



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

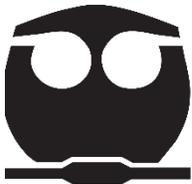
INMUNOLOCALIZACIÓN DE MARCADORES DEL CICLO  
CELULAR DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

**DIANA IXCHEL ROMERO SÁNCHEZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
**VOCAL:** DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO  
**SECRETARIO:** DRA. AURORA LARA NÚÑEZ  
**1<sup>er</sup>. SUPLENTE:** EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ  
**2<sup>DO</sup> SUPLENTE:** DRA. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO 114, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Aurora Lara Núñez

**SUSTENTANTE:**

---

Diana Ixchel Romero Sánchez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química, quién a través del subprograma 127, me apoyo con una beca.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la conclusión de esta tesis.

A los programas PAPIIT (IN205219), PAIP (5000-9130 y 5000-9124) por el financiamiento del proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

Página

<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>vi</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1 El maíz .....	3
1.1.1 Anatomía de la semilla de maíz.....	4
1.1.2 Anatomía del eje embrionario de maíz .....	6
1.1.3 Tejidos meristemáticos .....	8
1.2 Germinación.....	9
1.3 Ciclo celular.....	12
1.3.1 Complejos Ciclina/CDK .....	13
1.3.2 Ciclinas tipo D.....	14
1.3.2.1 Localización tisular y subcelular.....	15
1.3.3 Inhibidores de CDKs.....	16
1.3.3.1 Localización tisular y subcelular .....	19
1.4 Reguladores del crecimiento.....	20
1.4.1 Azúcares, glucosa y sacarosa .....	20
1.4.2 Auxinas.....	21
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>24</b>
2.1 Ciclo celular en la germinación de semillas de maíz.....	24
2.2 Ciclo celular en la germinación del eje embrionario de maíz .....	24
2.3 CycD2;2 .....	26
2.3.1 Localización tisular y subcelular .....	28
2.4 KRP4;2.....	29
2.4.1 Localización tisular y subcelular .....	29
2.5 Efectos de glucosa y sacarosa en la germinación del eje embrionario de maíz .....	30
2.6 Efectos del IAA en la germinación del eje embrionario de maíz .....	31
<b>3. Justificación</b> .....	<b>33</b>

<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>33</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>33</b>
5.1 Objetivos particulares.....	34
<b>6. Metodología</b> .....	<b>35</b>
6.1 Imbibición de ejes embrionarios.....	35
6.2 Preparación de muestras para microscopía (inclusión y corte de tejidos) ...	35
6.3 Inducción y purificación de proteínas recombinantes.....	36
6.4 Inmunolocalización con recuperación antigénica.....	36
6.5 Validación en tejido del anticuerpo anti-CycD2;2 y anti-KRP4;2.....	37
6.6 Cuantificación de intensidad de fluróforo en tejido y núcleo.....	38
6.7 Análisis estadístico.....	38
<b>7. Resultados y discusión</b> .....	<b>39</b>
7.1 Identificación de tejidos del eje embrionario de maíz.....	40
7.2 CycD2;2 .....	42
7.2.1 Especificidad del anticuerpo anti-CycD2;2 en inmunohistoquímica.....	42
7.2.2 Localización tisular de CycD2;2.....	43
7.2.3 Localización subcelular de CycD2;2 .....	47
7.3 KRP4;2.....	52
7.3.1 Especificidad del anticuerpo anti-KRP4;2 en inmunohistoquímica .....	52
7.3.2 Localización tisular de KRPP4;2.....	53
7.3.3 Localización subcelular de KRP4;2 .....	57
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>63</b>
<b>9. Perspectivas</b> .....	<b>63</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>65</b>
<b>11. Anexos</b> .....	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del maíz .....	4
<b>Tabla 2.</b> Efectos morfológicos de los azúcares en el medio de imbibición .....	31
<b>Tabla 3.</b> Efectos morfológicos del IAA en el medio de imbibición .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Variedades de maíz que se consumen en Guanajuato, México .....	3
<b>Figura 2.</b> Secciones verticales de la semilla de maíz madura .....	5
<b>Figura 3.</b> Anatomía del eje embrionario de maíz .....	7
<b>Figura 4.</b> Curso temporal de eventos físicos y metabólicos ocurridos durante la germinación (Fase I y II) y en la etapa temprana de crecimiento de la plántula (Fase III) en semillas no dormantes .....	11
<b>Figura 5.</b> Ciclo celular .....	12
<b>Figura 6.</b> Regulación de los complejos ciclinas/CDKs .....	13
<b>Figura 7.</b> Tiempos del ciclo celular en distintos tejidos meristemáticos durante la germinación del eje embrionario de maíz .....	25
<b>Figura 8.</b> Estructura del promotor de CYCD2;2 .....	26
<b>Figura 9.</b> Fluorescencia de la proteína GFP-GUS fusionada al fragmento distal del promotor de CYCD2;2 (-873 a -1 bp) .....	27
<b>Figura 10.</b> Localización de CycD2;2 en la semilla de maíz durante el desarrollo del endospermo .....	28
<b>Figura 11.</b> Localización subcelular de KRP4;2 .....	30
<b>Figura 12.</b> Morfología de los ejes embrionarios de maíz a las 72 h de imbibición en buffer de imbibición (BI), Sacarosa o Glucosa 120 mM (A-C) .....	30
<b>Figura 13.</b> Morfología de los ejes embrionarios de maíz a las 48h de imbibición con IAA .....	32
<b>Figura 14.</b> Identificación de los tejidos del eje embrionario de maíz analizados en este estudio .....	41
<b>Figura 15.</b> Especificidad del anticuerpo anti-CycD2;2 .....	42
<b>Figura 16.</b> Localización tisular de CycD2;2 en el eje embrionario de maíz a 0h de imbibición .....	44
<b>Figura 17.</b> Niveles tisulares de CycD2;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz .....	46

<b>Figura 18.</b> Localización subcelular de CycD2;2 en el eje embrionario de maíz a 0h de imbibición .....	48
<b>Figura 19.</b> Niveles nucleares de CycD2;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz.....	50
<b>Figura 20.</b> Especificidad del anticuerpo anti-KRP4;2.....	52
<b>Figura 21.</b> Localización tisular de KRP4,2 en el eje embrionario de maíz a 0h de imbibición .....	54
<b>Figura 22.</b> Niveles tisulares de KRP4;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz .....	56
<b>Figura 23.</b> Localización subcelular de KRP4,2 en el eje embrionario a 0h de imbibición .....	58
<b>Figura 24.</b> Niveles nucleares de KRP4;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz.....	60

## ABREVIATURAS

<b>BI</b>	Buffer de imbibición
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de Ciclina
<b>Cyc</b>	Ciclina
<b>EZ</b>	Zona de elongación
<b>Glu</b>	Glucosa
<b>IAA</b>	Ácido indol-3-acético-sacarosa
<b>ICK</b>	Inhibidor de CDK
<b>KRP</b>	Proteína relacionada a Kip
<b>MES</b>	Mesocotilo
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>PCNA</b>	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
<b>PZ</b>	Zona de proliferación
<b>QC</b>	Centro Quiescente
<b>RBR</b>	Proteína Relacionada a Retinoblastoma
<b>RC</b>	Cofia
<b>Sac</b>	Sacarosa
<b>SAM</b>	Meristemo apical del brote
<b>SRP</b>	Primordio raíz seminal

## RESUMEN

La germinación de semillas es un evento fundamental para el crecimiento y desarrollo de una nueva plántula. Su inicio requiere de la proliferación celular, cuyo proceso es regulado por la disponibilidad del estatus nutricional y de fitohormonas vegetales. En la germinación de ejes embrionarios de maíz, la presencia de azúcares solubles, sacarosa y glucosa, y de la fitohormona ácido indol acético, estimula la proliferación celular e incrementa la síntesis *de novo* de DNA.

La sucesión de eventos que dan lugar a la proliferación celular en un organismo en crecimiento se denomina ciclo celular, y se divide en 4 fases: G1, S, G2 y M. En este proceso, la regulación del avance a través de las diferentes fases recae en el grupo de proteínas ciclinas y su asociación con cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). El complejo formado es fundamental para el progreso del ciclo celular y su actividad es modulada por diferentes mecanismos, uno de los cuales es la asociación con los inhibidores KRPs.

En maíz, la CycD2;2 se asocia a tejidos con alta proliferación y dentro del ciclo celular se asocia a la regulación de la transición G1/S, así como de la fase S del ciclo celular, mientras que KRP4;2 se presume está en tejidos con baja proliferación y respecto al ciclo celular se relaciona también a fase G2 y transición G2/M. De ambas proteínas se ha indicado que su función dentro del ciclo celular sucede en la región nuclear.

En el presente trabajo, con el objetivo de encontrar evidencias de la relación entre el ciclo celular y el estímulo de reguladores de crecimiento involucrados en el establecimiento de la germinación, se determinó la localización tisular y subcelular de las proteínas reguladoras CycD2;2 y KRP4;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz en presencia de azúcares solubles (sacarosa y glucosa 120mM) o de ácido indol acético-sacarosa (IAA), así como en ausencia de reguladores.

Las dos proteínas se encontraron presentes en todos los tejidos del eje embrionario sin imbibir y con localización subcelular de citosol y núcleo. Posteriormente, en el

primer tiempo de estudio (18 h), correspondiente a la fase S del ciclo celular, en los tratamientos con presencia de estímulo CycD2;2 presentó mayor disminución tisular que KRP4;2. Respecto a la localización subcelular, las dos proteínas se encontraron en citosol y núcleo, pero con menor presencia en esta última región. Deduciéndose que todos los tejidos están en fase S, confirmación de que CycD2;2 participa en fase G1 y S, y sugerencia de que KRP4;2 podría también tener un papel en fase G2 y M

En el segundo tiempo analizado (36 h), con glucosa e IAA, CycD2;2 se localizó principalmente en tejidos proliferativos de raíces y aumentó su presencia en núcleo, indicio de mayor estimulación de proliferación celular en estos tejidos por los reguladores de crecimiento utilizados. En el caso de KRP4;2, sólo en presencia de IAA se localizó principalmente en tejidos proliferativos de radícula. Por otro lado, en ausencia de estímulo, ambas proteínas analizadas, presentaron un incremento general en todos los tejidos y acumulación en núcleo. Lo que sugiere que durante la proliferación lenta se favorece la acumulación de las proteínas así como la dependencia de otros factores (proteínas, reguladores) para la estimulación del ciclo celular.

Así, en el inicio de la germinación, se observó que la localización tisular y subcelular de las proteínas CycD2;2 y KRP4;2 se modifica de acuerdo con la menor o mayor estimulación del ciclo celular propia de cada tratamiento. Luego, al final de la germinación, la distribución de éstas proteínas parece ser resultado de la señalización de proliferación tejido-específica desencadenada por cada uno de los estímulos.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El Maíz

Registros arqueo-botánicos reconocen a Mesoamérica como el centro de origen y diversidad de aproximadamente 225 especies vegetales cultivadas. Siendo el maíz, una de las contribuciones más importantes, cuya domesticación sucedió alrededor de hace 6,000-10 000 años (<http://www.ogtr.gov.au>, consultado el 28/11/2018).

En la actualidad, el maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como insumo en diversos productos. Es el cereal a nivel mundial con mayor producción y rendimiento de grano por hectárea (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>, consultado el 04/06/2019). En México, a diferencia de otros países del mundo, se cultiva principalmente para el autoconsumo (<https://www.cima.aserca.gob.mx/swb/cima/Maiz>, consultado el 04/06/2019).



Figura 1. Variedades de maíz que se consumen en Guanajuato, México.

Varias características hacen al maíz un sistema genético atractivo (Bennetzen y Hake, 2009). Es fácil de cultivar en cualquier escala, con crecimiento anual y en un rango amplio de condiciones, por ejemplo, desde temperaturas tropicales hasta templadas (Nannas y Dawe, 2015).

Taxonómicamente (Tabla 1) el maíz pertenece a la familia Poaceae, género *Zea*. El cual está compuesto por un grupo de pastos anuales y perenes nativos de la región Mesoamericana, cuyo centro probable son las altas tierras mexicanas, desde donde se esparció rápidamente. Este género contiene a la especie *Z. mays* con cuatro subespecies, caracterizadas por poseer cromosomas con estructuras

heterocromáticas en posiciones intercalares y algunas terminales. En las subespecies están incluidos el taxa silvestre, conocido con el nombre común de “teosinte” (*Zea ssp*), y el cultivado, maíz (*Zea mays* L. ssp. *mays*) (Doebley *et al.*, 1990).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz**

<b>Reino</b>	Plantae (plantas)
<b>Subreino</b>	Tracheobionta (plantas vasculares)
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta (plantas con semilla)
<b>División</b>	Magnoliophyta (plantas con flores)
<b>Clase</b>	Liliopsida (plantas monocotiledóneas)
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poaceae (Gramíneas)
<b>Género</b>	<i>Zea</i>
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i>
<b>Subespecie</b>	<i>Zea mays ssp mays</i> (maíz)

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual; el tallo es simple, erecto, de 2 a 6 m de altura. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo. Las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias, que nacen de los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, ambas tienen la función de mantener a la planta erecta (Kato *et al.*, 2009).

En la mazorca cada grano o semilla es un fruto independiente llamado cariósipide (Kato *et al.*, 2009), siendo la estructura mediante la cual el embrión completamente desarrollado es disperso, y le permite al embrión sobrevivir entre los períodos de maduración de la semilla y el establecimiento de la plántula. De este modo se asegura el inicio de la siguiente generación (Koornneef *et al.*, 2002).

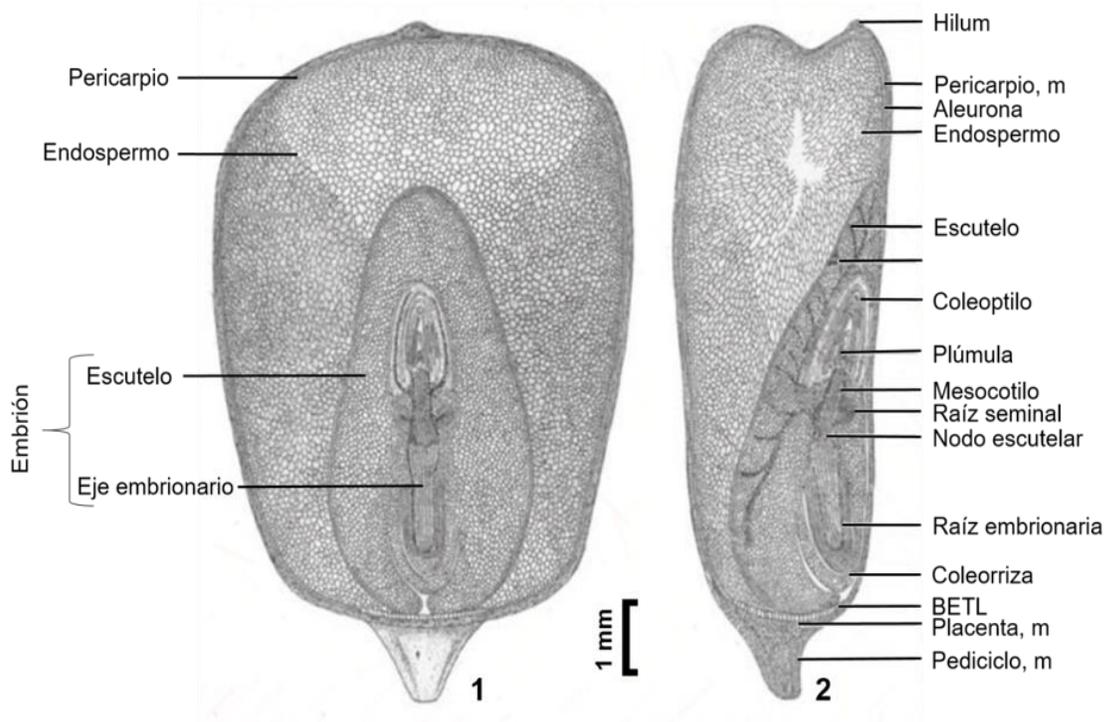
### 1.1.1 Anatomía de la semilla de maíz

Como cualquier otro cereal, las estructuras que constituyen a la semilla del maíz le confieren propiedades físicas y químicas que han sido importantes en la selección

del grano como alimento (Kato *et al.*, 2009). Esta consiste de un pericarpio adherente que encierra a un endospermo continuo y un embrión lateral (Figura 2).

