en la región 5' UTR. Sitios parecidos a los de animales, donde sólo la región semilla es complementaria, no son efectivos (Iwakawa y Tomari, 2013). De cualquier modo, los sitios blanco potencialmente efectivos con más de 5 desapareamientos no han sido documentados sistemáticamente *in vivo* en una planta. La facilidad tanto de predecir (Rhoades *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004) como de validar (Llave *et al.*, 2002; German *et al.*, 2008; Addo-Quaye *et al.*, 2008) sitios blanco de miRNAs canónicos y de alta complementariedad puede haber llevado a la omisión de una gran cantidad de sitios con menor complementariedad en plantas (Liu, Wang y Axtell, 2014).

La represión traduccional y el decaimiento del mRNA es un proceso central en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes eucariontes. El acortamiento de la cola de poli(A) de un mensajero eucarionte es el paso inicial y limitante para el silenciamiento del mRNA y es llevado a cabo por el complejo de deadenilación CCR4-NOT (Chen y Shyu, 2011). La terminación 3' deadenilada sirve subsecuentemente como una plataforma de unión a numerosos factores proteicos que promueven la represión traduccional del mensajero y facilita la remoción irreversible de la estructura 5' cap por el complejo de decapping Dcp1-Dcp2. Finalmente, el mensajero sin estructura cap es degradado por la exonucleasa con actividad 5'-3' XRN1 y removido de la poza traduccional (Chowdhury y Tharun, 2009). El reclutamiento del complejo de decapping a la estructura 5' cap es orquestado por una interacción proteína-proteína que involucra varios factores de decapping y represores traduccionales. Esto incluye el complejo LSM1-7, PATL1, promotor de decapping 3 (EDC3), EDC4, la proteína de unión a eIF4E 4E-T, Like Sm14 (LSM14), y la helicasa de RNA DEAD-box DDX6 (Arribas-Layton *et al.*, 2013; Nishimura *et al.*, 2015). La mayoría de los represores traduccionales y activadores de decapping tienen una arquitectura modular en la que los dominios globulares están embebidos dentro de una secuencia de baja complejidad que se predice no está estructurada (Jonas e Izaurralde, 2013). De manera interesante, estas regiones intrínsecamente desordenadas frecuentemente contienen motivos de secuencias

lineales cortas (SliMs) que median el ensamblaje de complejos proteicos, así como la formación de gránulos de ribonucleoproteínas como los cuerpos de procesamiento (P-bodies; Eulalio *et al.*, 2007).

A pesar de que la secuencia del miRNA determina con cual mensajero interactúa en un transcriptoma dado, es el componente proteico del miRISC el que ejecuta el silenciamiento del mensajero blanco. Los componentes esenciales de los miRISC en mamíferos consisten en una de cuatro proteínas argonauta (AGO1-4) y la proteína GW182. Así, el miRISC también promueve deadenilación y la subsecuente degradación de los mRNA blanco (Wu, Fan & Belasco, 2006). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual lleva a cabo estos eventos, el orden en el que suceden y las proteínas que son reclutadas por el miRISC son temas controversiales; existen cuestionamientos sobre cómo el miRISC puede inhibir la traducción sin degradar al mensajero; si la deadenilación precede o sucede a la represión traduccional, o si se dan simultáneamente; y cuáles proteínas son reclutadas para ejercer el silenciamiento (Figura 7; Fabian & Sonenberg, 2012).

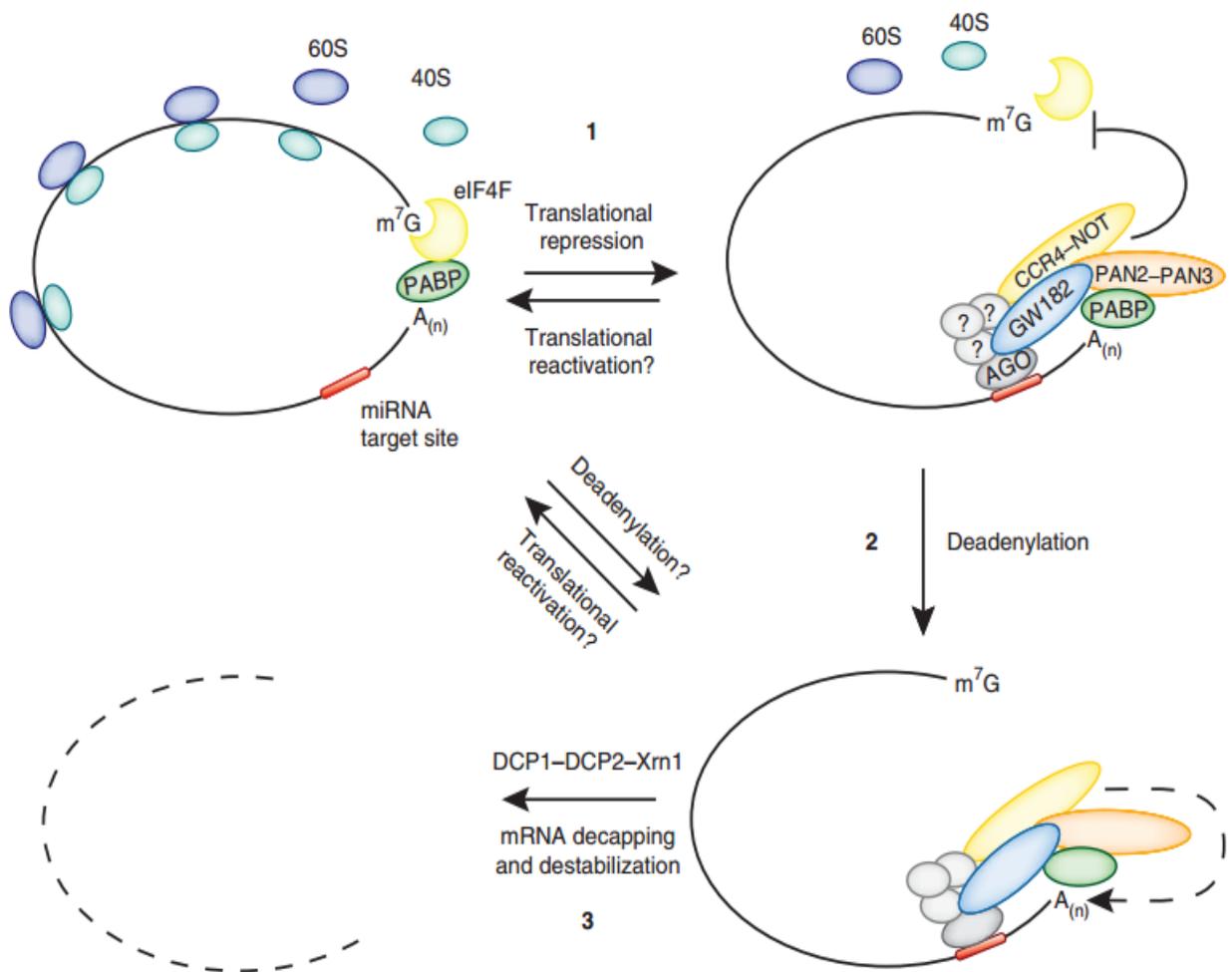


Figura 7. Modelo de inhibición traduccional mediado por microRNA en animales. De acuerdo con un modelo, el miRISC inhibe el inicio de la traducción al interferir con el reconocimiento del eIF4F y el cap a través de la subunidad eIF4E y el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S (7,8). La interacción de la proteína GW182 con PABP podría interferir con la circularización del mensajero dada por la interacción de PABP con eIF4F, lo que contribuye a la inhibición del inicio de la traducción (1). La deadenilación es mediada por el complejo de deadenilación CCR4-NOT, que es reclutado por GW182, y por el complejo PAN2-PAN3 (2). Después de la deadenilación, el 5'cap es removido por el complejo de decapping DCP1-DCP2 y el mRNA es degradado por la exonucleasa Xrn1 (3) (Fabian & Sonenberg, 2012)

El primer miRNA observado en plantas que actúa a través de la represión traduccional fue miR172, el cual se encuentra presente en dicotiledóneas y

monocotiledóneas incluyendo *Arabidopsis*, arroz y otras plantas. miR172 juega un papel importante durante el tiempo de floración y la morfología de la flor, y la sobreexpresión de miR172 reprime la expresión de una clase de factores de la transcripción APETALA2 (AP2)-like (Yu y Wang, 2010). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo este silenciamiento tampoco es claro, dado que en plantas no se ha encontrado algún ortólogo de GW182 que pudiera estar actuando de alguna forma ayudando a que se de este mecanismo de represión, por lo que es necesario que existan más estudios que aborden este tema en plantas (Fabian & Sonenberg, 2012). Actualmente se ha observado que este mecanismo de acción es más común de lo que se pensaba en plantas e incluye diferentes familias de miRNAs (Chen, 2004; Gandikota *et al.*, 2007; Dugas y Bartel, 2008; Todesco *et al.*, 2010).

Estudio de la traducción y de la regulación mediada por miRNAs mediante el uso de lisados celulares.

Los lisados libres de células han sido ampliamente utilizados para estudiar mecanismos de regulación traduccional, incluyendo aquellos mediados por miRNAs. Son sistemas provenientes de extractos crudos de tejidos u organismos. Éstos, simulan un ambiente celular que favorece la traducción; además, están libres de DNA genómico y membranas, por lo que permiten trabajar con los componentes citosólicos relevantes para realizar el proceso de traducción, como son los ribosomas, factores de inicio, elongación y terminación, tRNAs, aminoácidos, ATP, GTP, mRNAs y un amortiguador de pH adecuado (Carlson *et al.* 2012). A su vez, estos sistemas permiten adicionar sustratos, remover productos y monitorear al sistema para llevar a cabo una síntesis eficiente de proteínas. También permiten estudiar secuencias regulatorias dentro de un mRNA como 5'UTR, 3'UTR, 5'Cap, cola de poliA, secuencias blanco de miRNA, etc. utilizando un reportero con actividad fácilmente cuantificable (Luciferasa u otro) (Spirin y Swartz 2007).

Dentro de la variedad de las aplicaciones de los lisados competentes en traducción se encuentra el estudio en el plegamiento de las proteínas, la incorporación de aminoácidos marcados para análisis específicos, la expresión de genes que dan

origen a elementos tóxicos para la célula, proteínas que son difíciles de expresar *in vivo* o cuando son blanco de proteasas intracelulares (Hodgman y Jewett 2012; Carlson *et al.* 2012; Hodgman y Jewett 2013). Por otro lado, los lisados celulares también han desempeñado un papel importante en la industria biotecnológica, pues desde hace más de 30 años la traducción *in vitro* de enzimas, proteínas recombinantes, péptidos específicos, y compuestos de interés farmacéutico han revolucionado la Biotecnología moderna (Hodgman y Jewett 2012; Whittaker 2013). En los últimos años, los sistemas de traducción *in vitro* se han destacado por su utilidad en el área del estudio de los sRNAs. Diversos grupos de trabajo los han usado para elucidar distintos mecanismos mediante los cuales los miRNAs ejercen su regulación sobre los mRNAs blanco (Tang *et al.*, 2003; Iki, Yoshikawa, Nishikiori *et al.*, 2010; Iwakawa y Tomari, 2013).

ANTECEDENTES

En trabajos previos del laboratorio se encontró que miR528, específico de plantas monocotiledóneas, es uno de los miRNAs más abundantes durante el proceso de ES y en embriones inmaduros de maíz. Este miRNA se ha asociado a procesos de estrés acorde a la función de sus mRNA blanco predichos y, hasta hace muy poco, se ha comenzado a estudiar con mayor detalle. También se observó que miR528 se encontraba en fracciones polirribosomales (Figura 8), lo que sugirió que este miRNA podía estar actuando a nivel traduccional (Juárez-González, 2015).

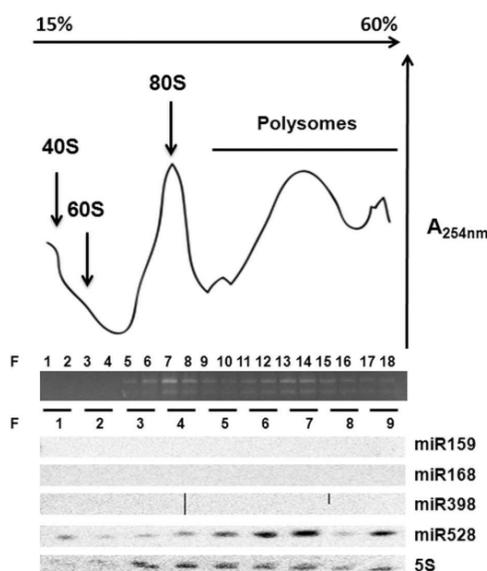


Figura 8. miR528 se localiza en polirribosomas. Perfil polirribosomal de callo embriogénico de dos años de subcultivo después de un fraccionamiento por gradiente de sacarosa. La abundancia total de RNA e integridad de las fracciones (F) fue medida por absorbancia a 254 nm y mediante electroforesis en agarosa. Se realizó un Northern Blot de los miRNAs seleccionados a partir del RNA aislado de las 9 fracciones resultantes. El RNA ribosomal 5S fue usado como control del ensayo de Northern Blot (Tomado de Chávez-Hernández *et al.*, 2015).

Al evaluar la expresión relativa a nivel de transcrito de dos de los blancos predichos para miR528 en regeneración de callos embriogénicos de maíz, se encontraron patrones diferenciales (Figura 9; Chávez-Hernández *et al.*, 2015). En el caso de la

superóxido dismutasa (SOD-1A), cuando hay un pico de expresión de miR528, el RNA mensajero disminuyó, mientras que para el mRNA correspondiente a un gen homólogo a plastocianina (PLC), no existe esta correspondencia. Por otro lado, se encontraron productos de degradación por la acción del miRNA para ambos mRNAs, aunque los correspondientes a SOD1A fueron mucho más abundantes (Luján-Soto, 2018). Estos resultados sugieren que miR528 podría estar regulando a sus blancos de manera diferencial y participando en un mecanismo de represión traduccional.