El pericarpio es la capa externa dura y transparente del grano. En el extremo apical del grano el pericarpio endurece al hilum y en el extremo basal se sobrelapa con el pedicelo/pedículo (Figura 2) (Vincent, 2012).

El endospermo contiene cuatro tejidos diferentes: el endospermo harinoso, la aleurona (el tejido más externo y que comprende una sola capa de células especializadas), la capa de transferencia del endospermo basal (BETL, por sus siglas en inglés) y la región que rodea el embrión (ESR, del inglés Embryo Surrounding Region).



**Figura 2. Secciones verticales de la semilla de maíz madura, vista 1) de frente y 2) perfil.** BETL, *Basal Endosperm Transfer Layer* (capa de transferencia dl endospermo basal); m, tejido de origen materno. Modificado de Kiesselbach, 1999.

El endospermo contribuye aproximadamente con el 85% de la masa de una semilla madura, y es la fuente de energía y materia (en forma de gránulos de almidón y cuerpos proteicos intracelulares) para el embrión durante varios días posteriores a la germinación. Además, es el de mayor importancia agronómica (Vincent, 2012).

El embrión de maíz , como sucede en la mayoría de los pastos, tiene un desarrollo precoz (Bennetzen y Hake 2009), está embebido en el lado ancho de la semilla y consiste de un eje embrionario y su escutelo. Su anatomía se describe a continuación.

### **1.1.2. Anatomía del eje embrionario de maíz.**

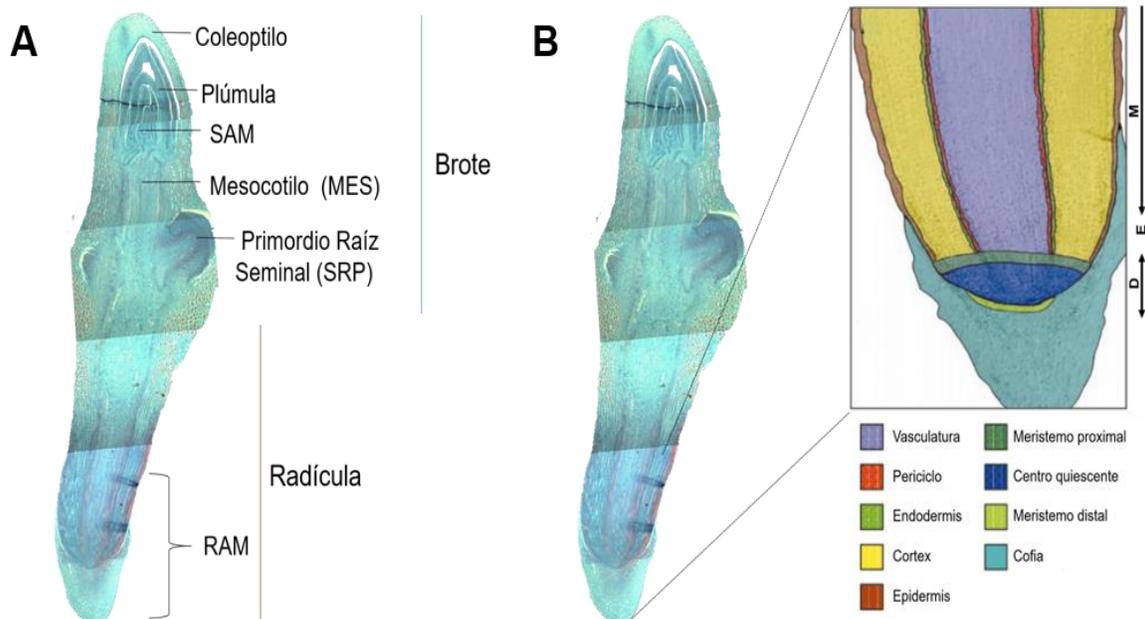
El eje embrionario de maíz contiene en su extremo basal la radícula (raíz primaria embrionaria) y en su extremo apical el ápice del brote (Figura 3A) (Vincent, 2012).

La radícula está envuelta en la estructura denominada coleorriza (Figura 2) y en su extremo apical está recubierta por la cofia (Figura 3B), que sirve como protección durante la embriogénesis y la germinación (Hochholdinger y Zimmermann 2008; Vincent, 2012). Por el contrario, el brote contiene a la plúmula, tejido que se convertirá en el tallo y las hojas de las plantas y al coleoptilo, tejido de protección que se une al escutelo.

En el maíz, la cofia protege la punta de la radícula (Figura 3B), y es originada en las etapas tempranas de la embriogénesis. Este tejido consiste de más de 10, 000 células originadas en la zona denominada caliptrógeno, cuya única función es la de producir nuevas células. Durante la germinación y post-germinación, las células del caliptrógeno tienen los más altos niveles de división celular, con un ciclo celular de alrededor de 12 horas (Freeling y Walbot 1994).

En el meristemo apical de la raíz (RAM), la zona más proximal a la cofia se denomina centro quiescente (QC) (Figura 3B), descrito como un grupo de 800 a 1200 células no meristemáticas, de forma aproximadamente hemisférica con un nucléolo pequeño, y circundado por células que se dividen activamente. Estas células se dividen una vez aproximadamente cada 180-200 horas, caracterizándose por una síntesis de proteínas y RNA lenta y constante (Ivanov *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2003) y acumulación de células en fase G1 o S del ciclo celular (Freeling y Walbot 1994; Jiang *et al.*, 2010). El centro se hace quiescente durante el desarrollo de la raíz, sea la raíz principal (raíz primaria) o la raíz lateral, después de que se ha

establecido el modelo estructural del ápice, y es capaz de reanudar la actividad meristemática. Está rodeado del meristemo proximal y distal.



**Figura 3. Anatomía del eje embrionario de maíz.** (A) Principales tejidos del brote y radícula. (B) Ampliación de la estructura anatómica del RAM de maíz, mostrando las posiciones relativas de los diferentes tipos celulares. D, zona de división; E, zona de elongación; M, zona de maduración; RAM, meristemo apical de la raíz; SAM, meristemo apical del brote. B es Modificado de Hochholdinger et al., 2004.

El meristemo proximal es un arco de células meristemáticas que es adyacente a la cara basal del centro quiescente (Figura 3B) siendo la fuente de la mayoría de las nuevas células en una raíz creciendo, con una división promedio cada 20 horas (Jiang *et al.*, 2010). Más de 10,000-20,000 nuevas células surgen de este meristemo. Dependiendo de la velocidad del crecimiento de la raíz, el meristemo proximal se extiende de 1-3 mm desde la unión de la raíz con la cofia (Freeling y Walbot 1994; Mews *et al.*, 2000).

Seguido del meristemo proximal está la zona distal de elongación en donde las nuevas células generadas empiezan a elongarse, siendo difícil clasificar a las células de acuerdo a su actividad mitótica o a su coeficiente de expansión (Ishikawa y Evans, 1995). En las raíces de maíz, esta zona juega un papel muy importante en la respuesta ante una variedad de señales ambientales exógenas. La zona distal de elongación está bordeada por la zona de elongación, aquí las células ya no se

dividen y tienen una elongación máxima (Hochholdinger *et al.*, 2004). El tamaño final de los diferentes tipos de células varía debido a que células de una misma región dejan de dividirse a diferentes tiempos (Figura 3B) (Freeling y Walbot 1994).

El ápice del brote del eje embrionario comprende cinco o seis internodos. Del nodo escutelar surge el escutelo, que es un cotiledón especializado y que no se convierte en tejido foliar, es delgado y está presionado contra el endospermo, del cual absorbe nutrientes durante la germinación; además, en esta estructura se almacenan lípidos (Bennetzen y Hake 2009; Vincent, 2012; Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). El segundo nodo da lugar al coleoptilo, el cual es una capa protectora de la plúmula y es el primer brote que el embrión lanza después de la germinación a través del suelo. La plúmula es la parte del brote que se extiende por arriba del nodo coleoptilar, en la cual hay de cinco a seis pequeños primordios de hojas que forman un cono dentro del coleoptilo (Vincent, 2012) y de los cuales crecerá una hoja en cada uno durante el desarrollo de la planta (Bennetzen y Hake, 2009). El espacio comprendido entre el nodo escutelar y el nodo coleoptilar se denomina mesocotilo (MES), el cual se alarga rápidamente durante la germinación para propiciar que el coleoptilo emerja del suelo y junto con él, las hojas (Figura 2.1 y Figura 3B) (Vincent, 2012).

El meristemo apical del brote (SAM) se halla en el nodo coleoptilar. El SAM es una estructura en forma de domo, que consiste de aproximadamente 200 células en estado embrionario (Figura 3B) (Bommineni *et al.*, 1995).

### **1.1.3 Tejidos Meristemáticos**

A diferencia de los mamíferos, el desarrollo de las plantas es principalmente post embrionario. En estas los nuevos órganos, como las raíces, tallos, hojas y flores, se originan a partir de varias divisiones celulares, y su posterior crecimiento y diferenciación (Inzé, 2005).

Durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, la división celular tiene lugar en todo el joven organismo, pero a medida que el embrión aumenta y se transforma en una planta independiente, la adición de nuevas células queda

gradualmente restringida a ciertas zonas del cuerpo de la planta, mientras que las demás atienden a otras actividades del vegetal. Así pues, porciones de tejido embrionario persisten en la planta durante toda su vida, por lo que la planta adulta se compone de tejidos adultos y juveniles. Estos tejidos perpetuamente jóvenes, que contribuyen primariamente al crecimiento de la planta, son los meristemos (Esau, 1985).

Los meristemos están muy relacionados con el crecimiento en el sentido amplio del término, aumento de masa, tamaño o ambos. Puede producirse división celular sin aumento en el tamaño de la entidad afectada, pero por lo general las células crecen antes de cada división. En la actividad meristemática, el crecimiento puede dividirse en dos etapas: crecimiento con división celular y engrandecimiento celular limitado y crecimiento sin división celular y engrandecimiento celular pronunciado (Esau, 1985).

El crecimiento en sentido de división celular que es tan característico del estado meristemático, no está limitado al llamado punto de crecimiento, sino que se produce -e incluso de modo más intenso- a cierta distancia del meristemo apical.

En el eje embrionario existen dos meristemos principales: un meristemo aéreo en la punta creciente del brote, meristemo apical del brote (SAM) y un meristemo debajo del suelo en el ápice de la raíz, meristemo apical de la raíz (RAM) (Garay-Arroyo *et al.*, 2012). La asincronía de división celular, es por lo general uniforme en el RAM, pues está en constante actividad, no así en el SAM, donde la actividad meristemática está regulada por las condiciones ambientales (como son la luz, temperatura, humedad, etc.) (López-Ríos, 2012).

## **1.2 Germinación**

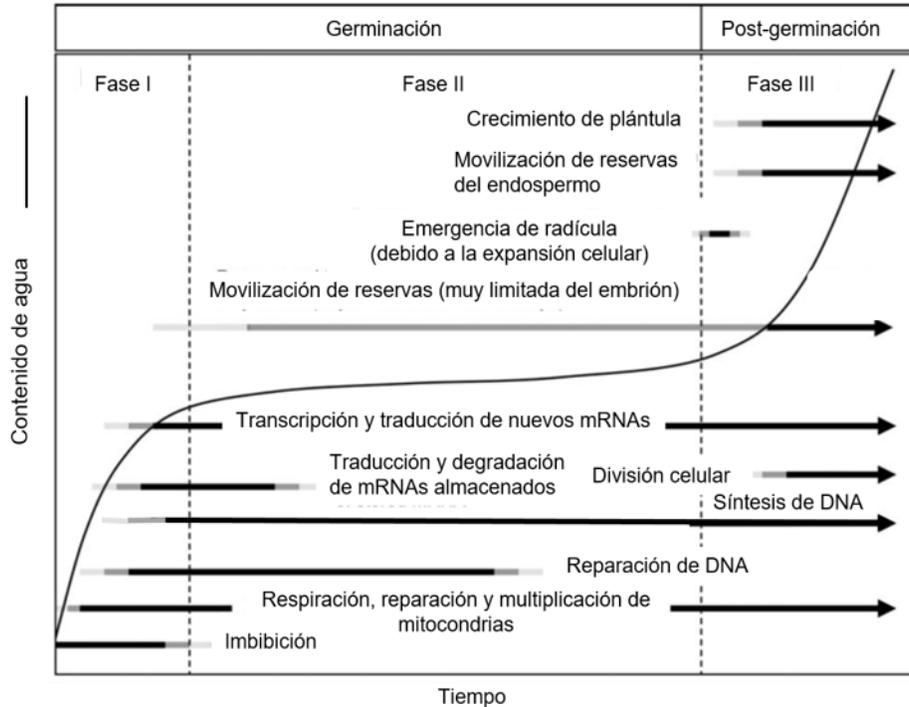
De todas las etapas del ciclo de la vida de una planta, el establecimiento y progresión de la germinación de la semilla, son las fases más vulnerables. Cuando una semilla está madura y seca se le conoce como quiescente. Las semillas quiescentes son órganos en descanso, con un contenido del 5 al 15% de humedad

y una actividad metabólica casi imperceptible. Importante es resaltar la propiedad de las semillas de poder sobrevivir en este estado, por muchos años, y subsecuentemente restaurar un normal y más alto nivel de metabolismo.

Por definición, la germinación comprende los eventos que comienzan desde la toma de agua por la semilla quiescente y que terminan con la elongación del eje embrionario. La usual señal visible del final de la germinación es la penetración de las estructuras que rodean al embrión por la radícula (Bewley, 1997). Sin embargo, en la práctica el punto en que finaliza es definido de acuerdo al campo de estudio. Para la agronomía, la germinación culmina cuando la plántula emerge de la superficie del suelo; para la fisiología vegetal, la germinación termina cuando protruye la radícula. En ambos casos no es considerado el proceso de proliferación celular que puede no haber comenzado o terminado.

Ya que nuestro grupo de trabajo se ha enfocado a estudiar el ciclo celular durante la germinación del maíz, se ha adoptado la siguiente definición: “la germinación es el conjunto de procesos bioquímicos y moleculares que permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas. Los eventos propios de la germinación conducirán al metabolismo a un punto de compromiso metabólico partiendo de un estado de quiescencia hasta llegar al término de la primera ronda de división celular, la cual en nuestro concepto marca el inicio del **proceso de desarrollo** de una nueva plántula” (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la única condición para el inicio de la germinación de una semilla, es la toma de agua por parte de la misma. En una semilla seca la toma de agua es trifásica. Comienza con la fase de imbibición (fase I), en la que ocurre una entrada rápida de agua dependiente del patrón cinético de saturación, influenciado por la estructura de la semilla, seguida de una fase de transición (fase II), caracterizada por una imperceptible entrada de agua, manteniéndose los niveles de ésta. Por último, en la fase de crecimiento (fase III), ocurre un incremento exponencial en la entrada de agua acompañado de la protrusión de la radícula (Figura 4) (Nonogaki *et al.*, 2010).



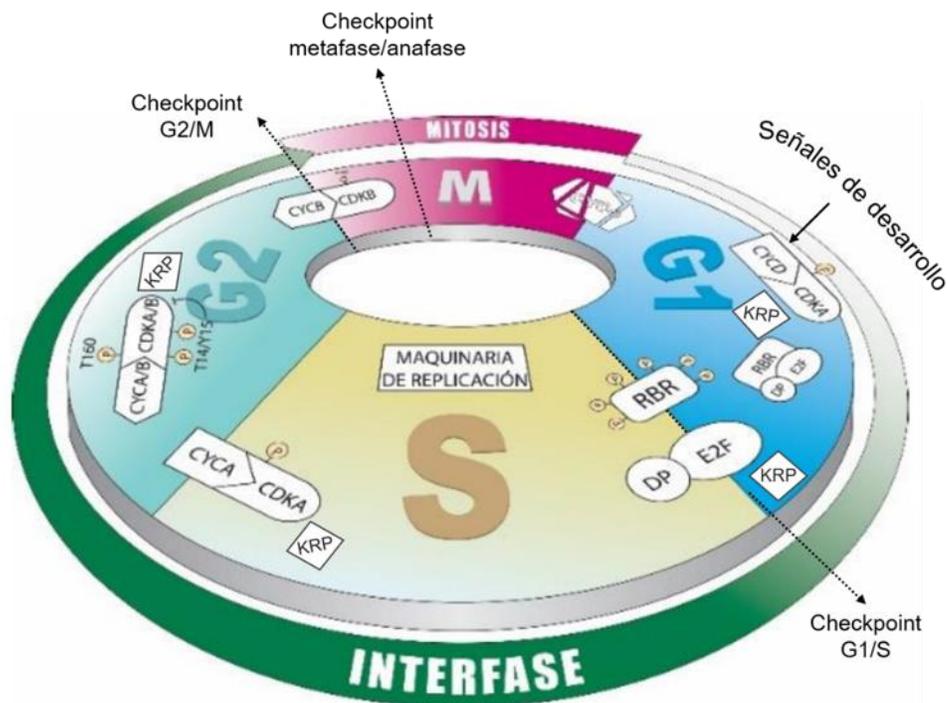
**Figura 4. Curso temporal de eventos físicos y metabólicos ocurridos durante la germinación (Fase I y II) y en la etapa temprana de crecimiento de la plántula (Fase III) en semillas no dormantes.** La curva muestra el curso temporal de toma de agua. Modificado de Nonogaki et al., 2010.

A partir de la imbibición, la semilla quiescente reanuda rápidamente su actividad metabólica. De modo general, se ha asumido que las estructuras y enzimas necesarias para este proceso ya se encuentran presentes en la semilla seca, habiendo sobrevivido a la etapa de desecación que culmina la maduración de la semilla (Bewley, 1997).

Se ha reportado que durante la maduración de la semilla de maíz la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 y que al germinar se reactiva el ciclo celular dando origen a la replicación del DNA y la división celular (Deltour y Jacmard, 1974). Este concepto no es absoluto, ya que, tras el proceso de desarrollo de la semilla, algunas células pudieron haber detenido su ciclo celular en fase G2 (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

### 1.3 Ciclo celular

La germinación es el primer paso para el **crecimiento** y **desarrollo** de una nueva plántula. Su inicio requiere de la proliferación celular, proceso en el que las células se dividen. Para que ocurra la división celular, las células deben crecer en tamaño, duplicar sus cromosomas y, finalmente, separar los cromosomas para su exacta distribución entre las dos células hijas. Estos procesos se llevan a cabo en el ciclo celular, definido como una serie de eventos ordenados, unidireccionales y altamente regulados, cuya finalidad es dar origen a una nueva célula, idéntica en su información genética a la de su progenitora (Vázquez-Ramos y Sánchez 2003).



**Figura 5. Ciclo celular.** Esquema general del ciclo celular, sus fases y los principales componentes que participan en cada fase. Cyc, ciclina; CDK, cinasa dependiente de ciclina, RBR, proteína relacionada a Retinoblastoma, E2F/DP, factores de transcripción; KRP, proteína relacionada a Kip/Cip. Modificado de Garza-Aguilar et al., 2014.

El ciclo celular se divide en cuatro fases (Figura 5): a) fase G1, b) fase S (síntesis), c) fase G2, d) fase M (mitosis). En la fase G1, la célula verifica si las condiciones ambientales, nutrimentales y metabólicas son las adecuadas para poder llevar a cabo la duplicación de su genoma, incrementa su actividad metabólica, duplica sus

organelos así como otras moléculas y estructuras citoplásmicas; en consecuencia, la célula aumenta de tamaño a casi el doble (De Veylder *et al.*, 2003).

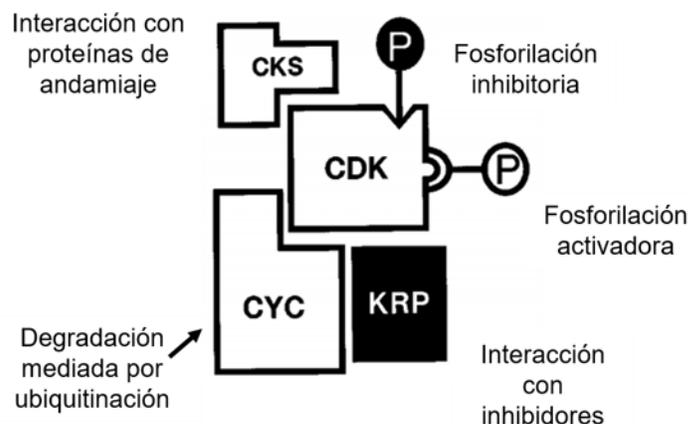
Después, la célula entra a la fase S, en la que se lleva a cabo la duplicación del DNA. Posteriormente, en la fase G<sub>2</sub>, la célula verifica la correcta duplicación del material genético reparándose cualquier error presente (De Veylder *et al.*, 2003).

Finalmente, en la fase M sucede la segregación del material genético y la división celular (citocinesis). La mitosis se divide en 4 etapas: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales tienen como función promover y regular la repartición equitativa del material genético (Alberts *et al.*, 2002).

Después de la citocinesis, las células reingresan a la fase G<sub>1</sub> y el ciclo celular puede recomenzar (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

### 1.3.1 Complejos Ciclina/CDK

En el ciclo celular la fase anterior debe estar completa antes de proseguir a la siguiente. Para lograrlo, es esencial que los procesos estén correctamente regulados (Vázquez-Ramos y Sánchez 2003).



**Figura 6. Regulación de los complejos ciclinas/CDKs.** La actividad de los complejos está regulada a distintos niveles: desde la expresión, abundancia y degradación proteica de las ciclinas y CDKs, modificaciones postraduccionales en CDKs e interacción con proteínas inhibitorias y de andamiaje. Modificado de Dewitte y Murray, 2003.

El paso progresivo y regulado a través de las diferentes fases del ciclo celular recae en el grupo de cinasas de serina/treonina (Ser/Thr), denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), y la formación transitoria y activación de los complejos con su subunidad regulatoria, ciclina (Cyc) (Barroco *et al.*, 2005; Boruc *et al.*, 2010; Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

La actividad de estos complejos es dependiente de múltiples controles ejecutados por señales intra y extra celulares, incluyendo transcripción, traducción, estabilidad, modificaciones postraduccionales y localización subcelular (Barroco *et al.*, 2005). De entre ellos, la regulación de la actividad de cinasa de las CDKs incluye eventos de fosforilación/desfosforilación por cinasas/fofosfatas específicas. La fosforilación activadora en T160 está dada por una Cinasa Activadora de CDK (CAK), mientras que la fosforilación de los residuos en T14 y Y15 por la cinasa Wee1 interfiere con la correcta unión de ATP, inhibiendo la actividad de las CDKs (Figura 6).

### **1.3.2 Ciclinas: tipo D**

Las ciclinas son proteínas que se acumulan y degradan cíclicamente, capaces de activar a las CDKs, ya que al formarse el complejo ciclina/CDK se logra la estabilización del mismo, se define su localización celular y la selección de sustratos específicos (Pines, 1995; Boruc *et al.*, 2010). Dependiendo de la similitud de su estructura y patrones de acumulación, las ciclinas se agrupan en específicas de G1 (tipo D) y mitóticas (tipo A y B) (Pines, 1995; Inzé y De Veylder, 2006).

Las plantas, organismos sésiles y con alta plasticidad de desarrollo, presentan gran número de ciclinas implicadas en la respuesta a señales de desarrollo intrínsecas y ambientales.

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

dirigiendo la fosforilación de la proteína RBR (Dewitte y Murray, 2003; De Jager *et al.*, 2005; Inzé y De Veylder, 2006), la cual es una limitante para la entrada a la fase S (Figura 6) (Sherr y Roberts, 1999; Menges y Murray, 2002).

En maíz, existen 17 genes de ciclinas D; los transcritos, de casi todos, están presentes en semilla seca, aunque algunos en niveles muy bajos; no obstante, todos son claramente detectables desde las 8 horas de imbibición, lo que coincide con la fase G1. Asimismo 15 de estos genes son regulados diferencialmente durante la germinación, de igual manera en presencia de fitohormonas, sugiriendo que podrían tener funciones no redundantes (Buendía-Monreal *et al.*, 2011; Lara-Núñez *et al.*, 2017). Asimismo, en la germinación de ejes embrionarios el contenido de proteína de algunas de las ciclinas D presenta picos de abundancia entre las 12 y 18 h de imbibición (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez, *et al.*, 2008, 2017; Garza-Aguilar *et al.*, 2017), concordando con reportes previos que indican la presencia y activación de estas ciclinas en la transición G1/S durante la germinación de maíz.

Adicionalmente, también se ha reportado la detección de transcrito de casi todas las ciclinas D en hoja, aunque en niveles menores, sugeriendo la posibilidad de que algunas ciclinas efectivamente estén involucradas en procesos de diferenciación (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

### **1.3.2.1 Localización tisular y subcelular**

Dado que las ciclinas dirigen la actividad de las CDKs hacia un sustrato en particular, el entendimiento de cómo es ordenado el ciclo celular requiere conocer cómo es regulada la localización de las ciclinas. La distribución de las ciclinas puede proporcionar información detallada sobre el lugar y el tiempo en el que la actividad de cinasa es dirigida hacia proteínas-sustrato particulares. Cuando el complejo es modulado por fosforilación activadora sobre CDK, se pueden ejecutar los eventos de replicación de DNA, así como los cambios estructurales de la mitosis. Hay fuerte evidencia de que las ciclinas pasan por períodos de síntesis y de proteólisis y de que pueden cambiar su localización durante el ciclo celular (Mews *et al.*, 1997).

Las ciclinas tipo D están presentes predominantemente en tejidos altamente proliferativos, como los meristemos de raíz, y en menor medida en tejidos con mayor diferenciación. También se han agrupado algunos genes de CYCD como principales candidatos implicados en la regulación de la división celular del cambium y la respectiva diferenciación vascular. Por ejemplo, mediante hibridación *in situ* en *Arabidopsis* se ha confirmado la participación de *CYCD3;1* en el procambium de hojas en desarrollo y en la inflorescencia del tallo, no así para la *CYCD2;1* (Collins *et al.*, 2015; Sablowski *et al.*, 2014).

Respecto a su localización subcelular, todas las ciclinas D de *Arabidopsis* están presentes en núcleo, con la peculiaridad de que *CycD2;1*, *CycD4;1* y *CycD4;2* también se encuentran en citoplasma. Curiosamente, las *CycD2;1* y *CycD4;2* forman complejos con PCNA tanto en núcleo como en citoplasma (Boruc *et al.*, 2010; Strzalka *et al.*, 2015).

Al igual que las *CycD* de *Arabidopsis*, las de maíz se han localizado en núcleo y citoplasma durante el desarrollo del endospermo. Sin embargo, existen diferencias, como la *CycD5* que se localiza únicamente en el citoplasma de las células de la periferia y su actividad asociada a CDK es mayor en la transición G1/S, lo que ha sugerido que participa únicamente en el ciclo celular mitótico (Dante *et al.*, 2014; Lara-Núñez *et al.*, 2008).

### **1.3.3 Inhibidores de CDKs**

En contraste con las ciclinas, ciertas proteínas se pueden unir al complejo CDK e inhibir su actividad. Debido a su habilidad de inhibir directamente la actividad de CDK, estas proteínas, en su mayoría de bajo peso molecular, son generalmente conocidas como CKIs (CDK inhibitors), las cuales inducen el arresto del ciclo celular o retrasan la progresión del ciclo, en respuesta a señales intracelulares o extracelulares (Verkest *et al.*, 2005).

En mamíferos y levaduras, los genes de las CKIs son clasificados en dos familias de acuerdo a su similitud estructural y especificidad de acción (Sherr y Roberts,

1999): la familia INK4 (Inhibitors of CDK4) y la familia Cip/kip (kinase inhibitory protein). La primera incluye proteínas exclusivas de la fase G1 (Pavletich, 1999) y la segunda comprende proteínas que inhiben a un amplio espectro de complejos ciclina-CDK en la transición G1/S (Stals e Inzé 2001).

Los inhibidores Cip/Kip participan en la proliferación celular como factores ensambladores y estabilizadores de los complejos D/CDK4 en el citoplasma. También dirigen la acumulación de los complejos ciclina/CDK al núcleo de la célula, ya que ambas proteínas del complejo carecen de señales de localización nuclear (Mangeng, 1999).

Además de su papel esencial en la proliferación y diferenciación, varios estudios han establecido que las proteínas Cip/Kip también podrían estar desempeñando funciones adicionales como factores de ensamblaje, reguladores de apoptosis, migración celular y como factores transcripcionales (Coqueret, 2003).

Dos tipos de CKIs han sido identificados y caracterizados en plantas: INHIBITORS/INTERACTORS OF CDK/KIP-RELATED PROTEINS (ICKs/KRPs) (De Veylder, 2001; Lui *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998,) y SIAMESE/SIAMESE RELATED. La primera tiene un dominio conservado en el extremo C-terminal que muestra limitada similitud con el dominio N-terminal de un inhibidor de la familia Cip/Kip de mamíferos. Este dominio conservado es esencial para la interacción con CDKs y ciclinas. En el presente trabajo se utilizará la nomenclatura de KRPs.

Las KRPs se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo al número de cotiledones de las plantas. Los grupos A y B únicamente contienen proteínas de plantas dicotiledóneas o monototilonéas, respectivamente. El grupo C contiene proteínas tanto en plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas (Torres-Acosta *et al.*, 2011).