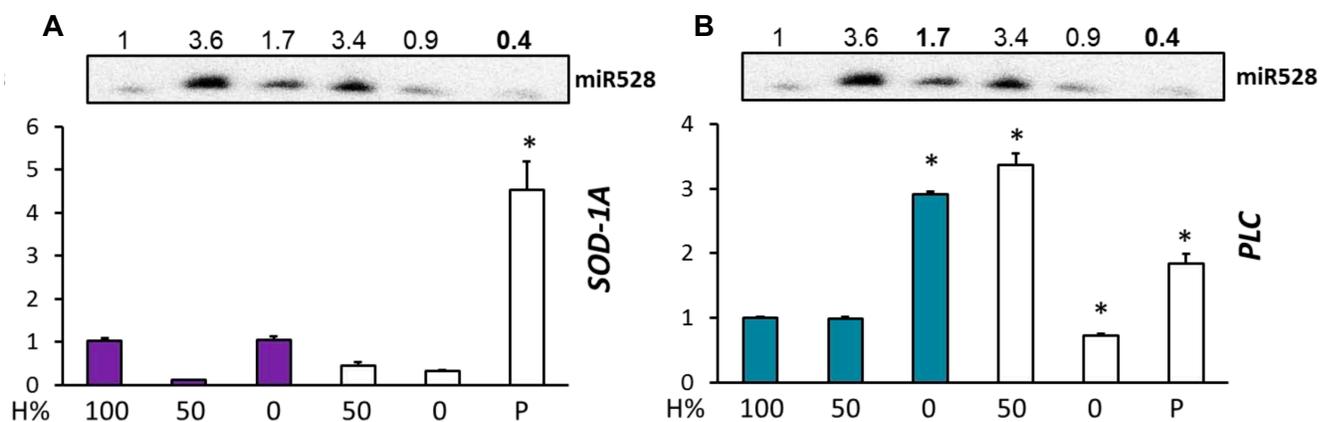


Figura 9. Expresión relativa de los mRNAs blanco propuestos para miR528 en regeneración de callos embriogénicos de maíz VS-535. SOD-1A (A) y PLC (B). Expresiones relativas medidas por qRT-PCR y de miR528 medida por Northern-Blot y densitometría. Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16h luz 8h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco (Tomado de Chávez-Hernández, 2015).

Para evaluar el posible mecanismo de acción de miR528 en el proceso de ES de maíz, surgió la necesidad de generar una herramienta que ayudara a estudiar la regulación ejercida por este y otros microRNAs sobre sus mRNA blanco a nivel traduccional. Por este motivo se decidió generar un sistema de traducción *in vitro* a partir de callos embriogénicos de maíz, el cual una vez optimizado podría ser utilizado para evaluar la regulación traduccional ejercida por miRNAs,

proporcionando al sistema miRNAs exógenos y sus versiones antisentido, diferentes enzimas AGO y un gen reportero que contiene secuencias blanco para el miRNA. Contar con este sistema ayudaría a determinar el nivel de regulación que ejercen algunos miRNAs específicos particularmente relevantes en ES, como miR528.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que existen sistemas estándares para traducción *in vitro* como reticulocitos de conejo, embriones de *Drosophila*, extracto de levadura y germen de trigo, en estos sistemas hay muchas limitaciones para realizar el estudio referido al proceso de ES. Dos de los sistemas mencionados son de células animales, mientras que en el de germen de trigo, a pesar de corresponder a un sistema vegetal, representa un estadio de desarrollo incapaz de promover ES. El germen de trigo es un embrión maduro, por lo que existen un mayor número de componentes regulatorios relacionados con el proceso de desecación, la germinación de la planta, entre otros, que no existen en embrión inmaduro ni en callo embriogénico. En principio, es posible preparar lisados competentes en traducción de cualquier tipo de células y de cualquier organismo. En la práctica, pocos sistemas de lisados han sido estandarizados con éxito (como los ya mencionados) y no en todos se ocupan las mismas metodologías para su obtención. En un sistema como el de callos embriogénicos de maíz, el principal problema sería la gran cantidad de agua contenida en el tejido, además de la presencia de células con grandes vacuolas, por lo que es necesario estandarizar el sistema desde sus bases.

HIPÓTESIS

Es posible obtener un sistema funcional de traducción *in vitro* a partir de lisados celulares de callos embriogénicos de maíz.

OBJETIVO GENERAL

Establecer y estandarizar un sistema funcional de traducción *in vitro* a partir de lisados de callo embriogénico de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❑ Inducir callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros de maíz; subcultivar callos embriogénicos y obtener suspensiones celulares disgregando el tejido.
- ❑ Obtener protoplastos a partir de las suspensiones de callo embriogénico de maíz, evacuolizar los protoplastos y, posteriormente, lisar las células sin comprometer la maquinaria molecular de traducción.
- ❑ Traducir *in vitro* un RNA mensajero que codifica para el gen reportero de luciferasa, para estandarizar las condiciones óptimas del sistema.
- ❑ Generar herramientas moleculares para evaluar la regulación traduccional mediada por miRNAs: Plásmidos que contengan la secuencia de mRNAs blanco de miR528 (MATTE, bHLH, GID-2, SOD1a y PLC), además del gen reportero de luciferasa; plásmido con la secuencia clonada de ZmAGO1c para su expresión en el sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de tejidos

Siembra de maíz.

Se sembraron 3 lotes de maíz de la variedad VS-535 (Tuxpeño) en invernadero. Se utilizaron costales de harina de 20 kg conteniendo alrededor de 15 kg de sustrato Sunshine. Cada lote constó de 12-15 plantas, se sembraron 2 por cada costal.

Se estandarizó un protocolo de ventanas de polinización para asegurar un mayor rendimiento y obtener más embriones inmaduros de maíz. Cada lote se sembró separado uno del otro por una ventana de tiempo cercana a 3 semanas, de esta manera, después de 25 semanas, se pudo contar al mismo tiempo con jilotes y polen, con los que se realizaron polinizaciones entre los lotes. Los jilotes fueron cubiertos con bolsas de papel, para evitar la polinización cruzada no controlada.

Los jilotes se destaparon durante un periodo de 5 días y se promovió la propagación de polen desde las panojas; en el día 4 se realizó el corte de los estigmas de los

jilotes para que en el día 5 se tuvieran estigmas con tricomas nuevos y, finalmente, se realizó una última polinización de modo manual. A partir de este momento se cubrieron las mazorcas y se contabilizaron los días para poder recolectar embriones inmaduros de maíz que tuvieron alrededor de 14-18 días después de la polinización.

Obtención de embrión inmaduro e inducción de callo embriogénico

La inducción de callo embriogénico se llevó a cabo de la manera antes descrita por Lopez-Ruíz *et al.*, 2018.

Se desinfectaron las mazorcas de maíz en una campana de flujo laminar, dividiendo la mazorca en tres partes. Se colocaron los fragmentos en un recipiente donde se agregó etanol al 70% y se agitó durante 1 min. Se retiró el etanol por decantación y se enjuagó con agua desionizada estéril. Posteriormente se adicionó solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex; con 3% de i.a.) al 50% (v/v), mas 2 ml de Tween-20 como surfactante y 5 ml de una solución de plata coloidal comercial (mycrodin). Los segmentos de la mazorca se agitaron suavemente durante 15 min, y después la solución se descartó. Finalmente se enjuagó con abundante agua desionizada estéril varias veces.

Se extrajeron los embriones con ayuda de un bisturí y una pinza. Los embriones se colocaron en una caja petri, adicionada con agua desionizada y cefotaxima (lo equivalente a 0.1 U de una jeringa de insulina). Con ayuda de una pinza, se sembraron los embriones con el eje embrionario en contacto con el medio de cultivo y el escutelum hacia arriba. En cajas petri conteniendo el medio N6I se sembraron alrededor de 30 embriones. Al final, se envolvieron las cajas Petri con plástico y se incubaron en un cuarto con ambiente controlado a 25 °C bajo condiciones de oscuridad por 3 semanas.

Transcurridas 3 semanas, los callos embriogénicos incipientes cambiaron de color blanco a amarillo, pequeñas piezas de callos embriogénicos se seleccionaron para ser subcultivados en medio N6P, se colocaron formando cúmulos en el centro del frasco que contenía medio fresco. Los callos se subcultivaron cada 2 semanas transfiriéndolos a medio N6P fresco. En cada subcultivo se eliminó tejido oxidado y se seleccionaron sólo las partes de callo amarillos o blancos (callo sano).

- Composición de medios de cultivo.

- N6I (medio de iniciación)

El medio de inducción se preparó a partir de soluciones concentradas (100X) de sales N6 (Chu *et al.*, 1975) y mezcla de vitaminas y aminoácidos (cocktail 20) (Loza-Rubio *et al.*, 2008), más 2 mg/l de 2, ácido 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, y caseína hidrolizada 200 mg/L. Se agregó sacarosa al 3% y Gelzan™ (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L. Se ajustó el pH a 5.7 antes de agregar el Gelzan con ayuda de NaOH 1 N o HCl según fuera necesario. Se esterilizó el medio y después se dejó enfriar para colocarlo en cajas Petri en condiciones estériles, que se dejaron solidificar para almacenar a 4 °C hasta su uso.

- N6P (medio de proliferación).

El medio de proliferación se preparó a partir de soluciones concentradas (100X) de sales N6 (Chu *et al.*, 1975) y mezcla de vitaminas y aminoácidos (cocktail 20; Loza-Rubio *et al.*, 2008), más 2 mg/L de 2, ácido 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), 0.3 mg/mL de 6-Furfurilaminopurina (BA), adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L y caseína hidrolizada 200 mg/L. Se agregaron sacarosa al 3% y Gelzan™ (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L. Se ajustó el pH a 5.7 antes de agregar Gelzan. Se vació el medio en frascos de alimento infantil vertiendo 30 mL y se cubrieron con una tapa de polipropileno. Se esterilizaron a 120 °C por 18 min. Se dejó solidificar el medio y los frascos se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Obtención de protoplastos de callo embriogénico de maíz.

Establecimiento del cultivo madre

Los cultivos madre se establecieron colocando 8 g de callo embriogénico en matraces de 250 mL conteniendo 60 mL de medio N6P líquido. Los matraces se dejaron en agitación continua (100 rpm), a 25 °C y en oscuridad durante una semana. Pasado este tiempo, el callo se disgregó de manera mecánica con ayuda de un dispersor celular (Cell Disociation Sieve-tissue Grinder kit, Sigma Aldrich, N° de catálogo CD1-1KT), se pasó el callo por una malla con apertura de 50 (280 µm). Se procuró que todo el callo se disgregara agregando un poco más de medio, lo suficiente para recuperar los restos de callo que se quedaron adheridos a la malla.

La suspensión se colocó en otro matraz de 250 mL, colocando 30 mL de suspensión y 30 mL de medio fresco. Cada 2 semanas se adicionó a los cultivos celulares medio líquido N6P fresco (alrededor de 30 mL), manteniendo un volumen de alrededor de 60 a 75 mL. Los excedentes se colocaron en nuevos matraces de 250 mL.

Digestión de la pared celular

Para llevar a cabo la digestión de la pared celular, las suspensiones celulares se subcultivaron 5 días antes de realizar el protocolo para la obtención de protoplastos. Se determinó la densidad celular de las suspensiones celulares mediante gravimetría (generalmente se encontraba en un intervalo de 9-10 mg/mL); 1 mL de la suspensión se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, previamente pesado, y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el peso del precipitado se determinó por diferencia de peso, esta determinación se hizo por triplicado. Se determinó el volumen necesario para obtener 1.0 g de células de callo (por lo general de 100 a 120 mL de medio) y se colocó en tubos Falcon de 50 mL (4 tubos con 25-30 mL cada uno) y se centrifugó a 2000 rpm por 8 min. Se eliminó gran parte del sobrenadante, lo suficiente para que al colectar los precipitados en un solo tubo quedara un volumen final de medio de 7.5 mL conteniendo el gramo de células inicial. Se pesó la cantidad necesaria de Celulasa (Cellulase "Onozuka" R-10, Yakult Pharmaceutical Industry) y Macerozima (Macerozyme R-10, Yakult Pharmaceutical Industry) para obtener una solución con una concentración final de 1.35% y 0.5% respectivamente en un volumen de 12.5 mL. Las enzimas se disolvieron previamente en 5 mL de agua destilada estéril que se llevaron a un volumen final de 12.5 mL con medio CPW 13 M, posteriormente se esterilizó con un filtro de jeringa de 0.45 μm (MILLEX-HP, N° de catálogo SLHP033RS) y se depositaron en un matraz de 50 mL con los 7.5 mL de medio con células. Esta reacción de digestión de la pared celular se incubó durante 13h a 30 °C y 40 rpm. Terminado este tiempo, la reacción se filtró por una malla de nylon de 60 μm (Merck, N° de catálogo NY6000010) y el filtrado se centrifugó a 1000xg durante 6 min. Se tomó el sobrenadante y se volvió a centrifugar, este procedimiento

se efectuó dos veces. Finalmente, los protoplastos se tomaron de la interfase más cercano al botón.

- Medio CPW 13 M.

El medio CPW 13 M estuvo compuesto por: KH_2PO_4 27.2 mg/L, KNO_3 101 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1480 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246 mg/L; KI 0.16 mg/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L. Se agregó Manitol para un concentración final de 13 mg/mL y se ajustó el pH a 5.8 con KOH 0.1 N (Power, 1989).

Obtención de lisado celular de callo embriogénico de maíz.

La remoción de vacuolas se llevó a cabo inmediatamente después de obtener los protoplastos con base el protocolo establecido en Buntru *et al.*, 2014, que consta de una centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll elaborado de la siguiente manera: 1.5 mL de Percoll al 70% (v/v), 2.5 mL al 40% (v/v), 1.5 mL al 30% (v/v), 1.5 mL al 15% (v/v) y 1.5 mL al 0% (v/v). Este gradiente se realizó en tubos de teflón Beckman de 13.5 mL, sobre los cuales se marcó cada interfase del gradiente. De inmediato se colocaron 2 mL del medio que contenía los protoplastos en la parte superior del gradiente, se ajustaron por peso y se centrifugó a 8700 rpm por 1 h en un rotor SW40 pre-enfriado por 24 h a 4 °C.

Los protoplastos sin vacuolas se recuperaron de la interfase 40-70% y se resuspendieron en 1 volumen de amortiguador TR. Una vez resuspendidos en el buffer TR, se goteó en nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo fino que se depositó en un tubo Falcon de 50 ml. Una vez descongelado el lisado, los núcleos y células no lisadas fueron removidos por centrifugación de 10 min a 500 $\times g$ a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y éste fue suplementado con 0.5 mM de CaCl_2 (concentración final) y tratado con 75 U/mL de nucleasa S7 por 15 min a TA en agitación lenta. Posteriormente el extracto fue suplementado con el volumen necesario de EGTA para una concentración final de 2 mM, el cual se utilizó como agente quelante para los iones Ca^{2+} e inactivar la nucleasa. El extracto se homogenizó durante 5 min en un agitador rotatorio programable, con agitación lenta a TA. El lisado se separó en alícuotas de 100 μL , a las cuales se les midió la

absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro, con una dilución 1:500. Se seleccionaron las fracciones con una absorbancia original entre 10-15 y se almacenaron a -70° C

- Solución para dilución de Percoll

0.7 M manitol (PM: 182.172 g/mol); 20 mM MgCl₂ (PM: 95.21 g/mol); 5 mM Pipes-KOH (pH 7.4). (PM: 302.37 g/mol).

- Amortiguador TR

30 mM Hepes-KOH, pH7.4; 80 mM acetato de potasio; 0.5 mM acetato de magnesio; 2 mM DTT; 1 tableta/ 10 ml de Complete Mini protease inhibitor mixture (Roche).

Caracterización y obtención del mensajero Fluc para ensayos de traducción *in vitro*.

El plásmido utilizado fue pBluescript SK +/- que tiene insertada la secuencia de la luciferasa de luciérnaga (Fluc), seguida de un sitio múltiple de clonación y una secuencia de nucleótidos de 71 timinas, que correspondería a la cola de poli(A) en el mRNA. El transcrito tiene características Kozak (purina en -3 y G en +4) (Anexo 1).

Obtención de plásmido

A partir de las colonias en la placa LB, se tomó una asada y se dejó crecer en tubos de cultivo con 5 mL de medio líquido LB/ampicilina (100 µg/mL). Se dejó crecer toda la noche o un máximo de 16 h.

Purificación del plásmido.

Se creció la bacteria que contenía el plásmido en 25 mL de medio LB y se incubó a 37 °C toda la noche. El medio inoculado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 5 mL de NaCl 10 mM. Se volvió a centrifugar 2 min a la misma velocidad. El botón se resuspendió en 0.6 mL de amortiguador de lisis y se incubó durante 20 min en hielo. Transcurrido este

tiempo se agregaron 1.2 mL de una solución 0.2 M NaOH y 1% SDS; se mezcló suavemente y se incubó por 10 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 0.15 mL de acetato de sodio 3 M. Se mezcló suavemente y se incubó 10 min en hielo. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 7000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 5 µL de RNasa A (1 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37 °C. Se extrajo con igual volumen de fenol:cloroformo. Se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min y la fase superior se pasó a un tubo diferente, donde se repitió el paso de la extracción con fenol:cloroformo. La parte superior se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se centrifugó a 8500 rpm durante 10 min. El precipitado se lavó con etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 8500 rpm durante 10 min. El botón se resuspendió en 168 µL de agua. Se añadieron 32 µL de NaCl 5 M, se mezcló bien y se agregaron 200 µL de PEG8000 al 13%, se mezcló bien y se incubó a -20° C toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y se removió el sobrenadante. El botón se lavó con EtOH 70% y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió en 50 µL de H₂O, se cuantificó y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa a 80 V por 60 min.

- Amortiguador de lisis:

Tris 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0; Sacarosa 15%; Lisozima 2 mg/mL

Restricción / Linearización del plásmido

A partir de 4 µg de DNA plasmídico, se realizó el ensayo de restricción con 2µL (10 u/µL) de la enzima XhoI de Fermentas en un volumen final de 40 µL.

Gel de agarosa

Los geles utilizados fueron realizados al 1.0% p/v en amortiguador TBE 0.5X, con bromuro de etidio (10 mg/ml). Las muestras se prepararon adicionando amortiguador de carga de BioLabs, *Gel loading Dye Purple 6X* (no. de cat. B7024S). El marcador de peso molecular fue el *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* de Thermo Scientific (no. cat SM0311). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V por 60 min.

Purificación con fenol cloroformo.

A un volumen de 200 μL del plásmido digerido (20 μg) se le agregaron 300 μL de H_2O tratada con DEPC. Se le agregó un volumen de Fenol:Cloroformo. Se mezcló en vortex durante 1 min y se centrifugó durante 5 min a 80000 rpm. La fase acuosa se colocó en otro tubo y se agregó un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico. Se mezcló en vortex durante 15 min y se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm. La fase acuosa se trasladó a otro tubo y se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante 1 h a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm. El precipitado se lavó con etanol al 70%. Se dejó secar el botón durante 5 min y se resuspendió en 15 μL de H_2O tratada con DEPC.

Obtención del mRNA reportero por transcripción *in vitro*.

La síntesis de mRNA se llevó a cabo con el kit *mMessage machine* T3 de Ambion, life technologies (no. de cat. AM1348). Se utilizó el equivalente a 1 μg de plásmido linealizado para llevar a cabo la reacción, la cual se realizó de acuerdo a las especificaciones del kit.

Para una reacción de 20 μL

2X NTP/CAP	10 μL
10X Buffer	2 μL
RNAPol T3	2 μL
DNA 1 μg	-
Agua	Llevar a 20 μL

Los componentes fueron incorporados y mezclados suavemente por pipeteo. La reacción se incubó por 2 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se adicionaron 0.5 μL de *TURBO DNase* (20 U/ μL ; incluida en el kit) que permite remover el molde de DNA. Se incubó durante 15 min a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Posteriormente se llevó a cabo una precipitación con cloruro de litio. Se agregaron

30 μ L de LiCl y 30 μ L de H₂O tratada con DEPC. Se mezcló bien y se incubó a -20 °C durante 1 h. Se centrifugó a 120000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo, se removió el etanol, se dejó secar y se resuspendió en 10 μ L de H₂O tratada con DEPC.

Ensayos de traducción *in vitro*.

1. Para lisados de callo embriogénico

Premix (1 Reacción)

Extracto	5 μ L
6xAA	1.65 μ L
CPK 10 mg/mL	0.5 μ L
RNAsin 40u/ μ L	0.25 μ L
Espermina 0.9 mM	0.6 μ L

Reacción

Premix	8 μ L
RNA	40-50 ng
H ₂ O cbp	10 μ L

Las reacciones se incubaron por 60 min a 25 °C en un termociclador. Para la cuantificación de luciferasa se tomó el volumen total de la reacción y se depositó en una placa de Elisa, a la que se le agregaron 50 μ L de sustrato de luciferasa (Promega, no. Cat E152A) y se colocó en el dispositivo Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, de Thermo Fisher, para detectar luminiscencia.

6xAA cocktail

ATP 4.5 mM
GTP 0.6 mM
KOA₂ 720 mM
MgOA₂ 9 mM

Creatin Fosfato (CP) 150 mM

DTT 10.2 mM

Mix de aminoácidos (AA) 0.24 mM

2. Para extracto de germen de trigo (Wheat Germ Extract; Promega L4380)

Se siguieron las instrucciones establecidas, incubando las reacciones a 25 °C durante 60 min. Posteriormente se agregaron 10 µL de 1X *Passive lysis buffer* (Promega). Para la cuantificación de luciferasa, se depositaron cuidadosamente 10 µL de la reacción dentro de la placa de Elisa y posteriormente se añadieron 50 µL de sustrato de luciferasa (Promega, no. cat E152A). Se colocó en el dispositivo Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, de Thermo Fisher, para detectar luminiscencia.

Cada reacción con WGE consistió en los siguientes componentes:

H ₂ O DEPC	3.1 µL
aa-Leu 1 mM	0.5 µL
aa-Met 1 mM	0.5 µL
KAc 1 M	0.4 µL
RNasin 40 u/µL	0.1 µL
mRNA ~50 ng/µL	1 µL
WGE	6.4 µL

RESULTADOS

Obtención del tejido de maíz, callos embriogénicos y suspensiones celulares.

Se realizó la siembra de 3 lotes de plantas de maíz de acuerdo con el protocolo de ventanas de polinización estandarizado en el laboratorio. En el primer lote se obtuvo un rendimiento de granos de maíz muy bajo, por lo que fue difícil obtener embriones de estas mazorcas (Figura 10). Dentro de los posibles factores que influyeron en este resultado se encuentran, en primer lugar, que el polen fue recolectado de las anteras y la polinización se realizó dos horas después; además, que al polinizar se recortaron los estigmas, y que la polinización se realizó únicamente de manera manual con pincel. Se ha reportado que los granos de polen de maíz pierden viabilidad en un 80% dentro de la primera hora luego de su salida de las anteras, y pierden viabilidad en su totalidad luego de dos horas (Luna *et al.*, 2001), por lo que haberlos almacenado probablemente afectó la viabilidad del polen utilizado; de igual manera, el recortar los estigmas de las mazorcas antes del esparcimiento del polen disminuye la efectividad del proceso, debido a que se remueven tricomas necesarios para la captación del grano de polen. En los dos lotes subsiguientes se empleó la metodología previamente descrita y se obtuvieron mejores rendimientos (Figura 10).



Figura 10. Mejoramiento del proceso de polinización de mazorcas de maíz. Se observó un incremento en el número de granos obtenidos al implementar el proceso de polinización por una ventana de 5 días. p1: polinización lote 1. p2: polinización lote 2. p3: polinización lote 3 .

Con los embriones recolectados, el siguiente paso fue el de inducción de callos embriogénicos. Se observó que muchos de los embriones obtenidos fueron de distintos tamaños (Figura 11 A), lo cual era de esperarse, debido a que al utilizar ventanas de polinización los granos no se polinizan de manera uniforme. Agrupando a los diferentes embriones obtenidos de acuerdo con su tamaño, se caracterizó el tamaño ideal para que la embriogénesis fuera eficiente, éste correspondía a un intervalo de edad de 15-18 días después de la polinización, explante ideal para inducir el proceso de embriogénesis somática. Una vez colectados los embriones inmaduros del tamaño deseado (4 mm), se llevó a cabo la inducción de callo en medio N6l.

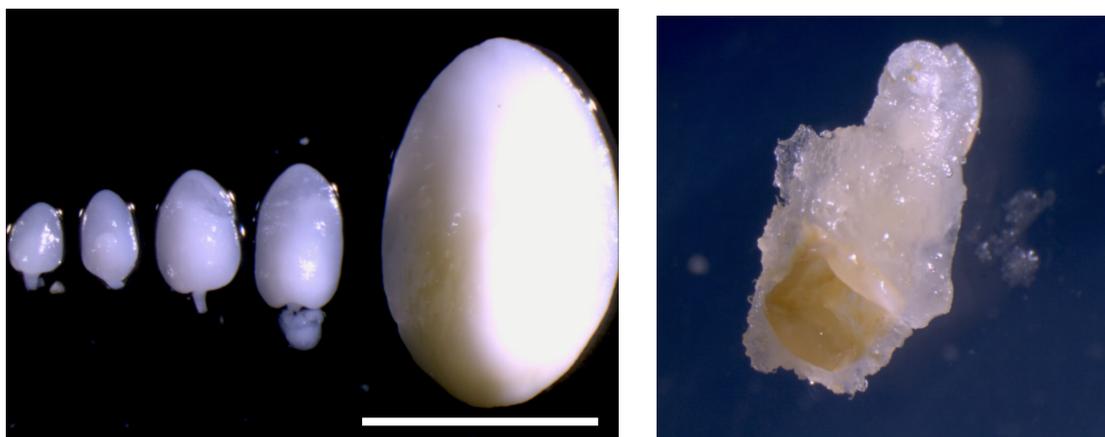


Figura 11. Inducción de embriones inmaduros y proliferación para obtener callos embriogénicos. (A) Embriones de distintos tamaños observados durante el proceso de inducción, donde el señalado corresponde al tamaño aproximado del crecimiento (4 mm) de 15 días después de la polinización (ddp). (B) Embrión de 15 ddp después de 14 días en medio N6I.

En la figura 11B se puede observar un callo 14 días después de la inducción, obtenido a partir de los embriones del tamaño caracterizado. En él se observa un crecimiento del tejido tipo callo embriogénico. Este tipo de callos son los que se utilizaron para llevar a cabo la suspensión celular debido a su alta tasa de proliferación, su color y a su bajo nivel de oxidación.

Una vez obtenida la cantidad suficiente de tejido (8 g), se continuó con el establecimiento de cultivos madre, en el que se disgregó el callo en el medio N6P líquido. Una vez obtenidas las suspensiones celulares (Figura 12), éstas se mantuvieron en agitación constante, se subcultivaron cada dos semanas y se proliferaron cuando fue necesario. Normalmente la densidad celular de las suspensiones estuvo en un intervalo de 9-10 mg/mL, la cual era suficiente para llevar a cabo los siguientes pasos de la metodología.



Figura 12. Suspensiones celulares de callo embriogénico de maíz. Se observan 3 suspensiones luego de ser subcultivadas.

Obtención de lisados de callo embriogénico de maíz.

Para llevar a cabo el lisado de callo embriogénico, el primer paso de la metodología consistió en obtener protoplastos, debido a que era necesario remover la pared celular para llevar a cabo la lisis celular. La obtención de protoplastos se intentó probando distintas metodologías reportadas en la literatura para maíz (Morocz *et al.*, 1990; Chourey y Zurawski, 1981; Imbrie-Milligan *et al.*, 1986; Kamo *et al.*, 1987), éstas diferían en el tipo de enzimas utilizadas, el tiempo de digestión, el uso de agitación, además de distintos medios. Las condiciones que dieron los mejores resultados en el modelo de estudio fueron utilizando únicamente las enzimas celulasa y macerozima, disueltas en medio CPW M13. La primera condición en la que se pudo obtener una cantidad de protoplastos óptima para el sistema fue con 8 h de reacción y concentraciones de 2.0% de celulasa y 1.0% de macerozima. A pesar de que la cantidad de protoplastos que se obtuvo fue suficiente, era complicado efectuar los siguientes pasos de la metodología, dado que se tienen que llevar a cabo de manera ininterrumpida. Por esa razón, a partir de las condiciones ya estandarizadas, se prolongó el tiempo de la reacción, disminuyendo la concentración de enzimas. Se estandarizaron las condiciones para un tiempo de 13 horas, para poder dejar la reacción en la noche y llevar a cabo los pasos posteriores

al día siguiente. Las concentraciones finales utilizadas de celulasa y macerozima fueron 1.35% y 0.5% respectivamente. Cabe señalar que se observó que la concentración de enzimas necesarias para llevar a cabo la digestión de la pared celular no fue proporcional al tiempo.

Una vez realizada la reacción de digestión de pared celular, los protoplastos se concentraron mediante centrifugación. Varios reportes indicaban que al centrifugar los protoplastos se podían obtener en las partes superiores del medio (Morocz *et al.*, 1990; Chourey y Zurawski, 1981; Imbrie-Milligan *et al.*, 1986; Kamo *et al.*, 1987); sin embargo, en los ensayos realizados se observó que éstos se concentraban preferencialmente en la interfase formada entre sobrenadante y precipitado después de la centrifugación. Es importante llevar a cabo los lavados por centrifugación desechando los precipitados. La mayor concentración de protoplastos se obtuvo al centrifugar 3 veces el medio. De esta manera se eliminaron residuos o algún otro componente no deseado. Se deben tomar los protoplastos cercanos a la interfase que se forma entre el precipitado y el medio.