Típicamente, tanto en *Arabidopsis* como en maíz, las KRPs se unen a los complejos CDKA/CycDs, confirmando su papel regulatorio en el comienzo del ciclo celular (Boruc *et al.*, 2010; De Jesús-Juárez *et al.*, 2008; Lara-Núñez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 1998, 2008; Zhou *et al.*, 2003). No obstante, algunos reportes han mostrado la

interacción con CDKs tipo B y con ciclinas A (Boruc *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2005; Nakai *et al.*, 2006; Garza-Aguilar *et al.*, 2019). Para su degradación, las KRPs de plantas son blanco de varias E3 ligasas (Zhou *et al.*, 2003; Weinl *et al.*, 2005; Jakoby *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2008). En células mitóticas, son fosforiladas por CDKs tipo B1 y marcadas para degradación vía Ubiquitin-proteasoma, lo que deriva en la estimulación de la actividad de CDKA y la entrada a mitosis (Verkest *et al.*, 2005).

El patrón de expresión de los genes de KRPs es consistente con su papel regulatorio del ciclo celular. En células en suspensión de *Arabidopsis* sincronizadas parcialmente, los niveles de KRP1 incrementan hacia fase M, indicando la posibilidad de que KRP1 actúe tanto en células que no se dividen como en la transición G2/M, mientras que la expresión de KRP2 está ausente en G1 y se incrementa hasta la transición G2/M (Menges y Murray, 2002). Además, la sobreexpresión fuerte de KRP1 y KRP2 reprime la división celular y la endoreduplicación, pero la sobreexpresión débil inhibe únicamente al ciclo mitótico, específicamente a complejos CDKA, teniendo como consecuencia la entrada a endoreduplicación. Por tanto, el efecto de KRPs en el ciclo celular parece ser dosis dependiente (Inzé, 2005).

Asimismo, la expresión de los genes de KRPs de *Arabidopsis*, se regula por fitohormonas y éstos muestran un patrón de expresión tejido-específico y de desarrollo. En particular, la KRP1 se sobreexpresa en presencia de ácido abscísico (Wang *et al.*, 1998), no así la KRP3, que incluso muestra un aumento de expresión en células dividiéndose activamente (Menges y Murray, 2002; De Veylder, 2001) y se asocia a moléculas específicas de G2/M (por ejemplo CKS, CDKB1;1 y CycD3;1), adjudicándole un papel en la transición de estas fases, probablemente como un factor de ensamblaje más que como un inhibidor. Alternativamente, esta KRP podría estar previniendo la activación prematura de la transición G2/M (Boruc *et al.*, 2010).

### 1.3.2.1 Localización tisular y subcelular

Como se describió anteriormente, las KRPs se clasifican en 3 grupos y se ha propuesto que los motivos presentes en cada clase podrían estar relacionados con la función que realizan en cada tejido o en los diferentes estados fisiológicos. Sin embargo, parece no existir una correlación entre el patrón de localización tisular y la clase a la que pertenecen, localizándose en tejidos con alta actividad mitótica, en aquellos con endorreduplicación o en los totalmente diferenciados.

En cuanto a su localización subcelular, se sabe que todas las KRPs de *Arabidopsis* se localizan principalmente en núcleo (Bird *et al.*, 2007; Boruc *et al.*, 2010), aunque sólo algunas de ellas poseen señal de localización nuclear (NLS) putativa. Por ello, se ha propuesto que pueden existir diferentes mecanismos de localización nuclear dado que mutantes de las KRPs de *Arabidopsis* sin el motivo predicho de señal de localización nuclear se siguen localizando en el núcleo (Bird *et al.*, 2007). Resultados similares se han encontrado con las proteínas KRPs de arroz (Yang *et al.*, 2011; Mizutani *et al.*, 2010), tabaco (Jasinski *et al.*, 2002) y maíz (Xiao *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque los resultados experimentales muestran que se localizan en el núcleo no se ha podido confirmar la relación funcional entre la localización y la presencia de la NLS putativa.

Respecto a la menor localización citoplásmica se ha sugerido que las KRPs tienen función acarreadora, implicando que importan al complejo CDK/ciclina del citoplasma al núcleo (Jakoby *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2011). Sin embargo, en plantas no se han encontrado los elementos regulatorios que median la localización de las Kip/Cip de mamíferos (Weinl *et al.*, 2005). Ante esto, en *Arabidopsis*, se ha sugerido la posibilidad de que la regulación de las KRPs suceda mediante fosforilaciones llevadas a cabo por las CDKs tipo B (Verkest *et al.*, 2005).

## 1.4 Reguladores del crecimiento

### 1.4.1 Azúcares, glucosa y sacarosa

Las plantas son organismos sésiles, con la capacidad de adaptación a los cambios en la disponibilidad de reguladores de crecimiento presentes en el ambiente. Para inducir la germinación, la semilla necesita integrar todas las señales que indican su estatus nutricional, sucediendo únicamente cuando las condiciones apropiadas de nutrientes y de fitohormonas están presentes (Osuna *et al.*, 2015).

Como resultado, gran número de procesos de desarrollo, metabólicos y fisiológicos son regulados en respuesta a los niveles absolutos de azúcares solubles, como la glucosa o sacarosa (Borisjuk *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2009).

En plantas, los azúcares solubles como la glucosa y sacarosa, además de tener un papel central en el metabolismo, también regulan varios procesos fisiológicos y de desarrollo (Koch 1996; Sheen *et al.*, 1999; Smeekens, 2000). En general, se considera que las hexosas, como la glucosa, favorecen la división y expansión celular, y la sacarosa la diferenciación y maduración (Koch, 2004; Lara-Núñez *et al.*, 2017). Recientemente se ha demostrado que en plantas la señalización por niveles de glucosa y sacarosa confluyen en TOR (Target of Rapamycin), induciendo la expresión de genes relacionados a crecimiento. Los azúcares, vía TOR, estimulan la división celular en los meristemos de la raíz, siendo E2F el factor de transcripción blanco de TOR activando la expresión de genes de fase S del ciclo celular. De tal forma que existe una relación directa entre TOR y el crecimiento de la planta mediante la activación de la proliferación celular y las vías anabólicas (Xiong *et al.*, 2013).

La señalización por glucosa regula el ciclo celular en todo el proceso del ciclo. Es notable que el efecto regulatorio de la glucosa sobre la velocidad de división celular resulta primeramente de la señalización que de la disponibilidad nutrimental o del estatus energético, ya que la actividad de proliferación celular correlaciona con los niveles exógenos de la hexosa, pero no con la velocidad con las que son absorbidas

(Hartig y Beck, 2006). Un estudio reciente en tejido meristemático de *Arabidopsis* demostró que la señalización por glucosa inicia la transición G2/M mediante la represión del transcrito del regulador negativo *TPR-domain suppressor of stimpy* (TSS), y así activa la expresión de componentes requeridos para la transición G2/M, tales como la *CYCB1;1 CDKB1;1*.

Las hexocinasas tienen un papel importante en la vía de respuesta a azúcares. En *Arabidopsis thaliana* la Hexocinasa1 (HXK1) es una enzima fosforiladora de glucosa que funciona como proteína sensor de este monosacárido, y cuyo papel de transductor de señales es independiente de su función enzimática (Lastdrager *et al.*, 2014). En consecuencia, se ha sugerido que la vía de señalización-hexocinasa podría estar implicada en la regulación del ciclo celular, ya que en respuesta a la disponibilidad de azúcares, la expresión de *CYCD2* de *Arabidopsis* es dependiente de la enzima (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000).

En el crecimiento y desarrollo de plantas, la sacarosa actúa como principal fuente de carbono y como molécula señalizadora. Tiene efectos regulatorios en la expresión de genes, en la traducción y en modificaciones post-traduccionales (Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Hirano *et al.*, 2011; Lastdrager *et al.*, 2014).

La señalización celular por azúcares debe ser integrada con otras vías reguladoras del crecimiento, en particular con la señalización de la luz y las fitohormonas. Estudios recientes describieron la inducción por sacarosa de los factores interactores del fitocromo (phytochrome interacting factors, PIFs), los cuales median el efecto de la sacarosa en la elongación del hipocotilo de *Arabidopsis*. Los PIFs son reguladores importantes del crecimiento en respuesta a fitohormonas como las auxinas y las giberelinas (Leivar y Quail, 2010).

#### **1.4.2 Auxinas**

El desarrollo de la planta es altamente adaptable a las condiciones ambientales, por ejemplo, luz, disponibilidad de nutrientes y de agua, temperatura, etc. En respuesta a estas señales externas, las fitohormonas se infieren como llaves maestras que

controlan el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la regulación de la proliferación y expansión celular.

Las auxinas son las más importantes fitohormonas para la supervivencia de la planta, ya que controlan el crecimiento y ciclo de vida de éstas (Mishra *et al.*, 2009). Estos compuestos están implicados en procesos fisiológicos tales como la formación del embrión, la elongación celular, geotropismo, fototropismo, dominancia apical, iniciación de la raíz, desarrollo de raíces laterales, desarrollo de frutos y pueden estimular la producción de etileno (Mishra *et al.*, 2009). En combinación con citocininas estimulan la diferenciación de floema y xilema.

Las auxinas naturales son producidas en zonas meristemáticas del tallo y transportadas hacia abajo a otras partes de la planta. La auxina más abundante es el ácido indol-3-acético. La concentración de auxina difiere de planta en planta, en los diferentes tejidos, la estación del año y en la etapa de crecimiento de la planta. Se han encontrado ampliamente distribuidas en plantas con y sin semilla, así como bacterias, hongos y algas. Su respuesta pleiotrópica es debida a su transporte a través del xilema y floema, al cruce de membranas celulares y al acoplamiento de proteínas reguladoras de transporte (George *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la distribución de auxinas es crítica para la regulación de la proliferación y expansión celular de manera dependiente de su concentración. En el RAM, la alta concentración endógena de auxina inhibe la elongación celular manteniendo el centro quiescente, en la región apical, niveles intermedios de auxina promueven la proliferación celular, y en la región basal la menor concentración permite a las células expandirse y diferenciarse (Blilou *et al.*, 2005; Galinha *et al.*, 2007; Grieneisen *et al.*, 2007). Igualmente, en el SAM, la baja concentración es responsable de la elongación, ayudando a la formación de las hojas.

Sin embargo, en *Arabidopsis* la aplicación exógena micromolar de auxinas estimula la expansión celular en los vástagos así como en casi todos los tejidos de brote, mientras que la aplicación por arriba de  $10^{-9}$  o  $10^{-8}$  M inhibe la elongación celular en las raíces (Perrot-Rechenmann 2010).

Incluso, recientemente se reportó que las auxinas guían la transición del ciclo mitótico a endociclo mediante la modulación de la expresión de reguladores del ciclo celular (Ishida *et al.*, 2010).

Consistente con su papel direccional en la regulación de la proliferación celular, especialmente en la preparación de la replicación (en la transición G1/S), se ha demostrado en *Arabidopsis*, que la auxina induce la expresión del gen de *CYCD3;1* y del gen de *CDKA;1*, participa en el ensamblado del complejo CDKA/CycD y se disminuyen los transcritos de *KRP1* y *KRP2* (Himanen *et al.*, 2002). Aunque la mayoría de la información sugiere que las auxinas actúan como señales permisivas para que la célula pueda comenzar la síntesis de DNA (transición G1/S), también son requeridas en la transición G2/M para completar el proceso de mitosis (Wang y Ruan, 2013).

La biosíntesis de auxina es inducida por azúcares solubles, y fluctuaciones diarias en el contenido de los azúcares se correlacionan con variaciones en los niveles de auxina (Sairanen *et al.* 2012). En *Arabidopsis*, la suplementación con sacarosa o glucosa promueve la sobre acumulación de auxina, e incrementa el flujo de auxina en el hipocótilo (Lilley *et al.*, 2012; Sairanen *et al.*, 2012; Stokes *et al.*, 2013).

Los efectos de la sacarosa en los niveles de auxina son más pronunciados en las raíces que en los brotes, indicativo de que es posible que los azúcares impacten el transporte de auxina y/o compartan vías de señalización. Por tanto, es posible que estén involucrados en la integración del crecimiento y desarrollo establecido entre el brote y la raíz (Ljung *et al.*, 2015).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Ciclo celular en la germinación de semillas de maíz**

Durante la formación de la semilla el desarrollo del embrión involucra altas tasas de proliferación celular; este proceso puede tomar varias semanas, durante las cuales ocurre acumulación de material de reserva y la consecuente maduración. En una semilla seca la mayoría de las células en los tejidos meristemáticos del embrión de maíz, se encuentran detenidas en fase G1 (Bewley y Black, 1994) y su estado metabólico es de tipo quiescente (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Sin embargo, la entrada al ciclo celular no ocurre de manera inmediata a la imbibición, existiendo un periodo de varias horas hasta que la fase S se hace evidente. Este retraso es propio del control de la transición G1/S, en la que se evita que la germinación ocurra si las condiciones no son las adecuadas (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

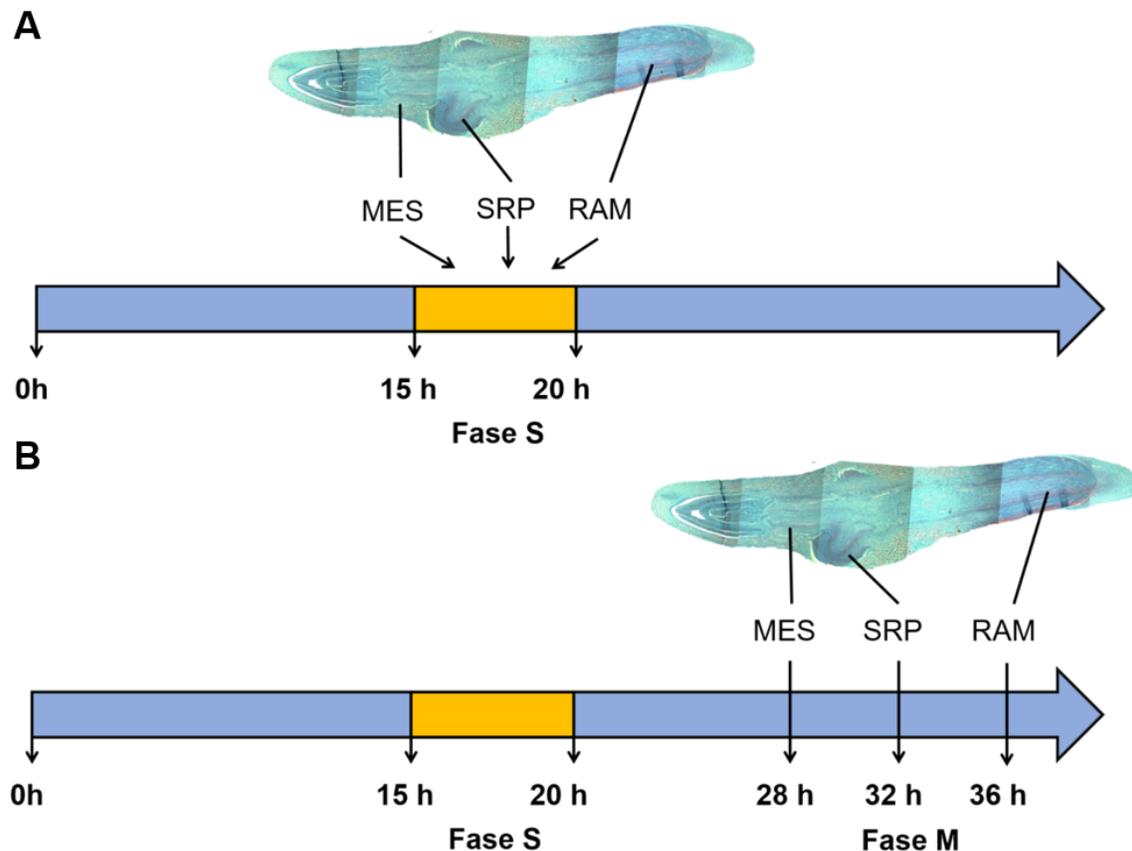
En semillas de maíz, la germinación ocurre entre 24-36 horas después de la imbibición, con el 50 % de las semillas germinadas a las 30 horas. Sin embargo, la protrusión de la radícula ocurre antes de que las células del primordio de la raíz entren en división celular (Baíza y Sánchez-de-Jiménez, 1986). Durante este proceso, la población celular de los tejidos meristemáticos alcanzan gradualmente la fase S y fase M, lo que sugiere ciclos celulares parcialmente sincrónicos (Baíza y Sánchez-de-Jiménez, 1986, 1989; Baíza *et al.*, 1989).