En la figura 13A se muestran los protoplastos obtenidos por la técnica descrita observados al microscopio óptico (40X). Como se puede apreciar, estos representan estructuras esféricas refringentes, uno de los indicadores de que existió una digestión adecuada de pared celular (Navrátilová, 2004). Había en promedio 15 protoplastos por campo (se visualizaron 10 campos en total).

Una vez confirmada la presencia de protoplastos en la fracción seleccionada, se procedió a la evacuolización de los mismos por medio de un gradiente discontinuo de Percoll. Este gradiente se debe formar al momento de ser utilizado, ya que, si se almacenaba en frío para usarlo al siguiente día, el gradiente no producía una separación óptima de los protoplastos evacuolizados. La remoción de vacuolas es un paso crucial en la obtención de lisados libres de células, ya que estas vacuolas contienen en gran parte enzimas líticas como proteasas y ribonucleasas, las cuales interfieren con el proceso de traducción *in vitro*. Se ha reportado que lisados preparados sin un paso previo de evacuolización muestran muy poca actividad traduccional, esto debido a que el Percoll deshidrata a la vacuola, inactivando así su contenido (Komoda *et al.*, 2004). Para el gradiente de Percoll discontinuo 0-70%, se tomó como referencia el elaborado por Buntru y colaboradores en el 2014

(gradiente discontinuo 0-70%; Figura 14). Previamente se intentó llevar a cabo la evacuolización con un gradiente de Percoll menos amplio, donde sólo se utilizaron concentraciones de 70 y 40% para el gradiente; sin embargo, nunca se observó una buena cantidad de protoplastos evacuolizados. Es probable que los protoplastos sin vacuolas estuvieran presentes en una cantidad similar pero menos concentrados. Al utilizar un gradiente más amplio, probablemente se permitió una mejor distribución de las células sin vacuolas y mayor concentración para visualizarlas. Al coleccionar la fracción presente entre las zonas de 40% y 70% de Percoll, se observaron protoplastos de un menor tamaño (Figura 14B), indicativo de la pérdida deseada de vacuolas, puesto que éstas ocupan la mayor parte del volumen celular. Esto es particularmente característico de callos o suspensiones celulares que se encuentran altamente hidratados (Komoda *et al.*, 2004).

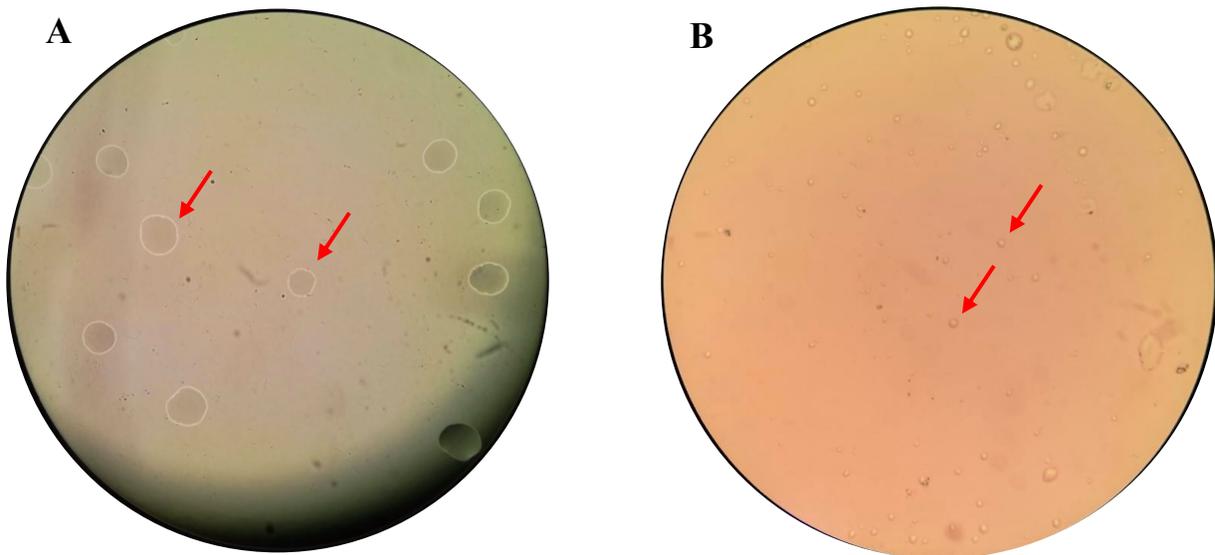


Figura 13.- Observación al microscopio de los protoplastos obtenidos (40X). (A) Protoplastos luego de la reacción de digestión de la pared celular en el cultivo madre. (B) Protoplastos evacuolizados por medio de un gradiente discontinuo de Percoll, se observa una disminución del tamaño original de los mismos.

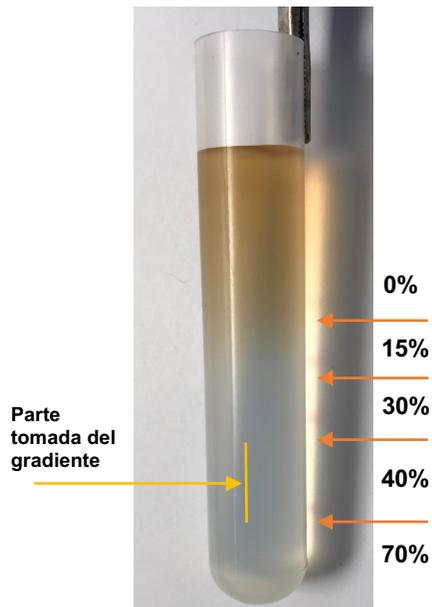


Figura 14.- Formación del gradiente de Percoll luego de someterlo a centrifugación. Se observa la formación de una interfase y durante la recolección de las fracciones se observó la formación de un pellet traslúcido en el fondo del tubo.

Los protoplastos evacuolizados fueron lisados mediante molienda con mortero en nitrógeno líquido para obtener un polvo fino homogenizado que se colectó en un tubo Falcon. Durante la estandarización se utilizaron diferentes metodologías de ruptura celular, como la lisis mecánica utilizando un homogeneizador Dounce y la lisis mediante TyssueLyserII de Quiagen. A pesar de que estas metodologías son eficientes en modelos desprovistos de pared celular como *C. elegans*, fueron poco eficientes para los protoplastos obtenidos a partir de callos embriogénicos de maíz. Asimismo, es probable que la baja temperatura provista por la presencia de nitrógeno impidiera la degradación de componentes necesarios para la traducción (como las subunidades ribosomales).

Una vez colectado el lisado en el tubo, se esperó a que se descongelara en hielo. Se retiraron los núcleos y los residuos celulares por medio de una centrifugación a baja velocidad, para luego realizar una incubación de los lisados con nucleasa S7. Esta nucleasa se utiliza para eliminar el mRNA endógeno presente en las muestras y reducir la traducción de fondo al mínimo (Gursinski *et al.*, 2009). Es importante

mencionar que este paso deja íntegras las subunidades ribosomales 18S y 28S y a los tRNAs, como lo comprobaron Pelham y Jackson, con estudios en sistemas de reticulocito de conejo (Pelham y Jackson, 1976).

Una vez terminado el tratamiento, se adicionó EGTA para inactivar a la nucleasa, se homogenizó y se tomaron tres alícuotas de 2 μ L para medir la absorbancia a 260 nm en una dilución 1:500. A pesar de la homogenización, no todas las fracciones presentaron la misma absorbancia. Asimismo, diferentes alícuotas del lisado presentaron distinta actividad traduccional, siendo las absorbancias con valor entre 10-15 las que producen la mejor actividad, mientras que las que se encontraban por encima o debajo de este intervalo no tenían un funcionamiento óptimo. Se guardaron alícuotas de 100 μ L a -70° C para su uso posterior.

Ensayos de traducción *in vitro* con lisados de callo embriogénico de maíz

Las reacciones se llevaron a cabo con base en el protocolo de traducción *in vitro* establecido por González-Osnaya (2016), el cual fue estandarizado para lisados con *S. pombe*; sin embargo, resultó útil también para maíz. Cada reacción de traducción se llevó a cabo con 5 μ L del lisado, a los cuales se les agregaron todos los componentes necesarios para llevar a cabo la traducción, principalmente aminoácidos y moléculas energéticas (en forma de ATP y GTP). Se empleó el mensajero del transcrito *in vitro* a partir del plásmido Fluc. La actividad de luciferasa se midió en un lector multimodo de luminiscencia. El desarrollo de luminiscencia se realizó lo más rápido posible, comenzando por añadir la reacción de traducción *in vitro* y posteriormente el sustrato de luciferasa. Se realizó la lectura inmediatamente después de cargada la placa. Como se puede observar (Figura 15 y Figura 16), los lisados obtenidos en dos réplicas distintas exhibieron una traducción eficiente, con valores de luminiscencia en el orden de millares. Aunque el lisado comercial de germen de trigo mostró una actividad traduccional superior al lisado obtenido de callos embriogénicos de maíz por el método desarrollado en este trabajo, los resultados fueron satisfactorios para iniciar los ensayos de regulación traduccional por miRNAs de interés.

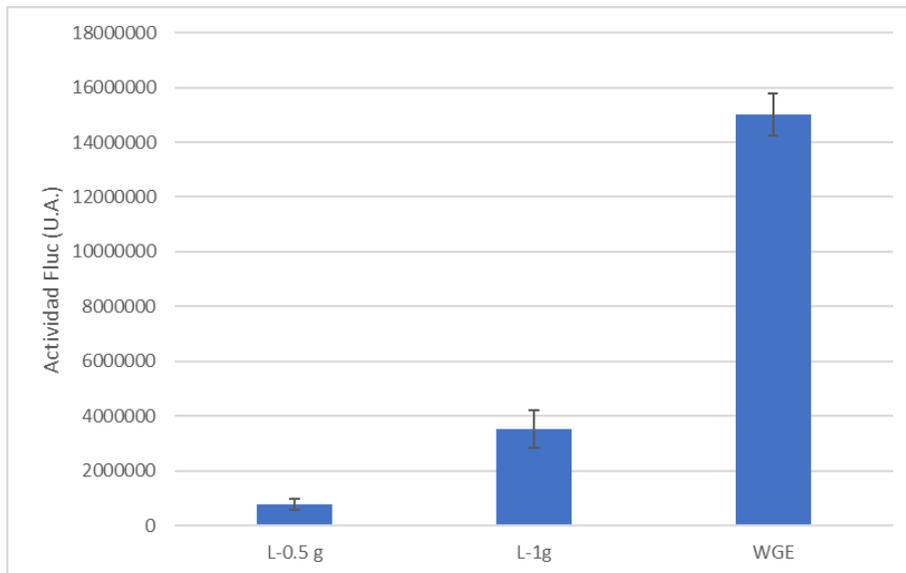


Figura 15.- Actividad de luciferasa obtenida de traducción *in vitro* en lisados de callo embriogénico de maíz con distinta densidad celular en suspensión, primera réplica. Se muestran los valores de luminiscencia de 10 μ L de reacción de traducción y se comparan contra los obtenidos con el kit comercial. A cada reacción se le restó la actividad del control negativo. **L-0.5 g**: Lisado obtenido a partir de 0.5 g de callo iniciales. **L-1.0 g**: Lisado obtenido a partir de 1.0 g de callo inicial. **WGE**: Wheat germ extract.

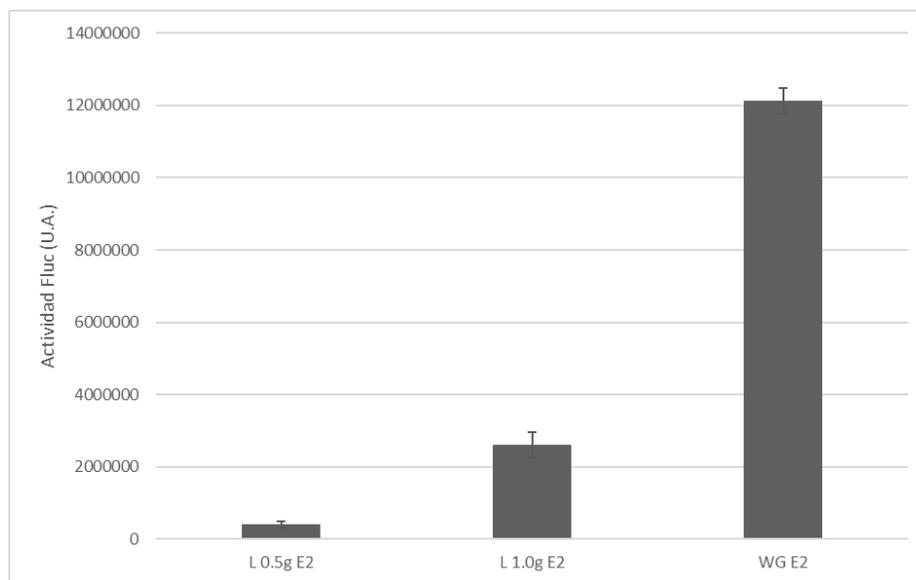


Figura 16.- Actividad de luciferasa obtenida de traducción *in vitro* en lisados de callo embriogénico de maíz con distinta densidad celular en suspensión, segunda réplica. Se muestran los valores de luminiscencia de 10 μ L de reacción de traducción y se comparan

contra los obtenidos con el kit comercial. A cada reacción se le restó la actividad del control negativo. **L-0.5 g E2**: Lisado obtenido a partir de 0.5 g de callo iniciales en la segunda extracción. **L-1.0 g E2**: Lisado obtenido a partir de 1.0g de callo inicial en la segunda extracción. **WGE**: Wheat germ extract.

Estandarización de las condiciones óptimas del sistema de traducción *in vitro*.

Para asegurar una traducción en las condiciones óptimas del sistema de lisados de callos embriogénicos de maíz, la reacción se llevó a cabo cambiando 3 parámetros importantes para la completa estandarización del sistema (González-Osnaya, 2016): temperatura, concentración de magnesio y concentración de potasio.

Primero se realizaron 3 experimentos independientes a 5 diferentes temperaturas (20, 22, 25, 28 y 30° C; Figura 17). Se observó que la temperatura óptima para la reacción fue de 25°C, dado que se obtenía la mejor actividad de luciferasa.

Posteriormente, se realizaron 3 experimentos independientes con 5 concentraciones distintas de $Mg(CH_3COO)_2$, tomando como concentración inicial la utilizada originalmente en el protocolo (1.66 mM) y disminuyendo y aumentando esta concentración en un 25% y 50% (Figura 18). Se puede observar que en la concentración original del protocolo es donde se obtiene la mayor actividad de luciferasa, por lo que se considera la concentración óptima para el protocolo con callo embriogénico de maíz; sin embargo, podrían probarse cambios de concentración más sutiles (menores al 25%) y ver si existe una mejora en la actividad.

Finalmente se realizó lo mismo para la concentración de acetato de potasio, partiendo de la concentración utilizada originalmente (132 mM) se disminuyó y aumentó ésta en 25% y 50% (Figura 19). Se observó que la actividad de luciferasa disminuía cuando se aumentaba o disminuía esta concentración.

Cabe señalar que las alícuotas del sistema de traducción *in vitro* con los callos embriogénicos utilizadas para estas reacciones tenían alrededor de 3 meses de almacenamiento a -70° C, aunque no habían sido previamente descongeladas. Esto pudo contribuir a la disminución en la actividad de luciferasa observada, que fue cercana al 60%. Sería importante determinar por cuánto tiempo los lisados se

mantiene funcionales y explorar la posibilidad de estabilización. Existen protocolos que reportan el uso de glicerol como estabilizante para lisados celulares; por ejemplo, en lisados de células Hela (aptos para transcripción y splicing) se puede utilizar glicerol al 20% (Abmayr *et al.*, 2001). A pesar de que ninguno de los sistemas revisados estandarizados en células de planta utiliza un estabilizante para almacenar los lisados, el glicerol podría ser una opción para resolver la pérdida de actividad. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, las alícuotas pueden presentar absorbancias diferentes, lo que igualmente pudo contribuir a las diferencias en luminiscencia. En este caso, las diferentes absorbancias en las alícuotas podrían deberse a que no existe una correcta homogenización después de haber tratado el lisado con la nucleasa e incorporar el EGTA. Se intentó resolver este problema prolongando el tiempo de agitación, que empezó en 5 min y llegó a ser de 15 min; no obstante, se observó el mismo resultado. Sería importante lograr tener una homogenización óptima para que las alícuotas presenten la misma absorbancia. Se podría intentar prolongar aún más el tiempo de agitación, llevar a cabo una agitación más vigorosa o un paso de centrifugación que podría ayudar a eliminar algún componente que esté interfiriendo a este nivel.

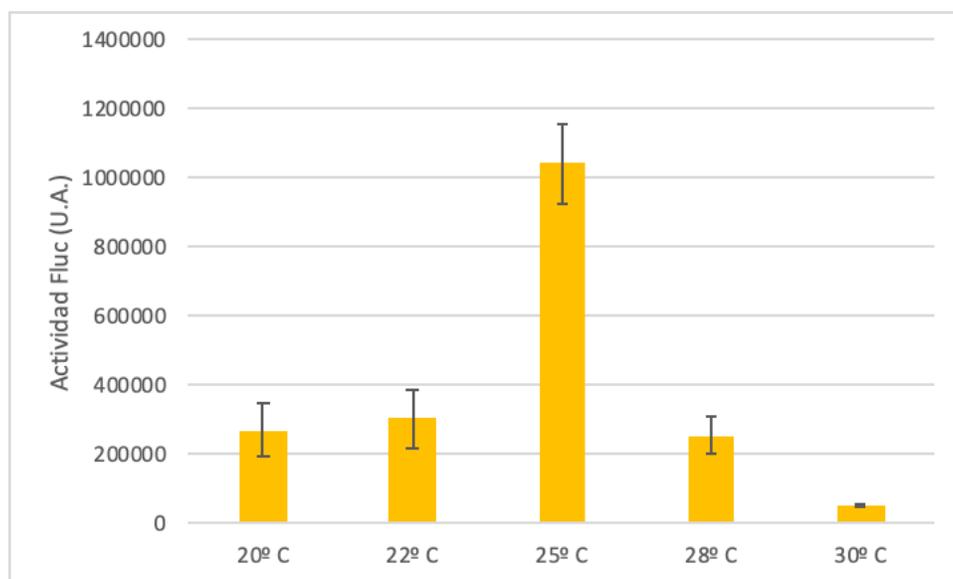


Figura 17. Efecto de la temperatura en la actividad de lisados de callo embriogénico de maíz. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, *U.A.*) es

determinada en respuesta a diferentes temperaturas de reacción. Se mantuvieron constantes las concentraciones de Mg^{2+} (1.66 mM) y K^+ (132 mM).

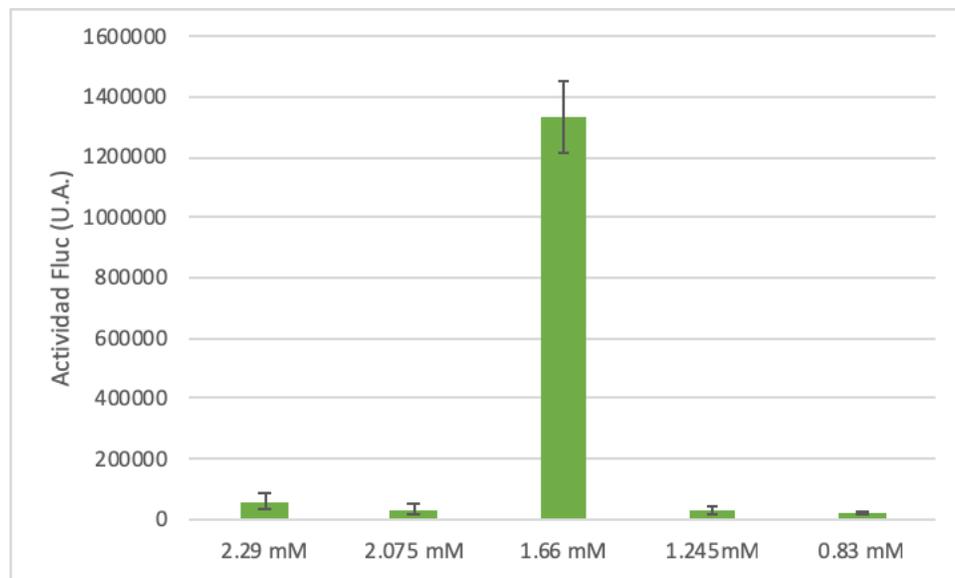


Figura 18. Efecto del magnesio en la actividad de lisados de callo embriogénico de maíz. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, *U.A.*) es determinada en respuesta a diferentes concentraciones de Mg^{2+} . Se mantuvieron constantes la concentración de K^+ (132 mM) y la temperatura (25 °C).

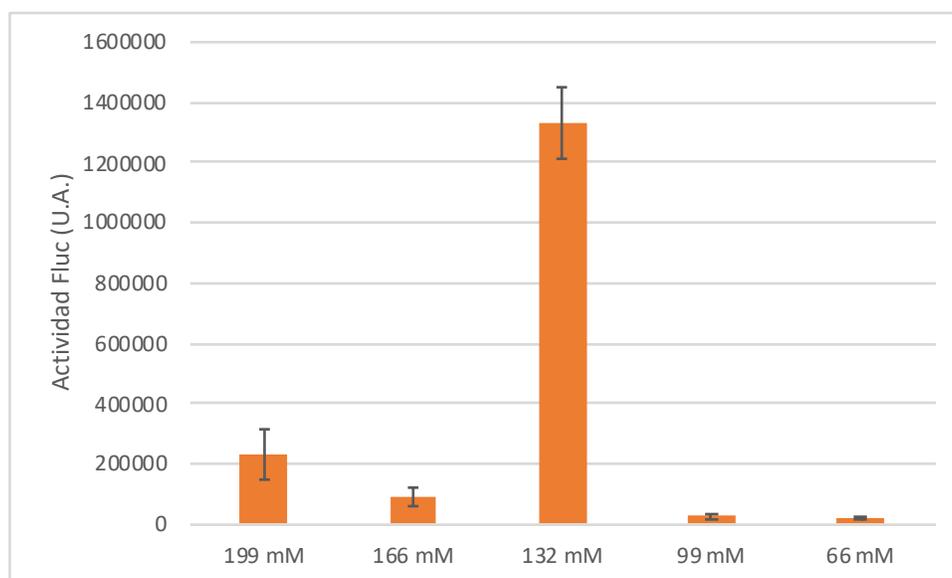


Figura 19. Efecto del potasio en la actividad de lisados de callo embriogénico de maíz. La eficiencia en la traducción de luciferasa (en unidades arbitrarias, *U.A.*) es determinada

en respuesta a diferentes concentraciones de K^+ . Se mantuvieron constantes la concentración de Mg^{2+} (1.66 mM) y la temperatura (25 °C).

Protocolo estandarizado para la obtención de lisados celulares de callo embriogénico de maíz.

En resumen, el protocolo desarrollado fue establecido mediante la estandarización de distintos pasos (Figura 20), todos ellos indispensables para el funcionamiento del sistema. Al momento de realizar el protocolo es importante considerar el tiempo que se necesita para obtener los lisados, ya que el protocolo tarda 7 días (cuando el cultivo madre ya está establecido): 5 del subcultivo y propagación, 2 para la digestión de la pared celular, la evacuolización y lisis celular.

En la obtención de protoplastos es importante hacer los lavados necesarios, al centrifugar desechar los botones formados y al final tomar los protoplastos de la interfase que se forma entre el precipitado y el medio.

Para la evacuolización el gradiente se debe formar al momento de su uso. Al hacer el gradiente, marcar en el tubo con el final de cada una de las concentraciones es útil en el momento en el que se debe recuperar la interfase de interés. Esta interfase se debe recuperar con micropipeta, desechando primero las interfases superiores sin perturbar el gradiente.

Es importante que la molienda con nitrógeno líquido se lleve a cabo vigorosamente y lo más rápido posible. Se obtienen mejores resultados si al moler se coloca una cantidad moderada de la solución con protoplastos evacuolizados.

Finalmente, cuando se llevan a cabo los ensayos de traducción *in vitro*, es importante medir la absorbancia de la alícuota del lisado que se va a utilizar para garantizar que la reacción se llevará a cabo de manera óptima.

Figura 20. Diagrama de flujo del protocolo estandarizado para la obtención de lisados celulares de callo embriogénico de maíz.

Herramientas para evaluar la regulación traduccional por miRNAs

Adicionalmente a la estandarización del lisado para traducción *in vitro*, este trabajo inició la obtención de dos componentes necesarios para que el sistema pueda utilizarse para evaluar la regulación traduccional por miRNAs. Estos fueron la obtención de un vector de expresión para AGO1c de maíz y la clonación de regiones diana para miR528 en un gen reportero de luciferasa, a partir de diferentes mRNAs celulares regulados por este miRNA durante la embriogénesis somática de maíz.

Clonación de ZmAGO1c.

En el laboratorio se ha sugerido la presencia de la proteína AGO1c en los callos embriogénicos de maíz (Juárez-González, 2015), por lo que se esperaría que estuviera involucrada en el cargado de miRNAs endógenos para formar miRISCs activos. Es por ello que es necesario co-expresar ZmAGO1c en los lisados para evaluar la regulación mediada por microRNAs. Se realizó primero la clonación de ZmAGO1c (GRMZM2G039455_T01) de maíz con oligos apropiados (Tabla 2) a partir de cDNA en un vector de entrada para productos de PCR (pGEM TEasy Vector Systems, Promega; Anexo 2). Para verificar el producto clonado se realizaron digestiones con la enzima EcoRI de plásmidos obtenidos a partir de varias colonias de bacterias transformadas (Figura 21). La digestión con esta enzima liberó un fragmento de alrededor de 3.2 kb del tamaño esperado para ZmAGO1c en todos los plásmidos y otro correspondiente al plásmido pGEM TEasy de 3.015 kb. Por otro lado, se puede observar un fragmento de menor tamaño, que se atribuye a un corte dentro de la secuencia de ZmAGO1c. La identidad de la región clonada fue confirmada por secuenciación. Dado que los oligos diseñados para clonar a ZmAGO1c contienen los sitios de restricción para SgfI y PmeI (Tabla 2), el paso siguiente será transferir ZmAGO1c desde pGEM Teasy a pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector, de Promega (No. de catálogo: L567A; Anexo 3) que cuenta con un enhancer de la traducción, especialmente diseñado para expresar proteínas en sistemas de traducción *in vitro*.

Primer	Secuencia
AGO1c_Left_SgfI	AGCAGCGATCGCCATGCTAGTGCCCATCATGGT
AGO1c_Right_PmeI	TACCGTTTAAACTCAGCAGTAAAACATGACACGC

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la clonación de la región codificante de ZmAGO1c. Estos fueron generados en Primer3Plus (Primer3Plus Version: 2.4.2).

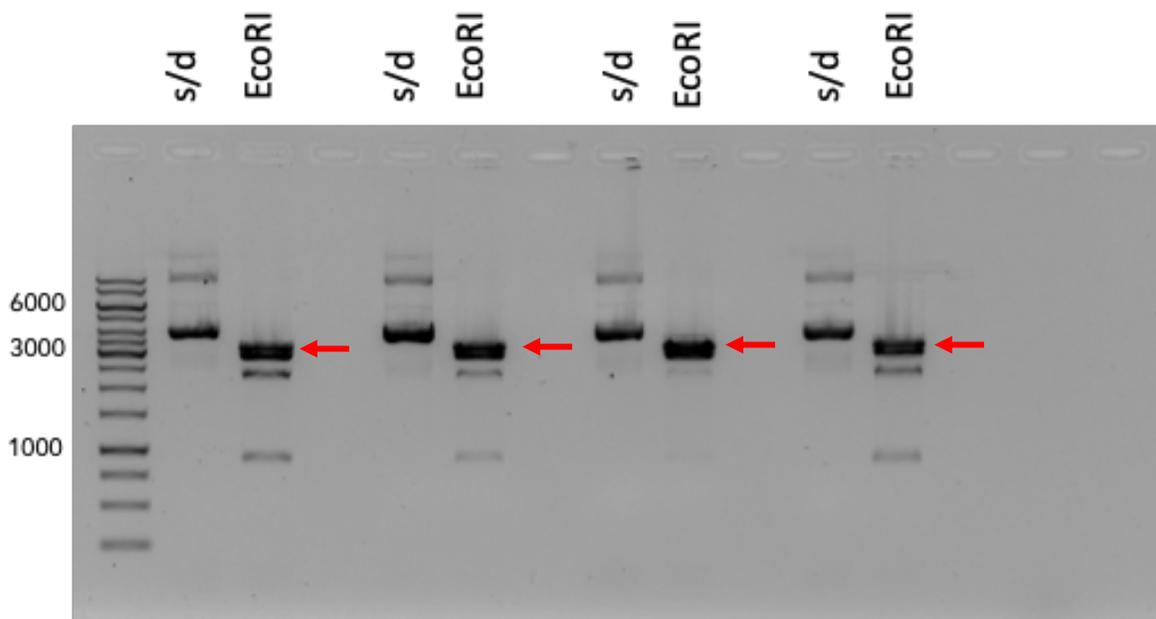


Figura 21. Comprobación de la clonación de ZmAGO1c en pGEM TEasy. Se realizó la digestión con EcoRI en plásmidos aislados a partir de 4 colonias diferentes. La flecha señala el tamaño esperado para la región codificante de ZmAGO1c. s/d: plásmido sin digerir.