### **2.2 Ciclo celular en la germinación del eje embrionario de maíz**

En el laboratorio dónde se realizó este trabajo se ha adoptado el modelo del eje embrionario de maíz para el estudio del ciclo celular, del cual se han caracterizado los tiempos de cada fase durante la germinación.

La replicación de DNA (fase S) en el embrión de maíz comienza alrededor de las 14 horas después de imbibición, con el valor mayor de núcleos con incorporación de timidina-[<sup>3</sup>H] a las 40 horas. Es importante destacar que la proliferación celular en

ejes embrionarios de maíz sucede en tres diferentes regiones meristemáticas, el mesocotilo, la raíz seminal y la raíz principal, con aparición de figuras mitóticas a las 28 h, 32 h y 36 h, respectivamente. Sin embargo, los tres tejidos muestran incremento de núcleos con figuras mitóticas al mismo tiempo (36 h), momento en el cual el 80 % de las semillas presentan protrusión de la radícula (Figura 7) (Baíza y Sánchez-de-Jiménez 1989; Baíza *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 1991).

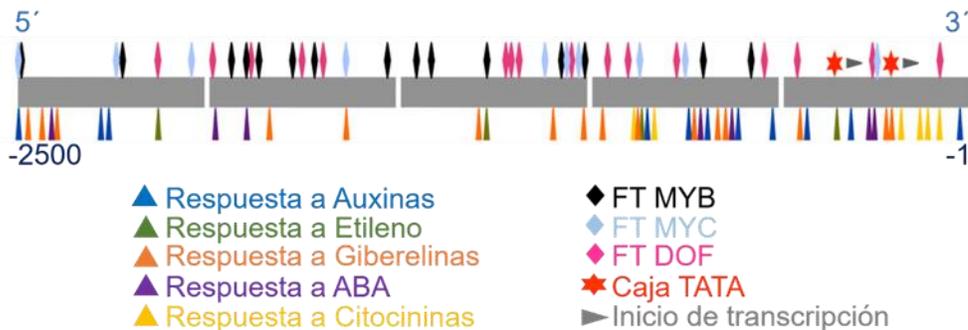


**Figura 7. Tiempos del ciclo celular en distintos tejidos meristemáticos durante la germinación del eje embrionario de maíz.** (A) Horas de imbibición en las que se detecta síntesis de DNA (Fase S). (B) Horas de imbibición en que se observan las primeras figuras mitóticas (Fase M). Datos obtenidos de Baíza y Sánchez-de-Jiménez 1989; Baíza *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 1991.

La transición de división a diferenciación celular está parcialmente detonado y fortalecido por la disminución de proteínas del ciclo celular y especialmente el decaimiento de las ciclinas en el citoplasma (Mews *et al.*, 2000).

## 2.3 CycD2,2

Se conoce que la región promotora de CYCD2;2 (Figura 8) contiene elementos cis-reguladores de respuesta a diversas fitohormonas y sitios de unión a factores de transcripción, distribuidos diferencialmente (Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008).

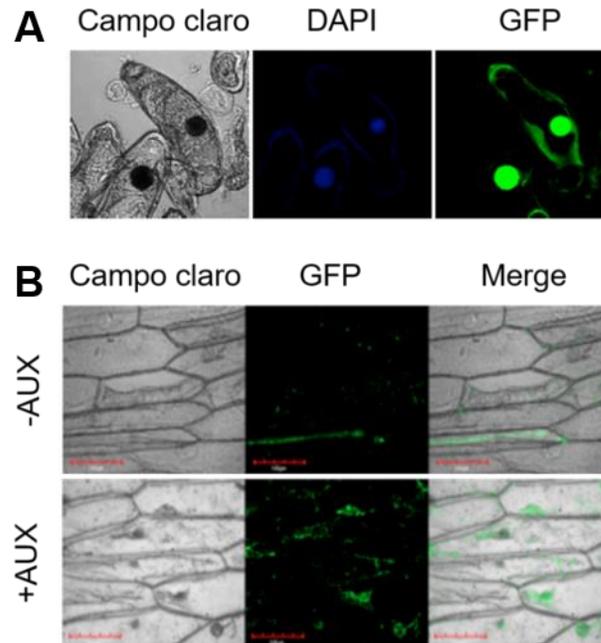


**Figura 8. Estructura del promotor de CYCD2;2.** Bravo-Alberto, 2011.

Durante la germinación se ha estudiado la expresión del transcrito de CYCD2;2, en presencia de azúcares (sacarosa 60 mM, 120 mM y glucosa 120 mM), encontrándose a las 24 h de imbibición un aumento en la transcripción para sacarosa a ambas concentraciones, no así para glucosa, con la que disminuye. En cuanto a la proteína, se ha encontrado presente en semilla seca y con incremento de sus niveles a las 6 h de la germinación para después caer gradualmente hacia las 24 h, patrón que sucede en todos los tratamientos. No obstante, en sacarosa 120 mM los niveles son menores y nunca presentan pico de abundancia como sucede a las 36 h en presencia de glucosa (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2017).

En cuanto a las fitohormonas, la citocinina y ácido abscísico en el medio de imbibición adelantan y atrasan la expresión, respectivamente. Sin embargo, no se modifica el patrón de acumulación de la proteína, ni el de la actividad de cinasa asociada a esta ciclina, sugerencia de modificaciones post-traduccionales (Gutiérrez *et al.*, 2005). Sólo las auxinas en conjunción con la sacarosa estimulan notablemente la expresión de esta ciclina (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos,

2006), esto fue comprobado posteriormente mediante un ensayo de expresión transitoria, en el que la adición de auxinas indujo la expresión del gen reportero de *CYCD2;2* (Figura 9) (Bravo-Alberto, 2011).

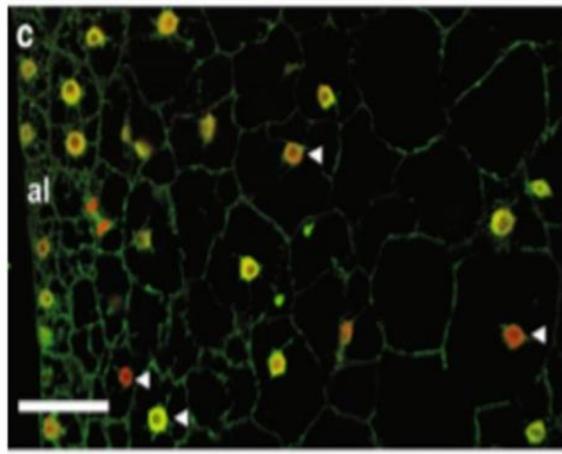


**Figura 9. Fluorescencia de la proteína GFP-GUS fusionada al fragmento distal del promotor de *CYCD2;2* (-873 a -1 bp).** (A) Transformación en cultivos de callos embriogénicos de maíz. (B) Transformación en células de epidermis de cebolla en ausencia y en presencia de auxinas. Modificado de Bravo-Alberto, 2011.

Además, *CycD2;2* forma complejos con CDKA y CDKB. La asociación con CDKA, así como el pico de actividad asociado a cinasa sobre RBR a las 15 h de imbibición, son características del papel principal de las ciclinas D en la fase G1 y transición G1/S. Interesantemente, la presencia de complejos activos de CDKB/*CycD2;2* durante la germinación, sugiere que también podría participar en la regulación, aunque en menor proporción, de las fases G2 y M, y en la transición de estas, cuando las CDKBs deben estar activas (Godínez-Palma *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Localización tisular y subcelular

La expresión de *CycD2;2* en hojas de maíz es elevada en células que se encuentran en división constante y disminuye conforme las células se alejan de la zona de proliferación y se acercan a la zona de diferenciación y crecimiento celular (Li *et al.*, 2010). Asimismo, en plántula de maíz de 4 días, se ha reportado la expresión de *CycD2;2* en tejidos meristemáticos (RAM, base de la raíz, coleoptilo y SAM) (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).



**Figura 10. Localización de *CycD2;2* en la semilla de maíz durante el desarrollo del endospermo.** Anticuerpo anti *CycD2;2* (mostrado en verde), DNA teñido con To-Pro-3-iodide® (mostrado en rojo). Barras= 50  $\mu$ m. Modificado de Dante *et al.*, 2014.

Durante el desarrollo del endospermo de maíz *CycD2;2* está presente durante todo el proceso y en todo el endospermo. En la fase mitótica, la ciclina tiene localización citoplásmica y nuclear. En este estado de desarrollo no existe gran diferencia de localización de la ciclina entre el endospermo periférico y el central. En contraste, en la fase endoreduplicativa, *CycD2;2* se encuentra en agregados citoplásmicos, principalmente en las células de las tres capas más externas. En esta misma fase, *CycD2;2* muestra localización nuclear con niveles variables en las células centrales del endospermo. Las diferencias en su localización citoplásmica o nuclear, dependiente de la fase de desarrollo, es un indicativo de la regulación del ciclo celular dentro de un tejido que contiene células que progresan en el ciclo celular de manera asincrónica (Figura 10) (Dante *et al.*, 2014).

Es así que la localización subcelular, actividad y asociación, sugieren que CycD2;2 pudiera tener función en la estimulación del ciclo celular mitótico y endoreduplicativo (Dante *et al.*, 2014).

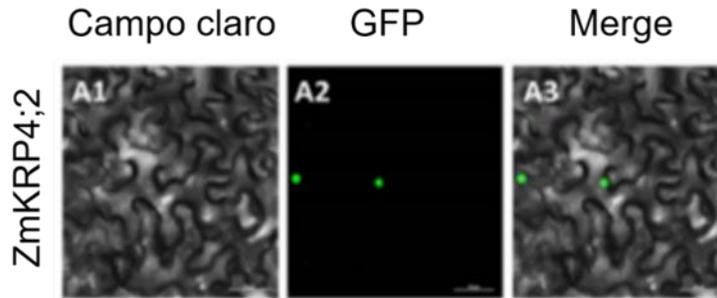
## **2.4 KRP4;2**

Durante el desarrollo del endospermo de maíz, la expresión de *KRP4;2* mantiene niveles casi constantes durante los días 7-21 después de la polinización sugeriendo que *KRP4;2* tiene un rol positivo en células en endoreduplicación (Coelho *et al.*, 2005). También durante la germinación del maíz la expresión del gen se mantiene constante (De Jesús-Juárez *et al.*, 2008, Godínez-Palma *et al.*, 2017). De igual forma, la proteína no presenta cambios en ambos procesos de desarrollo (Coelho *et al.*, 2005, De Jesús-Juárez *et al.*, 2008).

A diferencia de las KRPs de Arabidopsis, se ha demostrado que *KRP4;2* de maíz, además de poder inhibir la actividad de CDK asociada a CycD2;2 y CycD4;2 (Godínez-Palma *et al.*, 2017), también inhibe la asociada a CycA1 (Coelho *et al.*, 2005) la cual puede formar complejos con CDKA (Dante *et al.*, 2014). Además, su acumulación no es estimulada por ABA ni disminuida en presencia de Benziladenina (De Jesús-Juárez *et al.*, 2008).

### **2.4.1 Localización tisular y subcelular**

Se ha reportado la expresión de *KRP4;2* en tejidos proliferativos (base de la hoja, punta de raíz) y en tejidos con diferenciación (punta de la hoja y coleoptilo) (Godínez-Palma *et al.*, 2017). Respecto a su localización subcelular, sólo mediante expresión transitoria en hoja de *Nicotiana benthamiana* se ha observado en núcleo (Figura 11) (Xiao *et al.*, 2017).



**Figura 11. Localización subcelular de ZmKRP4;2.** (A1) muestra las células de tabaco en campo claro, (A2) muestra la localización de la proteína de fusión ZmKRP-eGFP en el campo de GFP, y (A3) es el merge de las imágenes A1 y A2. Barra= 50  $\mu$ m. Modificado de Xiao et al., 2017.

## 2.5 Efectos de glucosa y sacarosa en la germinación del eje embrionario de maíz

Recientemente se estudió el efecto de los azúcares en el medio de imbibición durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Las células meristemáticas en tratamientos con glucosa muestran el menor diámetro celular y la mayor densidad; en sacarosa, el tamaño y la densidad son intermedias. En contraste, en buffer de imbibición (BI), las células muestran los mayores tamaños y la menor densidad (Lara-Núñez *et al.*, 2017).



**Figura 12. Morfología de los ejes embrionarios de maíz a las 72 h de imbibición en buffer de imbibición (BI), Sacarosa o Glucosa 120 mM (A-C).** C, coleoptilo; PR, raíz primaria; AR, raíces adventicias. Barras: A= 5 mm. Modificado de Lara-Núñez et al., 2017.

Además, el estímulo de glucosa y sacarosa modifica la localización subcelular de CycB1;2 (marcador de fase M) en células del RAM del eje embrionario de maíz (García-Ayala, 2015).

En estado post-germinativo las morfologías contrastantes sugieren que glucosa y sacarosa tienen roles independientes pero importantes en el programa morfogenético, proponiéndose que la glucosa podría estar manteniendo el programa de proliferación, mientras que la sacarosa probablemente regula la diferenciación y maduración del eje embrionario de maíz (Figura 12, Tabla 3) (Lara-Núñez *et al.*, 2017).

**Tabla 2. Efectos morfológicos de los azúcares en el medio de imbibición a los 7 días de la germinación de ejes embrionarios.**

Característica	Tratamiento		
	Buffer de imbibición (BI)	Sacarosa 120 mM	Glucosa 120 mM
<b>Peso fresco (mg)</b>	18-22	22-27	30-40
<b>Longitud (cm)</b>	1.2	1.2-1.3	1.3-1.5
<b>Morfología<sup>1</sup></b>	Sin cambios	Alargada	Torcida
<b>Raíz primaria</b>	Corta	Alargada	Alargada y delgada
<b>Pelos radiculares</b>	No	Sí	No
<b>Coleoptilo</b>	Corto	Alargado	Alargado
<b>Raíces Seminales</b>	No	Varias	Pocas
<b>Estructuras tipo callo<sup>2</sup></b>	No	No	Sí
<b>Tamaño de células en RAM</b>	Grandes	Intermedias	Pequeñas
<b>Síntesis de novo de DNA (%)<sup>3</sup></b>	30.2	37.0	58.1

<sup>1</sup>Respecto a la observada a 72 horas de imbibición, <sup>2</sup>en raíces seminales o adventicias, <sup>3</sup>medido mediante incorporación de EdU. Datos obtenidos de Lara-Núñez *et al.*, 2017.