Amplificación de regiones a clonar de mensajeros blanco de miR528.

Uno de los pasos clave para evaluar la regulación traduccional por miRNAs en un sistema *in vitro* es contar con reporteros que tienen secuencias complementarias para el miRNA que se desea estudiar. En algunos trabajos se utiliza exclusivamente la secuencia correspondiente al miRNA, en una o varias copias ubicada en la región 3'UTR del reportero (comúnmente luciferasa), mientras otros utilizan la región

3'UTR del mRNA mensajero regulado por el miRNA (Sun & Rossi, 2009). En plantas, debido a que las regiones diana de miRNAs pueden ubicarse en regiones no traducibles o codificantes del mRNA, se ha utilizado la clonación de segmentos que rodean el (los) sitio(s) complementario(s) al miRNA. Con el objetivo de poder evaluar la posible regulación traduccional ejercida por miR528, se eligieron los mRNAs correspondientes a MATTE, bHLH, GID-2, SOD1a y PLC (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Luján-Soto, 2018) y se diseñaron oligos a una distancia de al menos 50 pb a cada lado del sitio diana para miR528 (Figura 22).

Los fragmentos amplificados serán clonados en el plásmido Psi-check-2 de Promega especialmente diseñado para evaluar regulación traduccional por regiones 3'UTR en un sistema de traducción *in vitro* estandarizado (Anexo 4). Se eligió este plásmido porque con él se puede obtener un mRNA dual de luciferasa compuesto por la región codificante de Renilla (hRluc) bajo promotor T7, seguido en su extremo 3' por sitios de clonación para regiones blanco de miRNAs y cola de poli(A) sintética y la región codificante para luciérnaga (hluc+) seguida de poli(A) que será utilizado como control interno para normalizar la actividad de RLuc. Para la clonación en Psi-check-2, a los oligos generados se les agregaron los sitios de restricción para las enzimas XhoI y NotI (Tabla 3).

Target	Localización	No. De Regiones Semilla	Regiones a clonar
MATTE	5' UTR	1	
bHLH	5'UTR - CDC	1	
GID-2	3' UTR	1	
SOD1a	CDC - 3'UTR	1	
PLC	CDC	1	

Figura 22. Localización de la secuencia blanco de miR528 dentro del mensajero blanco de este miRNA. CDC: Región codificante

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y clonación de las regiones blanco de miR528.

Primer	Secuencia	Fragmento Amplificado (pb)
MATTE_left_XhoI MATTE_right_NotI	ATCTCGAGCCCACGACGAGATGCCATAT ATGCGGCCGCGCTGCCAGCGACAAAAG	154
HLH_left_XhoI HLH_right_NotI	ATCTCGAGATCCTAGACGGCTGGCTCAA ATGCGGCCGCGGAGCACATGTAGTAAGCTAGGT	168
GID2_left_XhoI GID2_right_NotI	ATCTCGAGTGGCAGTGATCAGCTGTCTG ATGCGGCCGCGTCCGTAGTACTAATCGACGA	198
SOD1a_left_XhoI SOD1a_right_NotI	ATCTCGAGTCCCAAAGTCCCAAAGGCC ATGCGGCCGCTTCTTAGTGGCGTCCGCG	215
PLC_left_XhoI PLC_right_NotI	ATCTCGAGACTACAAGAACTGCATCGCCA ATGCGGCCGCGAGGGAGAGCAGGGACGTG	307

Las regiones blanco de miR528 se amplificaron a partir de cDNA de dos diferentes tejidos de maíz: plántula y eje embrionario. De esta manera se pudieron obtener los productos de amplificación del tamaño esperado (entre 200 y 300 pb, Figura 23). Estos productos de PCR se purificaron a partir de gel y se clonaron en el vector pGEM-T Easy para facilitar su manipulación y futura inserción al plásmido final psi-check-2.

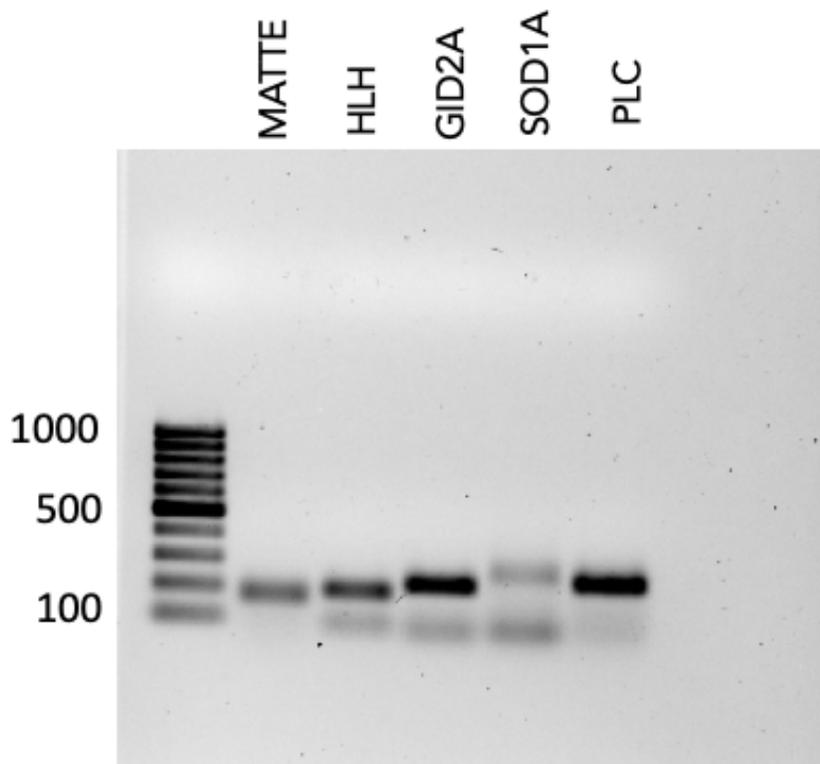


Figura 23. Amplificación mediante PCR de las regiones de blancos de miR528. Se observan bandas de amplificación entre 200 y 300 pb de bases, que corresponden a los regiones que contienen el sitio complementario de miR528 en los blancos propuestos.

DISCUSIÓN

Los sistemas de traducción *in vitro* son una herramienta muy importante en el estudio de mecanismos de control y de la síntesis de proteínas; además, esta área de investigación ha crecido rápidamente, principalmente por su potencial para la producción de proteínas de manera industrial. El principio básico de los sistemas libres de células fue introducido por Eduard Buchner, quien desarrolló un sistema de extracto de levadura para convertir azúcar en etanol y dióxido de carbono (Buchner, 1897). Más de 60 años después, Nirenberg y Matthaei desarrollaron un sistema basado en *Escherichia coli*, para estudiar el proceso de traducción (Matthaei y Nirenberg, 1961). Este sistema fue el que sentó el camino para la gran

cantidad de sistemas libres de células disponibles hoy en día, utilizando diversas líneas celulares, organismos o tejidos (Zemella *et al.*, 2015).

Con el desarrollo de nuevos sistemas libres de células se expanden las posibilidades para el estudio de la traducción (además de otros mecanismos como la transcripción) en especies diferentes a las establecidas como modelo. Al utilizar lisados correspondientes a los organismos de interés (o filogenéticamente cercanos), se puede realizar un estudio muy particular y/o específico. Los lisados intrínsecos de cada organismo proporcionan distintos componentes, como complejos regulatorios o chaperonas, esto ayuda en el estudio de mecanismos traduccionales particulares o no canónicos que pueden ser tejido específico o dados en diferentes estadios de desarrollo, como es el caso de los factores de inicio de la traducción de la familia 4E (Silva y Dinkova, 2010). Adicionalmente, los distintos componentes pueden dar funcionalidad y viabilidad a las proteínas sintetizadas (Zemella *et al.*, 2015).

En plantas existen dos extractos libres de células bien documentados: los de germen de trigo y los de células BY-2 de Tabaco; ambos con distintas ventajas, desventajas y aplicaciones (Tabla 4; Zemella *et al.*, 2015).

Tabla 4. Comparación de los lisados de germen de trigo y células BY-2 (Tomado de Zemella *et al.*, 2015).

System	Advantages	Disadvantages	Applications
Wheat germ extract	<ol style="list-style-type: none"> 1. Highly productive cell-free system, so high yield of complex proteins 2. Systems available for synthesis of disulfide-bridged proteins 3. Correct folding of many protein types, so high solubility of proteins 4. Well-known system 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Laborious and expensive lysate preparation 2. Limited post-translational modifications possible 3. No endogenous membrane structures 4. Low protein yield compare to prokaryotic and wheat germ systems 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Production of malaria proteins to characterize novel vaccine candidates 2. On-chip protein synthesis 3. High-throughput applications 4. Production of monoclonal antibodies against GPCRs 5. Investigation of translational processes (conformation analysis of ribosomes)
Tobacco BY-2 extract	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fast and easy lysate preparation procedure 2. Glycosylation and disulfide-bridge formation are possible 3. Yield comparable to wheat germ extracts 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Limited evaluations of the system are available 2. Contain endogenous amino acids, so difficult to obtain good protein yield 	<p>Novel cell-free system High potential for future applications</p>

Después de varios procedimientos de optimización, incluido el ajuste de las concentraciones de magnesio, potasio y la integración de un sistema adecuado de regeneración de energía (Hunter *et al.*, 1977), el extracto de germen de trigo es el sistema de plantas mejor establecido y comercializado actualmente. Sin embargo, en comparación con el lisado de *E. coli*, el procedimiento de preparación del extracto es más costoso debido a que existe un efecto inhibitorio de las nucleasas y proteasas del endospermo, y se necesitan varias etapas de lavado de embriones de germen de trigo para la eliminación completa de estas enzimas inhibitorias (Madin *et al.*, 2000).

Por otro lado, el sistema basado en células de tabaco BY-2, ha sido establecido durante los últimos 15 años, optimizando también parámetros como la concentración de iones metálicos y también la evacuolización mediante gradientes de Percoll (Komoda *et al.*, 2004; Gursinsky *et al.*, 2009; Buntru *et al.*, 2004). Una de las ventajas de este sistema es que, en contraste con los cuatro o cinco días requeridos para el germen de trigo, el procedimiento para obtener un lisado traduccionalmente activo de células de tabaco toma de cuatro a cinco horas (Zemella *et al.*, 2015).

En este trabajo se prepararon lisados de células de callo embriogénico de maíz con un alto potencial para la síntesis de proteínas; es decir, los experimentos demuestran la habilidad de estos extractos para producir proteínas a partir de mRNA exógeno, en este caso utilizando un sistema reportero de luciferasa. Este protocolo consta de distintos pasos indispensables para el funcionamiento del sistema (Figura 20), que son la obtención de protoplastos a partir de los callos, su evacuolización y el posterior lisado de las células.

Contar con este sistema no convencional representa un avance significativo para el estudio de la embriogénesis somática de maíz. Como se mencionó anteriormente, un sistema obtenido a partir del modelo de estudio permite un análisis más riguroso de la traducción y/o de otros mecanismos, puesto que aporta componentes específicos que frecuentemente no se localizan en sistemas provenientes de organismos diferentes al de interés.

La embriogénesis somática ha adquirido relevancia durante los últimos años debido a que es un fenómeno central en procesos biotecnológicos como la

micropropagación de plantas, que permite regenerarlas a partir de una pequeña cantidad de células o de tejido. Además, ha sido propuesta como la mejor vía de regeneración en la transformación de plantas y como medio para generar plantas con ciclos de vida largos en poco tiempo (Celestino *et al.*, 2005).

La caracterización de elementos regulatorios en el proceso de desdiferenciación celular que ocurre en la embriogénesis somática ha involucrado a distintos mecanismos, dentro de los cuales destaca el mediado por sRNAs, que juega un papel crucial durante la inducción de embriones somáticos en diversas especies (Lin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

Uno de los mecanismos que ha llamado mucho la atención en el estudio de los sRNAs es el mediado por miRNAs. Anteriormente se creía que los miRNAs en plantas, al ser perfectamente o casi perfectamente complementarios con sus blancos, realizaban el silenciamiento únicamente mediante el corte realizado por las proteínas AGO; sin embargo, actualmente hay una gran cantidad de reportes que demuestran que los miRNAs pueden disminuir la producción de proteína sin afectar la acumulación de su mRNA blanco, lo que sugiere que los miRNAs pueden inducir la inhibición traduccional además del corte (Iwakawa & Tomari, 2015).

Los sistemas libres de células han mostrado ser una herramienta invaluable para el estudio de los mecanismos moleculares del silenciamiento mediado por RNA (Liu y Paroo, 2010). Muchos aspectos del silenciamiento por RNA en plantas han sido recapitulados en lisados derivados de cultivos celulares de inflorescencias de *Arabidopsis*, así como de germen de trigo (Tang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2005).

Recientemente se desarrolló un sistema libre de células para el estudio del ensamblaje del complejo RISC, utilizando protoplastos evacuolizados de tabaco (Iki *et al.*, 2010). En este sistema, proteínas AGO traducidas *in vitro* pueden ser programadas con dúplex sintéticos de miRNAs para producir RISCs con la combinación deseada de una proteína AGO y la secuencia guía de miRNA (Iki *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2013). Usando este sistema, el mecanismo de represión traduccional mediado por miRNA fue estudiado *in vitro* (Iwakawa y Tomari, 2013).

Estos resultados demostraron que el RISC formado por AtAGO1 tiene la habilidad de inhibir el inicio de la traducción sin inducir la deadenilación ni la degradación del mRNA; que cuando se une a la región 5'UTR o a un ORF, la mutante catalítica de

AtAGO1 puede bloquear el reclutamiento o el movimiento de los ribosomas; y que el RISC de AtAGO1 requiere un apareamiento de bases más extenso con el sitio blanco para el reconocimiento y la represión traduccional comparado con el RISC de animales (Iwakawa y Tomari, 2013).

Estas observaciones implican que los miRNAs de plantas pueden inducir la represión traduccional, pero con un mecanismo distinto al de los miRNAs de animales. Además, con estos estudios también se demostró que, para reprimir la traducción de un mRNA blanco, el sitio de unión de miRNA en el ORF requiere un apareamiento casi perfecto, que normalmente lleva a un rápido corte endonucleolítico del blanco (Tang *et al.*, 2003; Iwakawa y Tomari, 2013).

Adicionalmente, en el estudio realizado por Tang *et al.*, 2013, se vio con ensayos de Northern Blot que en los extractos de germen de trigo existe la presencia de miRNAs, miR165 y miR166, y que éstos presentaban actividad de RISC (estaban cargados en AGO o la proteína también estaba presente) puesto que cortaban el mRNA de *PHAVOLUTA* (PHV) cuando este era añadido al sistema. De este modo, se esperaría que en el sistema también estuvieran presentes otros miRNAs y probablemente proteínas AGO (Tang *et al.*, 2003).

Con base en lo anterior, es probable que el sistema de traducción de callo embriogénico de maíz también ayude del mismo modo que el sistema de germen de trigo en el estudio de miRNAs; sin embargo, está reportado que el uso de la nucleasa micrococcal abole la habilidad del RISC en los extractos celulares para degradar mRNAs (Hammond *et al.*, 2000). La primer solución para este problema es el uso de componentes exógenos, como se ha hecho en el caso de los lisados de células BY-2 (donde también se utiliza la enzima micrococcal), en estos se añade primeramente el transcrito de la proteína AGO, posteriormente el dúplex sintético de RNA y, finalmente, el mRNA de interés (Iwakawa y Tomari, 2013). Esta es la razón por la que en este trabajo también se intentó abordar la clonación de la secuencia de ZmAGO1 en un vector de expresión para que, una vez transcrita *in vitro*, fuera añadida al sistema y traducida; y la clonación de regiones de mRNAs blanco del miRNA de interés (miR528). Adicionalmente se necesita trabajar en la síntesis artificial del dúplex de miR528.

Por otro lado, una alternativa sería encontrar una forma de purificación del lisado que no utilice la nucleasa micrococcal para eliminar los mRNAs endógenos. En este trabajo se intentó la purificación de los lisados por medio de una columna de Sephadex (resultados no mostrados), donde se vio que la actividad traduccional de los lisados disminuía significativamente. No obstante, deben existir otras metodologías que permitan la purificación sin comprometer en este caso la actividad del complejo RISC.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo representan un avance significativo para el estudio de la regulación traduccional por miRNAs en la embriogénesis somática de maíz. Además, el sistema puede ser útil para el estudio de otros mecanismos mediados por sRNAs o de traducción en general. Sin embargo, aún quedan algunas cuestiones por resolver, como son la completa homogenización del lisado y el posible uso de un componente diferente a la nucleasa micrococcal para poder evaluar actividad endógena de RISC.

CONCLUSIONES

- En la polinización del maíz, es importante que el polen sea utilizado de inmediato. Una polinización mediante ventanas de tiempo ayuda a tener una polinización efectiva, lo cuál facilitará la obtención de los embriones necesarios para generar los callos embriogénicos; sin embargo, es necesario seleccionar los embriones inmaduros de 15ddp a partir del tamaño ya establecido (4mm).
- Para la obtención de protoplastos es importante llevar a cabo los lavados por centrifugación desechando los precipitados, contrario a lo que muchos protocolos previamente estandarizados indican. Se deben tomar los protoplastos cercanos a la interfase que se forma entre el precipitado y el medio.
- Para llevar a cabo la evacuolización es necesario formar el gradiente discontinuo en el momento ya que, si se almacenaba en frio para usarlo al día siguiente, el

gradiente se altera y no produce separación óptima de los protoplastos evacuolizados.

- En la obtención del sistema de traducción *in vitro* en callo embriogénico de maíz, el mejor método de lisis celular para los protoplastos evacuolizados resultó ser la molienda con nitrógeno líquido, ya que permitió obtener un lisado con actividad traduccional.

- Se estableció un protocolo para la obtención de un sistema de traducción *in vitro* a partir de callos embriogénicos de maíz, en el que se incluye la obtención de protoplastos a partir de los callos, su evacuolización y posterior lisado. Se utilizó como reportero mRNA de luciferasa transcrito *in vitro*, una temperatura de 25 °C, 1.66 mM de Mg²⁺ y 132 mM de K⁺. Este sistema no convencional no se equipara con el clásico de germen de trigo; sin embargo, es una herramienta que representa un avance significativo para el estudio de la regulación traduccional en la embriogénesis somática de maíz.

PERSPECTIVAS

- Clonar ZmAGO1c en el vector final para su expresión y uso en el sistema de traducción.
- Clonar regiones blanco de miR528 en el plásmido Psi-check2 de promega y obtener los RNAs mensajeros para su uso en el sistema.
- Sintetizar los dúplex de miR528 para añadirlos al sistema y poder observar la regulación efectuada por este miRNA.
- Llevar a cabo ensayos de traducción *in vitro* con los lisados de callo embriogénico de maíz utilizando los RNA mensajeros con las regiones blanco de miR528 clonadas.

REFERENCIAS

- Abmayr, S. M., Carrozza, M. J., & Workman, J. L. (2001). Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts from mammalian cells. *Current protocols in pharmacology*, 12(1), 12-3.
- Addo-Quaye, C., Eshoo, T. W., Bartel, D. P., & Axtell, M. J. (2008). Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome. *Current Biology*, 18(10), 758-762.
- Anderson, E. 1946. Maize in Mexico. A preliminary survey. *Annals of Missouri Botanical Garden* 33: 147- 247
- Anderson, E. y H. C. Cutler. (1942). Races of *Zea mays* I. Their recognition and classification. *Annals of Missouri Botanical Garden* 29:69-88
- Arribas-Layton, M., Wu, D., Lykke-Andersen, J., & Song, H. (2013). Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7), 580-589.
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730-2741.
- Axtell, M. J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology*, 64, 137-159.
- Bai, S., Chen, L., Yund, M. A., & Sung, Z. R. (2000). Mechanisms of plant embryo development. *Current topics in developmental biology*, 50, 61-88.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Becraft PW. (2007). Aleurone Cell Development. *Plant Cell Monogr*. Springer-Verlga Berlin Heidelberg.
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(12), 727.
- Brant, E. J., & Budak, H. (2018). Plant small non-coding RNAs and their roles in biotic stresses. *Frontiers in plant science*, 9.

- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185-1190.
- Buchner, E. (1897). Alkoholische gahrung ohne hefezellen (alcoholic fermentation without yeast). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 30, 117–124
- Buchner, E. (1897). Alkoholische garung ohne hefezellen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 30(1), 1110-1113.
- Buntru, M., Vogel, S., Spiegel, H., & Schillberg, S. (2014). Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based in vitro translation system. *BMC biotechnology*, 14(1), 37.
- Cai H. (2006). Maize. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cardenas-Monroy, C., Gonzalez Andrade, M., Guevara Flores, A., Lemus, L., & Matuz Mares, D. (2016). El universo de RNAs pequeños en plantas: su versatilidad en la regulaci3n de la expresi3n genética. *mensaje bioquímico*, 40.
- Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnology advances*, 30(5), 1185-1194.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
- Chávez-Hernández, E. C. (2015). Expresi3n y funci3n de miRNAs específicos durante la regeneraci3n de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Chávez-Hernández, E. C., Alejandri-Ramírez, N. D., Juárez-González, V. T., & Dinkova, T. D. (2015). Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, 6, 555.
- Chen, C. Y. A., & Shyu, A. B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(2), 167-183.

- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 303(5666), 2022-2025.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 21-44.
- Chourey, P. S., & Zurawski, D. B. (1981). Callus formation from protoplasts of a maize cell culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 59(6), 341-344.
- Chowdhury, A., & Tharun, S. (2009). Activation of decapping involves binding of the mRNA and facilitation of the post-binding steps by the Lsm1-7–Pat1 complex. *Rna*, 15(10), 1837-1848.
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, & F. B. Y. (1975). Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci* (18):659-668.
- Coenen, C., & Lomax, T. L. (1997). Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant science*, 2(9), 351-356.
- CONABIO. (2011). Base de datos del proyecto global “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Octubre de 2010. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F.
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 19-31.
- De Alba, A. E. M., Elvira-Matelot, E., & Vaucheret, H. (2013). Gene silencing in plants: a diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(12), 1300-1308.
- Dugas, D. V., & Bartel, B. (2008). Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant molecular biology*, 67(4), 403-417.
- Endo, Y., Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2013). Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO reports*, 14(7), 652-658.

- Eulalio, A., Helms, S., Fritsch, C., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2009). A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *Rna*, 15(6), 1067-1077.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S. F., Doerks, T & Izaurralde, E. (2007). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes & development*, 21(20), 2558-2570.
- Fabian, M. R., & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 586.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H., & Huijser, P. (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*, 49(4), 683-693.
- Garrocho-Villegas V, Jesús-Olivera MT, Sánchez Quintanar E. (2012). Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration Plant Cell Culture Protocols, *Methods in Molecular Biology*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- German, M. A., Pillay, M., Jeong, D. H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P. & De Paoli, E. (2008). Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature biotechnology*, 26(8), 941.
- González, G. A., Pacheco, M. G., Oneto, C. D., Etchart, V. J., Kandus, M. V., Salerno, J. C. & Lewi, D. M. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(1), 9-9.
- González-Osnaya, V. (2016). Caracterización de la secuencia contexto del codón AUG iniciador en mRNAs de diversos eucariontes. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Goodman, M. M. y W. L. Brown. (1988). Races of corn. En: G. F. Sprague y J. W. Dudley (eds.). *Corn and corn improvement*. 3ra ed. ASA-CSSA-SSSA. Madison, Wisconsin. 38-80

- Goodman, M. M., & Bird, R. M. (1977). The races of maize IV: tentative grouping of 219 Latin American races. *Economic Botany*, 31(2), 204-221.
- Grimson, A., Farh, K. K. H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, 27(1), 91-105.
- Gursinsky, T., Schulz, B., & Behrens, S. E. (2009). Replication of Tomato bushy stunt virus RNA in a plant in vitro system. *Virology*, 390(2), 250-260.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293.
- Harlan, J. R. y J. M. J. de Wet. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20(4):509-517
- Hernández X., E. y G. Alanís F. (1970). Estudio morfológico de cinco razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México: Implicaciones filogenéticas y fitogeográficas. *Agrociencia* 5 (1): 3–30
- Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell. *Metabolic engineering*, 14(3), 261-269.
- Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2013). Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnology and bioengineering*, 110(10), 2643-2654.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly (A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 16961-16966.
- Hunter, A. R., Farrell, P. J., Jackson, R. J., & Hunt, T. (1977). The Role of Polyamines in Cell-Free Protein Synthesis in the Wheat-Germ System. *European journal of biochemistry*, 75(1), 149-157.
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99.

- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442-1451.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., ... & Ishikawa, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular cell*, 39(2), 282-291.
- Imbrie-Milligan, C. W., & Hodges, T. K. (1986). Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta*, 168(3), 395-401.
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2013). Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Molecular cell*, 52(4), 591-601.
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2015). The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in cell biology*, 25(11), 651-665.
- Iwasaki, S., Kawamata, T., & Tomari, Y. (2009). *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Molecular cell*, 34(1), 58-67.
- Jakubeková, M., Pretová, A., & Obert, B. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(4), 478.
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2013). The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes & development*, 27(24), 2628-2641.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53.
- Juárez-González V. T. (2015) Análisis de la expresión de enzimas de la vía de biogénesis de RNAs pequeños (sRNAs) durante la embriogénesis somática de maíz. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Kamo, K. K., Chang, K. L., Lynn, M. E., & Hodges, T. K. (1987). Embryogenic callus formation from maize protoplasts. *Planta*, 172(2), 245-251.

- Kato Y., T. A. (1996). Revisión del estudio de la introgresión entre maíz y teocintle. En: J.A. Serratos, M.C. Willcox y F. Castillo. Flujo Genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: Implicaciones para el maíz transgénico, México, D.F. CIMMYT. 48-57.
- Komoda, K., Naito, S., & Ishikawa, M. (2004). Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1863-1867.
- Li, J. F., Chung, H. S., Niu, Y., Bush, J., McCormack, M., & Sheen, J. (2013). Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants. *The Plant Cell*, 25(5), 1507-1522.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., ... & Zhang, F. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell*, 153(3), 562-574.
- Liu, Q., & Paroo, Z. (2010). Biochemical principles of small RNA pathways. *Annual review of biochemistry*, 79, 295-319.
- Liu, Q., Wang, F., & Axtell, M. J. (2014). Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. *The Plant Cell*, 26(2), 741-753.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 297(5589), 2053-2056.
- Long, J. M., Liu, C. Y., Feng, M. Q., Liu, Y., Wu, X. M., & Guo, W. W. (2018). miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *Journal of experimental botany*, ery132.
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Chávez-Hernández, E. C., & Dinkova, T. D. (2018). MicroRNA expression and regulation during Maize somatic embryogenesis. In *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 397-410). Humana Press, New York, NY.
- Loza-Rubio, E. Rojas, L. Gómez, Olivera MTJ, Gómez-Lim MA. (2008). Development of an edible Rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Dev Biol (Karger)* 131):477-482

- Lujan-Soto, E. (2018). Regulación de algunos mRNAs blanco de miR528 en embriogénesis somática de maíz. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Luna, V., Figueroa, M., Baltazar, M., Gomez, L., Townsend, R., & Schoper, J. B. (2001). Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science*, 41(5), 1551-1557.
- Lytle, J. R., Yario, T. A., & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9667-9672.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George EF, Hall MA, De Clerk GJ (Eds.), *Plant propagation by tissue culture 3rd edition*. Vol. 1. The background. Springer, The Netherlands. pp.175-204.
- Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., & Endo, Y. (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 559-564.
- Mallory, A. C., & Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics*, 38(6s), S31
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO journal*, 23(16), 3356-3364.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., ... & Filipowicz, W. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317(5845), 1764-1767.
- Matsuoka, Yoshihiro, et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 9, p. 6080-6084.

- Matthaei, H., & Nirenberg, M. W. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon RNA prepared from ribosomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 4(6), 404-408.
- McClintock, B., T. A. Kato Y., and A. Blumenschein 1981. *Chromosome Constitution of Races of Maize*. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 517 p.
- McK. Bird, R. y M. M. Goodman. 1977. The races of maize V: Grouping maize races on the basis of ear morphology. *Economic Botany* 31:471-481.
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 155-203). Springer Netherlands.
- Mica, E., Gianfranceschi, L., & Pè, M. E. (2006). Characterization of five microRNA families in maize. *Journal of experimental botany*, 57(11), 2601-2612.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118.
- Morocz, S., Donn, G., Nérneth, J., & Dudits, D. (1990). An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical and applied genetics*, 80(6), 721-726.
- Nardmann, J., & Werr, W. (2009). Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. In *Handbook of Maize: Its Biology* (pp. 105-119). Springer, New York, NY.
- Navrátilová, B. (2004). Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae—a review. *Hort Sci (Prague)*, 31(4), 140-157.
- Nirenberg, M. W., & Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(10), 1588-1602.
- Nishimura, T., Padamsi, Z., Fakim, H., Milette, S., Dunham, W. H., Gingras, A. C., & Fabian, M. R. (2015). The eIF4E-binding protein 4E-T is a component

of the mRNA decay machinery that bridges the 5' and 3' termini of target mRNAs. *Cell reports*, 11(9), 1425-1436.