## 2.6 Efectos del IAA en la germinación del eje embrionario de maíz

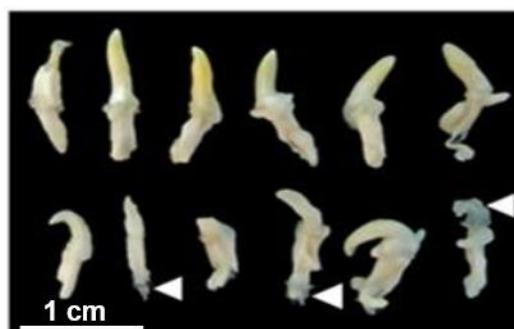
Es conocido que la respuesta de la fitohormona ácido indol-3-acético involucra la presencia de azúcares (Lilley *et al.*, 2012; Sairanen *et al.*, 2012; Stokes *et al.*, 2013), por tanto, ya que el estudio de la germinación del eje embrionario requiere retirar el endospermo y mayor parte del escutelo, en el laboratorio donde se realizó el

presente trabajo, los ejes se imbiben en una combinación de **ácido indol-3-acético 1  $\mu$ M-sacarosa 60 mM**, solución que se ha denominado como únicamente **IAA**, término que será utilizado en la continuación del documento.

En las primeras horas de la germinación del eje embrionario de maíz en presencia de IAA, el peso fresco aumenta, así como la longitud. Sin embargo, en el proceso post-germinativo los ejes ya no aumentan de masa ni de longitud, además presentan formación de estructuras tipo callo (Garza-Aguilar *et al.*, 2017) (Tabla 3, Figura 13).

**Tabla 3. Efectos morfológicos del IAA en el medio de imbibición a 48h de la germinación de ejes embrionarios**

Característica	IAA
Peso fresco (mg)	23-27
Longitud (cm)	<1.0
Estructuras tipo callo	sí



**Figura 13. Morfología de los ejes embrionarios de maíz a las 48 h de imbibición con IAA 1  $\mu$ M.** Las puntas de flecha indican la presencia de estructuras tipo callo. Barra= 1 cm. Modificado de Garza-Aguilar *et al.*, 2017.

Por otra parte, el IAA parece tener un papel de regulador positivo del ciclo celular al estimular la síntesis de DNA (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006), la expresión de genes de *CYCD* (Buendía-Monreal *et al.*, 2011) así como la actividad de los complejos CycD/CDKA asociados a CycD4 y CycD5 (Lara-Núñez *et al.*, 2008).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que los reguladores del crecimiento de plantas pueden modular diversos procesos durante la germinación de semillas, y que el ciclo celular es la base para el establecimiento de la germinación, nuestro grupo ha estudiado la relación entre los reguladores del crecimiento y el ciclo celular tomando como modelo la germinación de ejes embrionarios de maíz. Se sabe que la abundancia y actividad de marcadores del ciclo celular pueden variar en presencia de ciertas fitohormonas y carbohidratos, aunque no siempre se mantiene esta relación. Además se conoce que la función dentro del ciclo celular de algunos de estos marcadores depende de su localización citoplásmica y/o nuclear, por lo que sería relevante para una comprensión más amplia de la regulación del ciclo celular investigar la distribución tisular y subcelular de marcadores clave de este proceso en ausencia y presencia de reguladores de crecimiento durante la germinación del eje embrionario de maíz.

### **4. HIPÓTESIS**

Bajo la influencia de agentes que estimulan la proliferación (sacarosa, glucosa e IAA) a diferentes tiempos en la germinación del eje embrionario de maíz, la CycD2;2 se encontrará principalmente en tejidos proliferativos, localizándose tanto en citoplasma como en núcleo, mientras que KRP4,2 se encontrará mayormente en tejidos con baja proliferación celular y con una localización nuclear.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar si existe relación entre la distribución tisular y subcelular de CycD2;2 y KRP4;2 con el estado proliferativo de tejidos del eje embrionario de maíz en presencia de reguladores de crecimiento

## 5.1 OBJETIVO PARTICULAR

- Determinar la localización tisular y subcelular de CycD2;2 y KRP4;2 en ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación (0, 18 y 36 h) en medio de imbibición sin y con sacarosa 120 mM, glucosa 120 mM o IAA.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Imbibición de ejes embrionarios de maíz**

Los ejes embrionarios de maíz fueron disectados de semillas secas, se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio al 0.17 %, en agitación por 10 minutos y se lavaron con agua destilada estéril hasta perder el olor a cloro. En seguida se incubaron en buffer de imbibición Tris-HCl 50 mM pH 7.4, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM (BI), enriquecido con sacarosa 120 mM (Sac), glucosa 120 mM (Glu) o ácido indol-3-acético 1 μM-sacarosa 60 mM (IAA) en cajas Petri estériles sobre papel filtro Whatman estéril y se incubaron el tiempo necesario en estufa a 25°C en oscuridad.

### **6.2 Preparación de muestras para microscopía (Inclusión y corte de tejidos)**

Después de la imbibición, los ejes se fijaron inmediatamente en formaldehído al 4 % (v/v) en amortiguador PBS 1X por 1 hora, seguido de lavados con PBS 1X cinco veces, por 10 minutos cada lavado. Directamente se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (30- 100 %) por una hora cada concentración, más 25 minutos de cada proporción de etanol-xilol (3:1, 2:2, 1:3) y 30 minutos de xilol 100 %. Enseguida se embebieron en Paraplast. Secciones longitudinales del tejido, de 8-10 μm de grosor, fueron obtenidas usando un microtomo rotatorio. Los cortes se colocaron en portaobjetos especiales Premium Charged Fine Ground Edge 25x75x1 mm para los ensayos de fluorescencia.

Para el uso de los cortes se desparafinaron colocando el tejido en estufa a 60°C por 12 horas, posteriormente se hidrató en una serie de concentraciones graduales de etanol (100-30 %) durante 3 minutos cada una.

### **6.3 Inducción y purificación de proteínas recombinantes**

La inducción de la proteína recombinante GST-CycD2;2 se llevó a cabo en un volumen total de 250 mL de medio LB. La inducción se realizó por 4 h a 37°C con una concentración de 1mM de IPTG. La proteína recombinante fue purificada utilizando la columna de afinidad Glutathione Sepharose como sigue: después de centrifugar el extracto celular a 6000 rpm/15 min el pellet se resuspendió en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0) al cual se adicionó en fresco 1 tableta de cocktail de inhibidores de proteasas Complete Mini, y se incubó por 30 min en hielo con 1 mg/mL de lisozima. El lisado se sonicó 4 veces por ciclos de 20 segundos a una amplitud de 20 % en un equipo Vibra Cell VC505. Después se adicionó Tritón X-100 al 1 % v/v en PBS 1X por 30 min y se centrifugó a 12000 rpm/15 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm. La fracción soluble se pasó 5 veces por la columna de afinidad y se realizaron 6 lavados con PBS 1X Tritón X-100 1% v/v para eliminar las proteínas no-unidas a la resina. Finalmente, la proteína recombinante se eluyó con Glutión 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.8 con PMSF y Benzamidina 1 mM (Gutiérrez *et al.*, 2005).

La proteína recombinante purificada GST-KRP4;2 fue donada por el estudiante de licenciatura Aldo Tonatiuh Lemus Enciso (Lemus-Enciso, 2019)

### **6.4 Especificidad del anticuerpo anti-CycD2;2 y anti-KRP4,2 en inmunohistoquímica**

La especificidad del anticuerpo primario es un componente crítico en experimentos de inmunohistoquímica (IHQ), siendo no suficiente la detección de una banda única por Western blot (WB), donde las proteínas están sujetas a condiciones de desnaturalización, alterando la estructura de la proteína y facilitando el reconocimiento del epítipo, mientras que en inmunohistoquímica las proteínas se mantienen en su estado nativo y el epítipo puede estar enmascarado o inaccesible.

Para la validación de los anticuerpos anti-CycD2;2 y anti-KRP4;2 se realizaron ensayos de competencia mediante inmovilización del antígeno en membrana de PVDF (Polivinildifluoruro). Para el anti-Cyc2;2 se utilizaron 20 y 200 µg de proteína recombinante GST-CycD2;2, y para el anti-KRP4;2 20 y 100 µg de GST-KRP4,2. Como control negativo se utilizaron 200 y 100 µg de BSA, respectivamente. Una vez fijadas las proteínas recombinantes y el BSA, se cortó la banda y se incubaron en un microtubo con los anticuerpos correspondientes en solución de buffer de bloqueo para inmunohistoquímica. Se incubaron a 4°C, toda la noche en un rotador de tubos (Boekel, modelo 260750). En paralelo se incubó el anticuerpo sin antígeno (NC, anticuerpo no competido). Después, los anticuerpos en solución fueron utilizados para inmunolocalizar a CycD2;2 y KRP4;2 en cortes de ejes embrionarios de maíz (Figura 14 A y 18 A).

La cuantificación de la intensidad del fluoróforo de las microfotografías obtenidas correspondiente a la señal de cada anticuerpo se relacionó a la intensidad en NC (Figura 14 B y 18 B).

### **6.5 Inmunolocalización con recuperación antigénica**

Para exponer al antígeno, los cortes se desparafinaron colocando el tejido en la estufa a 60°C por 12 horas, posteriormente se hidrató en una serie de concentraciones graduales de etanol (100-30 %) durante 3 minutos cada una.

Se calentó a 60°C en solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6) en estufa por 10 minutos 2 veces, dejándose enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 15 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X por 5 minutos y se procedió a permeabilizar con solución Tritón X-100 al 0.5 % en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente seguido de 2 lavados con PBS 1X por 5 minutos.

Inmediatamente después, los cortes se aislaron marcando el contorno con Liquid Blocker y se bloquearon con buffer de bloqueo (BSA 3% m/v, azida de sodio 0.01 % m/v y Tritón X-100 0.1 % v/v) por 2 horas en cámara húmeda y se lavaron 3 veces con PBS 1X por 10 minutos cada uno. Se incubó con el anticuerpo primario a 4°C

toda la noche, en una dilución 1:200 para anti-CycD2;2 y de 1:20 para anti-KRP4;2. Una vez terminado el tiempo de incubación se lavaron primero 2 veces con PBS 1X, seguido de 2 lavados con PBST 1X (PBS 1X, NaCl 1 M, Tween 20 1.8 % v/v), y se terminó con un lavado de PBS 1X. Cada lavado se realizó por 10 minutos. Después, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución 1:200) conjugado con un fluoróforo (Alexa 488) por 4 horas a temperatura ambiente, sin agitación, en oscuridad y en cámara húmeda. Para retirar el exceso de anticuerpo se lavaron 3 veces con PBS 1X por 10 minutos cada lavado. Se prepararon en medio de montaje con DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) para fluorescencia. Por último, se sellaron con barniz de uñas transparente y se almacenaron a 4°C. Las muestras se visualizaron en microscopio confocal de fluorescencia Olympus™ FV 1000.

### **6.6 Cuantificación de intensidad de fluoróforo en tejido y núcleo**

La intensidad de fluoróforo de las microfotografías (Anexos 1-2) se realizó utilizando el software Fiji-Image J (versión 1.52C).

Para la cuantificación en núcleo se seleccionaron las regiones de interés (ROIs) correspondientes a los núcleos y se cuantificó la intensidad de fluoróforo de CycD2;2 y KRP4;2 en este organelo.

Para el diseño de los mapas de calor las cuantificaciones obtenidas, tanto tisular o nuclear, se relacionaron las intensidades por tiempos y tratamientos a la intensidad de fluoróforo a 0 h de imbibición.

### **6.7 Análisis estadístico**

El análisis estadístico consistió en una ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05 y 0.01, comparando los tratamientos del mismo tiempo de germinación para el análisis.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la germinación de semillas los cambios morfológicos visibles están ligados a la estimulación del ciclo celular en los diferentes meristemas, jugando el RAM un papel importante en la emergencia de la raíz (Masubelele *et al.*, 2005).

La germinación de *Arabidopsis* sucede de manera secuencial. Las primeras divisiones celulares se observan en el RAM, después en los cotiledones y en el SAM, y por último en los meristemas secundarios. Respecto al RAM, la activación del ciclo celular sucede primero en las células de las capas más externas de la raíz, por ejemplo, epidermis y después se extiende gradualmente hacia el centro de la raíz (Masubelele *et al.*, 2005).

Al igual que en *Arabidopsis*, en la germinación del eje embrionario de maíz no todos los tejidos meristemáticos entran simultáneamente en división celular (Baíza *et al.*, 1989). Sin embargo, a diferencia de la dicotiledónea, las primeras divisiones celulares ocurren en el mesocotilo y no el meristemo apical de la raíz.

Las regiones meristemáticas pueden tener diferente tamaño dependiendo del tipo de tejido (Alarcón *et al.*, 2016). En el RAM de maíz, la longitud a partir de la punta de la raíz a la cual las células dejan de dividirse es tejido específico y es reflejo de la distancia a la cual dejan de detectarse las proteínas del ciclo celular. Así, la transición de la división celular a la diferenciación está en parte impuesta por la desaparición de las proteínas del ciclo celular, especialmente a la disminución de las ciclinas en el citoplasma (Mews *et al.*, 2000).

Para encontrar pistas de la relación entre el ciclo celular y los mecanismos regulatorios involucrados en el desarrollo de la planta, es importante investigar los patrones tisulares o celulares particulares en que están presentes los reguladores clave del ciclo celular (Wang *et al.*, 2004).

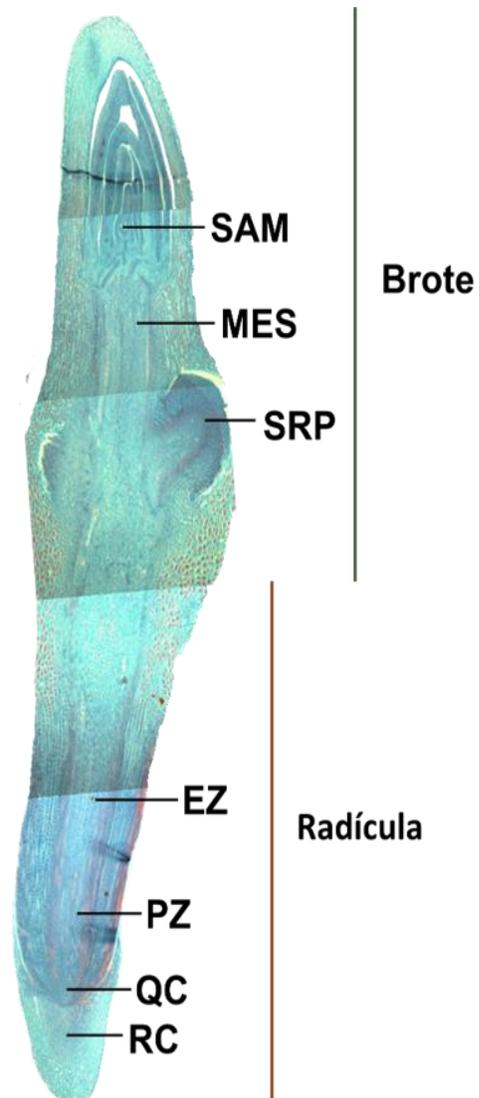
La información de localización es de suma importancia dada la capacidad de regulación de los tejidos multicelulares sobre los niveles de las proteínas del ciclo celular (Curtis *et al.*, 1995, Del Pozo y Estelle, 1999).

Es así que el presente estudio hace uso de anticuerpos para la detección de proteínas del ciclo celular durante la germinación del eje embrionario de maíz, para proveer información de localización de las proteínas, datos que no se han establecido en estudios anteriores en los que se ha medido la expresión del gen o de la proteína sin distinguir entre las regiones meristemáticas ni entre zonas de proliferación y elongación.

### **7.1 Identificación de tejidos del eje embrionario de maíz**

Cortes histológicos de eje embrionario se utilizaron para permitir el acceso del anticuerpo sin la necesidad de permeabilizar las células con enzimas hidrolíticas y detergentes, o de solventes para alterar la permeabilidad de las membranas. Lo que causa pérdida de proteínas y reduce la detección de proteínas. La posibilidad de la pérdida de las proteínas ocurre en cualquier técnica dependiente de la fijación de tejidos, sin embargo, se mantienen los patrones distintivos de cada proteína (Mews *et al.*, 1997).

Los tejidos del eje embrionario de maíz donde se analizó la localización de las proteínas fueron seleccionados de acuerdo a sus tiempos de división celular. Para la radícula: cofia (RC), centro quiescente (QC), zona de proliferación (PZ) y zona de elongación (EZ). Para el brote: primordio de la raíz seminal (SRP), mesocotilo (MES) y meristemo apical del brote (SAM) (Figura 14). Para fines didácticos, a partir de esta sección se ocupan las abreviaturas asignadas.

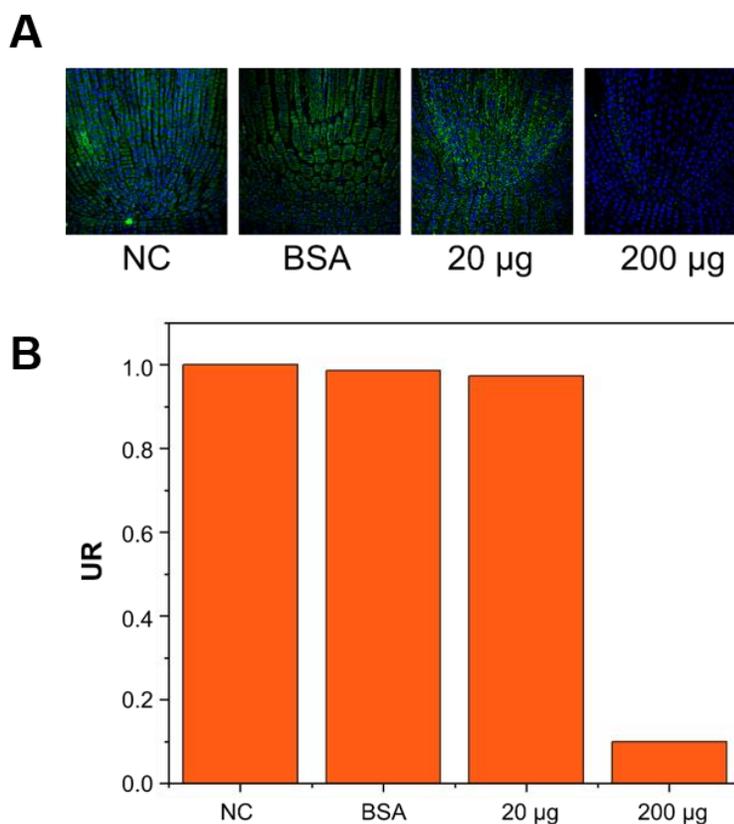


**Figura 14. Identificación de los tejidos del eje embrionario de maíz analizados en este estudio.** RC, cofia; QC, centro quiescente/meristemo proximal; PZ, zona de proliferación; EZ, zona de elongación; SRP, primordio raíz seminal; MES, mesocotilo; SAM, meristemo apical del brote.

## 7.2 CycD2;2

### 7.2.1 Especificidad del anticuerpo anti-CycD2,2 en inmunohistoquímica

La especificidad del anticuerpo anti-CycD2;2 en inmunohistoquímica fue ensayada mediante preincubación del anticuerpo con concentraciones crecientes de la proteína recombinante GST-CycD2;2 inmovilizada y después, el anticuerpo en solución fue utilizado para identificar a la proteína CycD2;2 en cortes de tejido embrionario de maíz. La Figura 15 muestra la disminución de la intensidad del fluoróforo respecto al incremento de la cantidad de proteína recombinante, validando el reconocimiento específico de CycD2;2. También se observa que el control negativo, proteína BSA, no interfirió en la detección de CycD2;2.



**Figura 15. Especificidad del anticuerpo anti-CycD2;2.** (A) Microfotografías de la competencia del anticuerpo anti-CycD2;2. (B) Cuantificación de la señal del anticuerpo anti-CycD2;2 en (A). Anticuerpo anti-CycD2;2 (mostrado en verde), DNA teñido con DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) (mostrado en azul). NC, anticuerpo no competido; UR, unidades relativas de intensidad de fluoróforo.

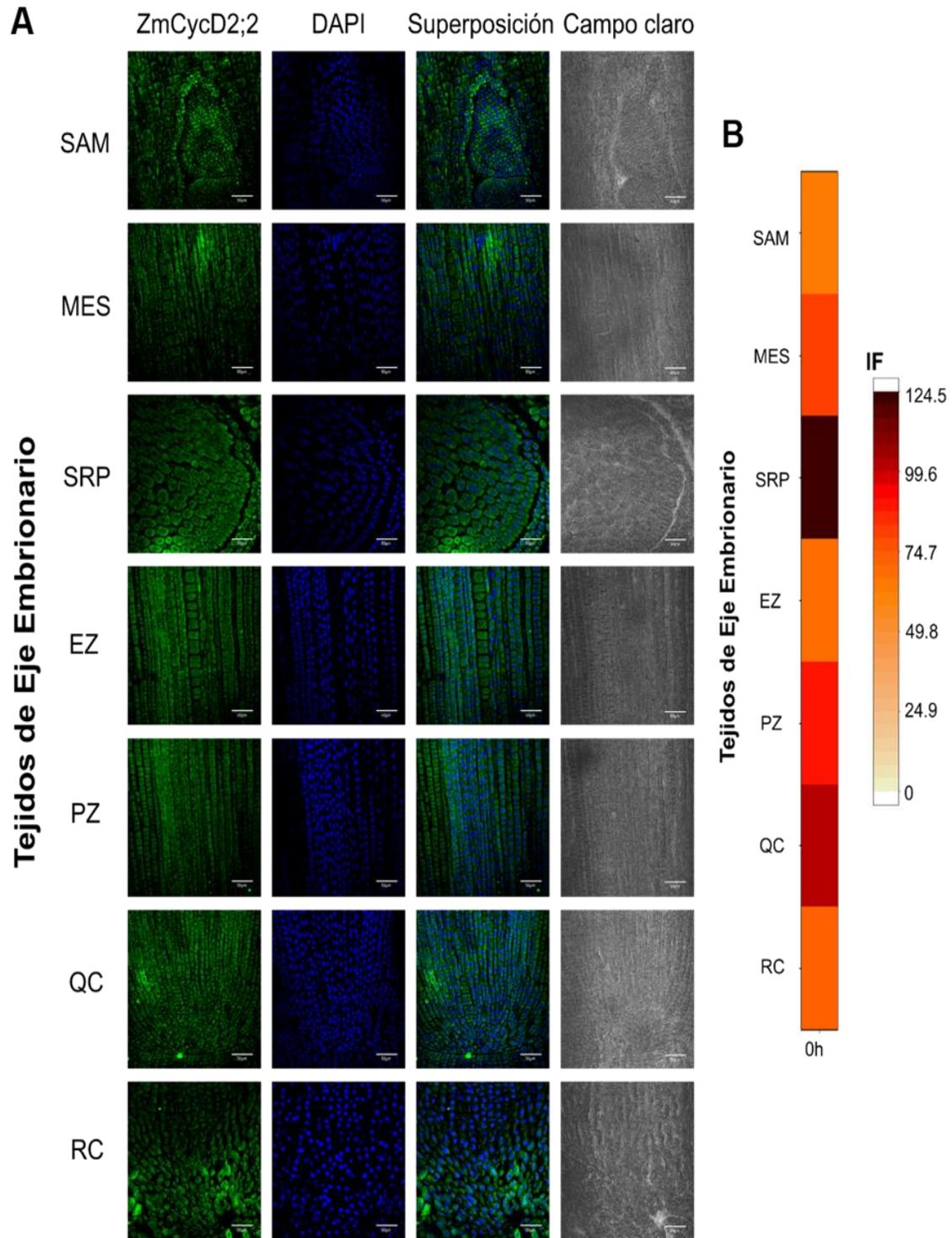
### 7.2.2 Localización tisular de CycD2;2

Se sabe que las CycDs están presentes en tejidos proliferativos durante la germinación de las semillas, además, en *Arabidopsis* se asocian al desarrollo del cambium vascular durante los procesos post-germinativos. Sabiendo que la CycD2;2 participa activamente durante las primeras horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz, se realizó la inmunolocalización de esta ciclina.

Se observa que a las 0 h (Figura 16) CycD2;2 está presente en todos los tejidos analizados, mayormente en las regiones de proliferación de raíces (QC, PZ y SRP). Este patrón es similar al reportado para AtCycD2;1 la cual se ha encontrado distribuida a lo largo de la raíz, con mayor presencia en el ápice y los meristemos de raíces laterales (Sanz *et al.*, 2011) y al descrito para la expresión del gen de CYCD2;2 de maíz (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006; Buendía-Monreal, *et al.*, 2008), este último está más representado en el RAM y en el coleoptilo.

En el tratamiento con BI, a las 18 h de imbibición, CycD2;2 disminuye de forma general en todos los tejidos. No obstante, a las 36 h de imbibición se incrementa, principalmente en EZ y SAM (Figura 17). Se ha reportado que en ausencia de señales mitogénicas el gen de esta ciclina es inducido durante la germinación de ejes embrionarios, sin embargo, la proteína se mantiene relativamente constante con un ligero aumento a las 36 h (Lara-Núñez *et al.*, 2017), lo que correlaciona con el resultado observado en este estudio.

En el caso del tratamiento con sacarosa, a las 18 h, hay disminución de CycD2;2 de forma semejante en todos los tejidos analizados. Posteriormente, a las 36 h de imbibición, la proteína aumenta ligeramente en los tejidos RC, PZ, EZ y SRP, respecto a 18 h (Figura 17). Se conoce que la expresión del gen *CYCD2;1* de *Arabidopsis* es inducida en presencia de sacarosa (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000) y en tabaco el transcrito de *CYCD2;1* se acumula predominantemente en células proliferativas (Sorrell, *et al.*, 1999). En maíz, el transcrito de la *CYCD2;2* también es inducido por sacarosa, pero la proteína presenta un patrón de



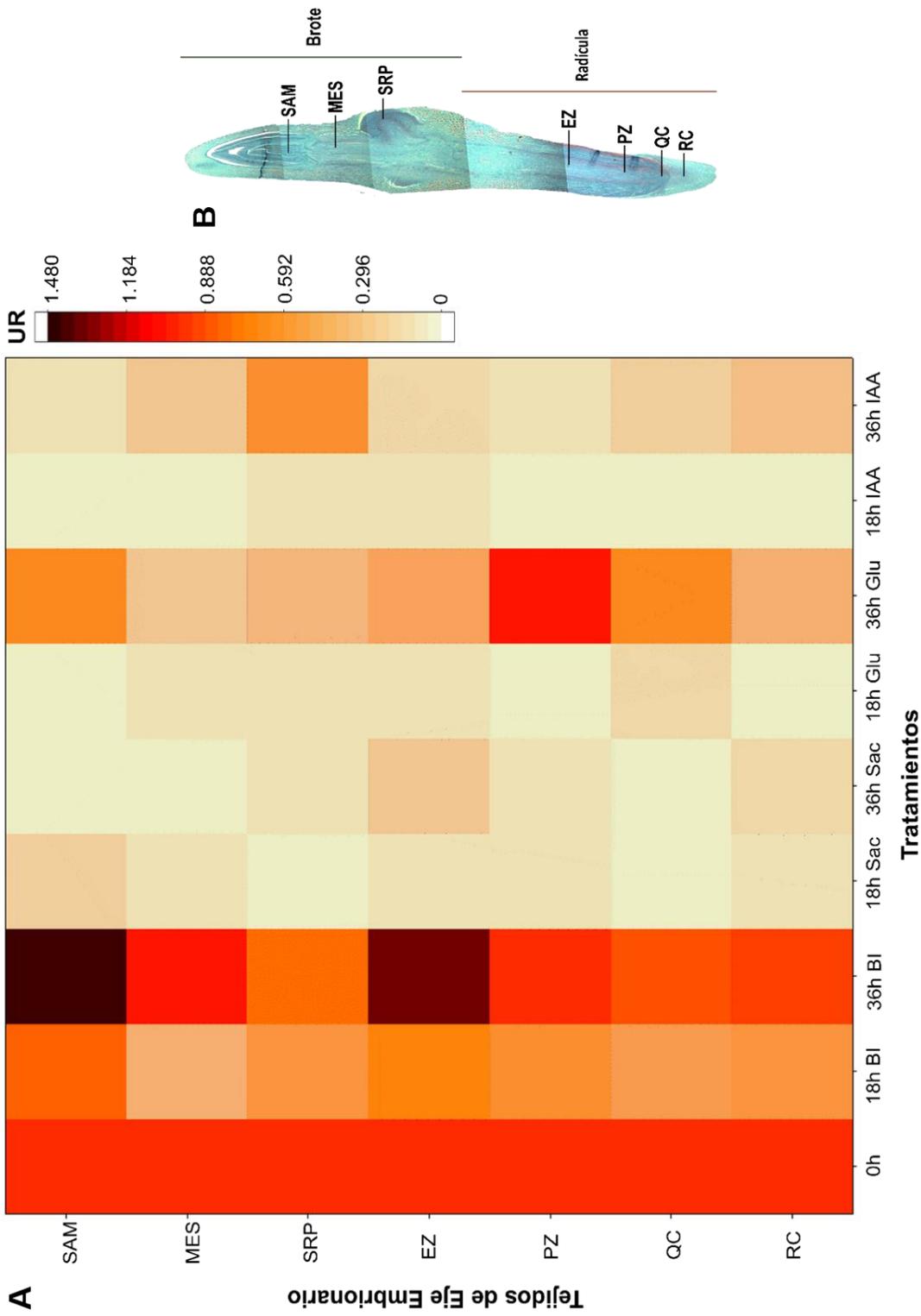
**Figura 16. Localización tisular de CycD2;2 en el eje embrionario de maíz a 0 h de imbibición.** (A) Microfotografías de localización tisular de la ZmCycD2;2. (B) Cuantificación de la intensidad del fluoróforo para anti-CycD2;2. Primera columna, anticuerpo anti-CycD2;2 (mostrado en verde); segunda columna, DNA teñido con DAPI (mostrado en azul); tercera columna, superposición de verde y azul; cuarta columna, campo claro. IF, intensidad de fluoróforo. Barras de escala= 50  $\mu$ m. Los tejidos mostrados se referencian en la Figura 13.

disminución hasta las 30 h, pero a las 36 h aumenta débilmente (Gutiérrez *et al.*, 2008; Godínez-Palma *et al.*, 2015; Lara-Núñez *et al.*, 2017). Además, la sacarosa favorece el desarrollo del RAM así como de la raíz seminal del embrión de maíz (Lara-Núñez *et al.*, 2017). Por tanto, la disminución inicial de CycD2;2 y posterior aumento en zonas proliferativas sugiere un efecto de localización tejido-específica para esta proteína en respuesta a la sacarosa como parte del control del desarrollo del eje embrionario.