- Nottrott, S., Simard, M. J., & Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1108-1114.
- Ortas, L. (2008). Cultivo del maíz: fisiología y aspectos generales.
- Ortega P., R. 1985. Variedades y razas mexicanas de maíz y su evaluación en cruzamientos con líneas de clima templado como material de partida para fitomejoramiento. Traducción abreviada al español. Ph. D. Thesis. N. I. Vavilov Nacional Institute of plants. Leningrad, URSS. 22 p.
- Ortega, Alejandro; Guerrero, Manuel, Preciado, Ricardo. 2013. Diversidad y distribución del maíz nativo y sus parientes silvestres en México. 1ª edición. Biblioteca básica de agricultura. México.
- Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR, Violic AD. 2001. El maíz en los Trópicos. Mejoramiento y producción. Grupo de cultivos alimentarios extensivos. Servicio de Cultivo y Pastos. Dirección de Producción y Protección Vegetal de la FAO. Roma, Italia.
- Parizotto, E. A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C., & Voinnet, O. (2004). In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes & development*, 18(18), 2237-2242.
- Pelham, H. R., & Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *European Journal of Biochemistry*, 67(1), 247-256.
- Perales, H., & Golicher, D. (2011). Modelos de Distribución para las Razas de Maíz en México y Propuesta de Centros de Diversidad y de Provincias Bioculturales. México, Conabio.
- Pessino SC, Ortiz JPA. 2010. Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires.

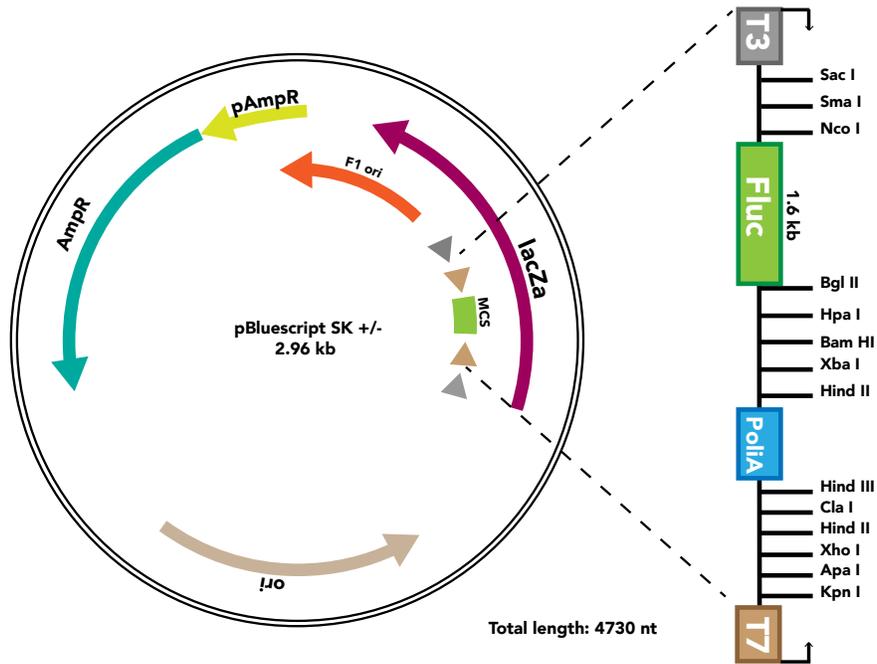
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E. & Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309(5740), 1573-1576.
- Polanco J., A. Y T. Flores M. 2008. Bases para una política de I&D e innovación de la cadena de valor de maíz. Foro Consultivo Científico y Tecnológico, A. C. México, D.F. 244 p.
- Power J. B., Davey M. R., McLellan M. and Wilson D. 1989. *Laboratory Manual Plant Tissue Culture*. Plant Genetic Manipulation Group, Department of Botany, University of Nottingham, Nottingham, U.K.
- Qi, Y., Denli, A. M., & Hannon, G. J. (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Molecular cell*, 19(3), 421-428.
- Qin, Z., Li, C., Mao, L., & Wu, L. (2014). Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. *Frontiers in plant science*, 5.
- Ramachandran V, Chen X. 2008. Small RNA metabolism in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 13 (7), 368-374.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *cell*, 110(4), 513-520.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
- Sánchez G., J. J. 1989. Relationships among the Mexican Races o maize. Ph. D. Thesis. North Caroline State University, Department of Crop Science. Raleigh, N. C. 187 p.
- Sánchez J, J., M. M. Goodman y C. W. Stuber. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the Races of maize of México. *Economic Botany*. 54(1): 43–59.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... & Minx, P. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science*, 326(5956), 1112-1115.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riestter, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental cell*, 8(4), 517-527.

- Shin, C., Nam, J. W., Farh, K. K. H., Chiang, H. R., Shkumatava, A., & Bartel, D. P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular cell*, 38(6), 789-802.
- Silva, A. V. M., & Dinkova, T. D. (2010). Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: Las dos caras de la moneda. *Revista de Educación Bioquímica*, 29(3), 82-91.
- Simon, S. A., & Meyers, B. C. (2011). Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Current opinion in plant biology*, 14(2), 148-155.
- Smertenko, A., & Bozhkov, P. V. (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1343-1360.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745.
- Spirin, A. S., & Swartz, J. R. (2008). Cell-free protein synthesis systems: historical landmarks, classification, and general methods. *Cell-free Protein Synthesis: Methods and Protocols*.
- Steward, F. C. (1958). GROWTH AND ORGANIZED DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. III. Interpretations of the Growth from Free Cell to Carrot Plan. *American Journal of Botany*, 45(10), 709-713.
- Sun, G. & Rossi, J.J. (2009) Problems associated with reporter assays in RNAi studies, *RNA Biology*, 6:4, 406-411, DOI: 10.4161/rna.6.4.9218
- Sun, Guiling. (2012). MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol. Biol*, 2012. 80: 17-36
- Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & development*, 17(1), 49-63.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859.
- Tian, X., Zhang, C., & Xu, J. (2017). Control of cell fate reprogramming towards de novo shoot organogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 713-719.

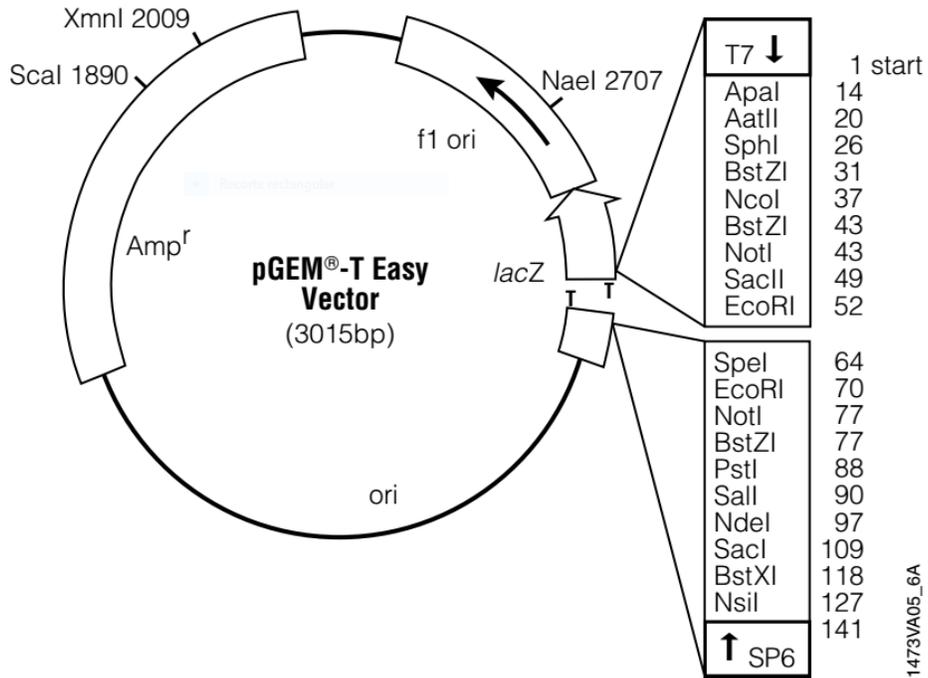
- Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J., & Weigel, D. (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, 6(7), e1001031.
- Vernoud, V., Hajduch, M., Khaled, A., Depège, N., & Rogowsky, M. P. (2005). Maize embryogenesis. *Maydica*, 50(3/4), 469.
- Vielle-Calzada, J. P., & Padilla, J. (2009). The Mexican landraces: description, classification and diversity. In *Handbook of maize: Its biology* (pp. 543-561). Springer, New York, NY.
- Vielle-Calzada, J. P., de la Vega, O. M., Hernández-Guzmán, G., Ibarra-Laclette, E., Alvarez-Mejía, C., Vega-Arreguín, J. C., ... & Herrera-Estrella, A. (2009). The Palomero genome suggests metal effects on domestication. *Science*, 326(5956), 1078-1078.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., & Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & development*, 21(15), 1857-1862.
- Walbot, V., & Evans, M. M. (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 369.
- Wang, B., Yanez, A., & Novina, C. D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5343-5348.
- Wang, X. J., Reyes, J. L., Chua, N. H., & Gaasterland, T. (2004). Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome biology*, 5(9), R65.
- Wellhausen, E. J. (1988). The indigenous maize germplasm complexes of Mexico: Twenty-five years of experience and accomplishments in their identification, evaluation, and utilization (No. CIS-1187. CIMMYT.).
- Wellhausen, E. J., L. M. Roberts, E. Hernández X. en colaboración de P. C. Mangelsdorf. 1951. Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Oficina de Estudios Especiales Secretaría de Agricultura y Ganadería. Folleto técnico Núm. 55. México D. F
- Whittaker, J. W. (2013). Cell-free protein synthesis: the state of the art. *Biotechnology letters*, 35(2), 143-152.

- Wu, L., & Belasco, J. G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell*, 29(1), 1-7.
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4034-4039.
- Yang, L., Wu, G., & Poethig, R. S. (2012). Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 109(1), 315-320.
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57.
- Yu, B., & Wang, H. (2010). Translational inhibition by microRNAs in plants. In *miRNA Regulation of the Translational Machinery* (pp. 41-57). Springer Berlin Heidelberg.
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., & Kubick, S. (2015). Cell-free protein synthesis: Pros and cons of prokaryotic and eukaryotic systems. *ChemBioChem*, 16(17), 2420-2431.
- Zhang, L., Chia, J. M., Kumari, S., Stein, J. C., Liu, Z., Narechania, A., ... & Ware, D. (2009). A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS genetics*, 5(11), e1000716.
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423

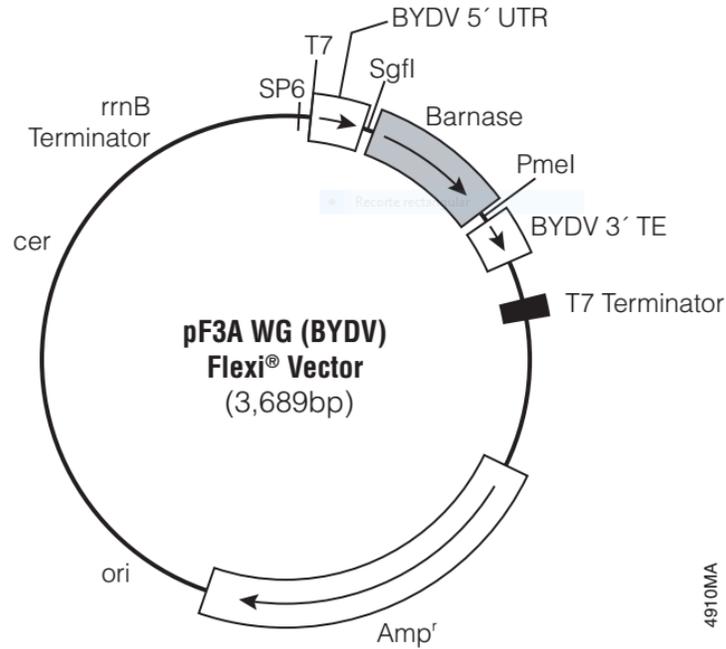
ANEXOS.



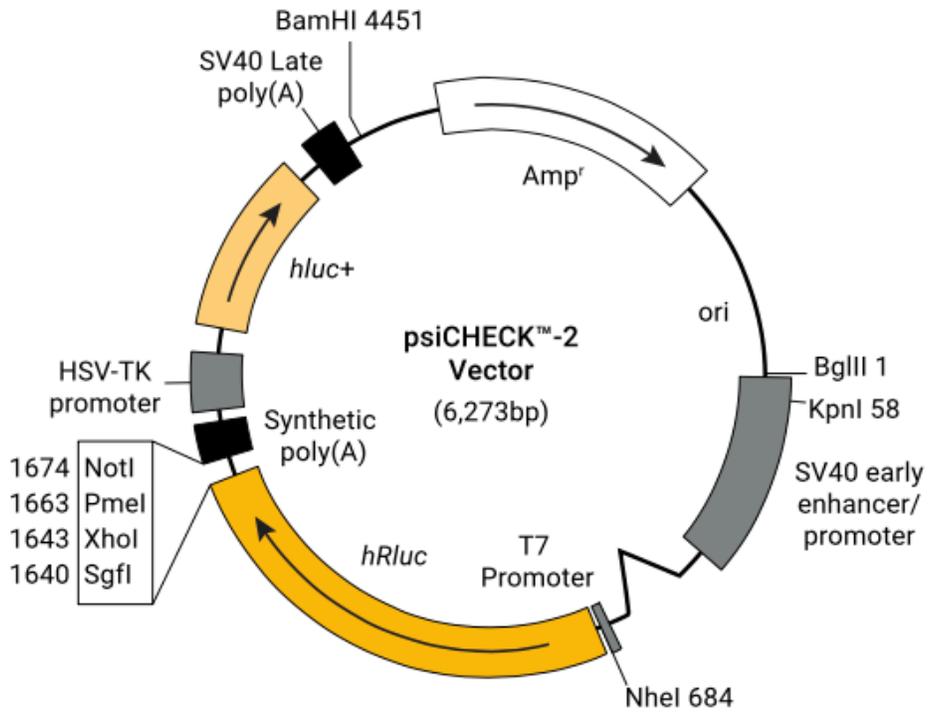
Anexo 1. Plásmido pBluescript SK +/- con secuencia insertada de la luciferasa de luciérnaga (Fluc).



Anexo 2. Vector pGem-T Easy Vector de Promega



Anexo 3. Vector pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector de Promega



Anexo 4. Vector Psi-check-2 de Promega