Para el tratamiento con glucosa, al igual que con sacarosa, a las 18 h CycD2;2 disminuye en todos los tejidos. Sin embargo, contrario a la sacarosa, a las 36 h se observa un aumento general de CycD2;2 en el eje embrionario, siendo mayor en QC, PZ, EZ, SRP y SAM (Figura 17). En la germinación del eje embrionario de maíz, como respuesta a glucosa, hay inducción de la expresión del gen *CYCD2;2* y la proteína presenta un significativo aumento a las 36 h de imbibición, sugiriendo que en este tiempo ya está sucediendo el proceso post-germinativo (Lara-Núñez *et al.*, 2017). De igual forma, en plántulas de 4 días se ha reportado tanto la expresión de *CycD2;2* como la presencia de la proteína en tejidos meristemáticos y no meristemáticos (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006; Gutiérrez, 2004). Así, los resultados descritos en este trabajo, estarían confirmando la participación de CycD2;2 durante la post-germinación. Además, lo observado supondría un indicio más de la aceleración de la proliferación celular en respuesta a la señal mitogénica de la glucosa.

Cabe destacar que en los anteriores tratamientos parece haber una respuesta similar de localización tisular de CycD2;2, tanto en zona de proliferación (PZ, SRP) como de elongación/diferenciación (EZ), lo que concuerda con lo reportado durante el desarrollo del endospermo de maíz, donde la ciclina participa en la etapa celular mitótica y endoreduplicativa (Dante *et al.* 2014).

Por último, con el tratamiento de IAA, al igual que con los otros 3 tratamientos, a las 18 h CycD2;2 disminuye a lo largo de todo el eje embrionario. Posteriormente, a las 36 h, similar a glucosa, la proteína aumenta en todos los tejidos; siendo más notorio en el SRP (Figura 17). Se ha descrito que el ácido indol-3-acético en germinación



**Figura 17. Niveles tisulares de CycD2;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz.** (A) Mapa de calor mostrando las intensidades relativas de fluoróforo en cada tejido por tratamiento y tiempo de imbibición. (B) Localización de los tejidos del eje embrionario de maíz. BI, buffer de imbibición; Glu, glucosa; IAA, ácido indol-3-acético-sacarosa; Sac, sacarosa; UR, unidades relativas de intensidad de fluoróforo.

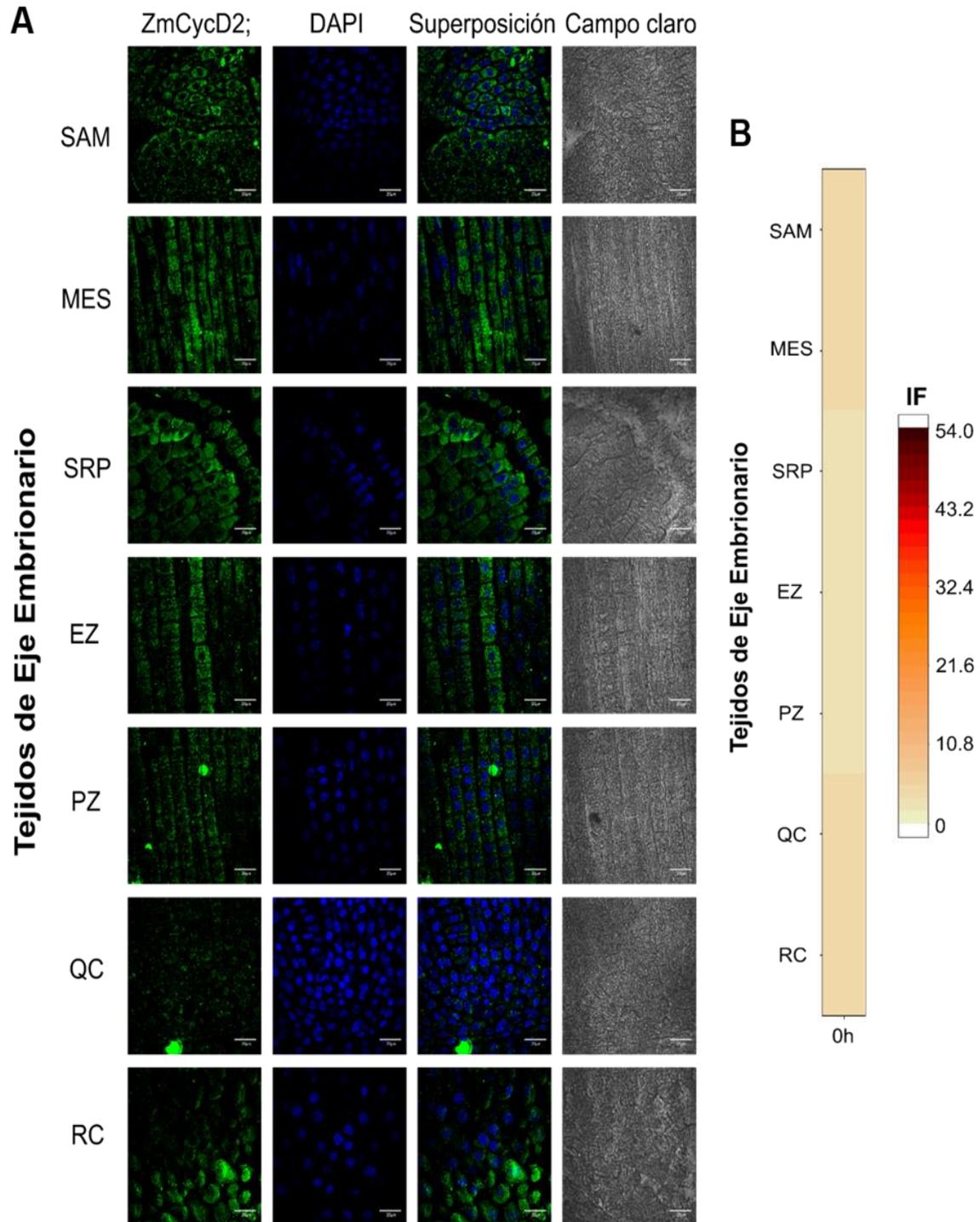
*in situ* del maíz induce el crecimiento de raíces seminales y secundarias (Martínez-de-la-Cruz, 2012), no obstante, la aplicación de IAA en la germinación *ex situ* promueve la formación y desarrollo de callos (Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha reportado la inducción del transcrito de CycD2;2 de maíz en presencia de IAA (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), aunque los niveles de proteína no se ven modificados (Arellano *et al.*, 2008). De tal forma que el resultado observado, sugiere que primero CycD2;2 disminuye en consecuencia de la reactivación del ciclo celular y después se concentra en tejidos con proliferación celular que dan lugar a raíces.

### **7.2.3 Localización subcelular de CycD2,2**

En *Arabidopsis* se ha descrito que la localización subcelular de CycD2;1 es dependiente de la progresión del ciclo celular, siendo nuclear en G1 para después desaparecer del núcleo cuando termina la replicación del DNA y antes de que comience la condensación de cromosomas durante la profase (Sanz *et al.*, 2011). Además, es una de las ciclinas que se ha localizado en el citoplasma, donde curiosamente, se han descrito la formación de complejos CycD2;1-PCNA (Boruc *et al.*, 2010; Strzalka *et al.*, 2015). De igual forma CycD2;2 también se localiza en citoplasma y núcleo de células del endospermo del maíz (Dante *et al.*, 2014).

En el presente trabajo, en todos los tratamientos y tejidos observados, CycD2;2 está presente en citoplasma (Anexo 1), mientras que el nivel de intensidad que refleja la presencia de esta proteína en el núcleo, muestra diferencias dependientes del tratamiento, las cuales se discuten a continuación.

A las 0 h de imbibición, la presencia en núcleo de CycD2;2, es ligeramente mayor en las regiones de proliferativas (QC,PZ, SRP, MES y SAM) a intensidades semejantes (Figura 18). En la semilla seca se ha descrito que la mayoría de las células en los tejidos meristemáticos se encuentran en fase G1 (Deltour y Jacmard, 1974), es así que la presencia en núcleo de CycD2;2 precisamente en estos tejidos podría indicar un paso preparativo de la célula para poder reiniciar el ciclo celular inmediatamente tras la entrada de agua.



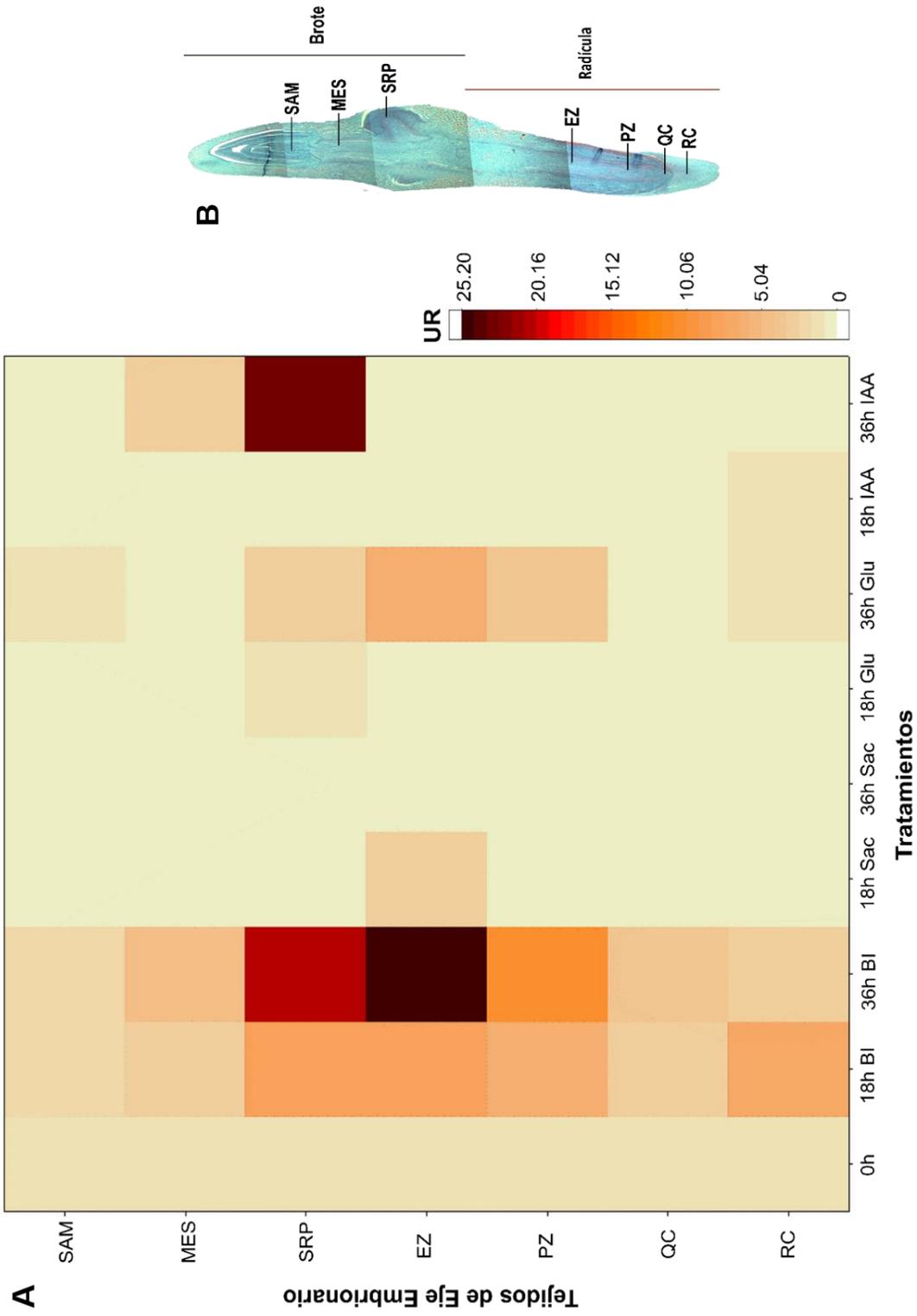
**Figura 18. Localización subcelular de CycD2;2 en el eje embrionario de maíz a 0 h de imbibición.** (A) Microfotografías de localización subcelular de la ZmCycD2;2. (B) Cuantificación de la intensidad del fluoróforo en núcleo para anti-CycD2;2. Primera columna, anticuerpo anti-CycD2;2 (mostrado en verde); segunda columna, DNA teñido con DAPI (mostrado en azul); tercera columna, superposición de verde y azul; cuarta columna, campo claro. IF, intensidad de fluoróforo. Barras de escala= 20  $\mu$ m. Los tejidos mostrados se referencian en la Figura 13.

Para el tratamiento BI, a las 18 h así como a las 36 h de imbibición, el nivel en núcleo de CycD2;2 aumenta en las regiones PZ, EZ y SRP (Figura 19). En ausencia de señales mitogénicas el RAM del eje embrionario de maíz presenta una lenta o casi nula proliferación (Lara-Núñez *et al.*, 2017; García-Ayala, 2017). En los resultados, la acumulación en núcleo de CycD2;2 podría estar indicando que la falta de señales proliferativas no impide la compartimentalización de la ciclina, sin embargo podría estar asociada a proteínas inhibidoras o en complejos no activos con CDKA que impidieran el avance del ciclo celular.

En el caso del tratamiento con sacarosa, a las 18 h, CycD2;2 disminuye en núcleo de forma semejante en todos los tejidos analizados, encontrándose por completo fuera de núcleo a las 36 h de imbibición (Figura 19). Se ha descrito que con sacarosa 120 mM, a las 18 h de imbibición la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran en fase S y que a las 36 h podría estar terminando la fase M de la germinación o bien comenzando el proceso post-germinativo (Lara-Núñez *et al.*, 2017). Por tanto, podemos asumir que CycD2;2 disminuye en núcleo como consecuencia del avance del ciclo celular general de los tejidos del eje embrionario derivado de la señal mitogénica de la sacarosa.

Para la imbibición con glucosa, al igual que con sacarosa, a las 18 h CycD2;2 disminuye en núcleo en todas las regiones analizadas. Sin embargo, a las 36 h la presencia nuclear de CycD2;2 aumenta en los tejidos PZ, EZ y SRP (Figura 19). En estudios anteriores se ha reportado que la glucosa acelera el ciclo celular en células del RAM, puesto que a las 18 h de imbibición estas están culminando la fase S del ciclo celular (Lara-Núñez *et al.*, 2017). Además, a las 36 h el aumento en la actividad asociada a CycB1;2 podría estar indicando que a este tiempo ya está terminando una segunda ronda de ciclo celular en el RAM del eje embrionario de maíz (Lara-Núñez, datos no publicados). Por lo tanto, el observar primero la disminución y posterior aumento de niveles nucleares de CycD2;2 podría ser otro indicio más de la aceleración del ciclo celular derivado de la señal mitogénica de la glucosa.

Por último, respecto al tratamiento IAA, a las 18 h de imbibición, hay bajos niveles de Cyc2;2 en núcleo para todos los tejidos observados. Este comportamiento se



**Figura 19. Niveles nucleares de CycD2;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz.** (A) Mapa de calor mostrando las intensidades relativas de fluoróforo en núcleos de cada tejido por tratamiento y tiempo de imbibición. (B) Localización de los tejidos del eje embrionario de maíz. BI, buffer de imbibición; Glu, glucosa; IAA, ácido indol-3-acético-sacarosa; Sac, sacarosa; UR, unidades relativas de intensidad de fluoróforo.

repite a las 36 h, con la única excepción del SRP, donde se observa un aumento de presencia nuclear de CycD2;2 (Figura 19).

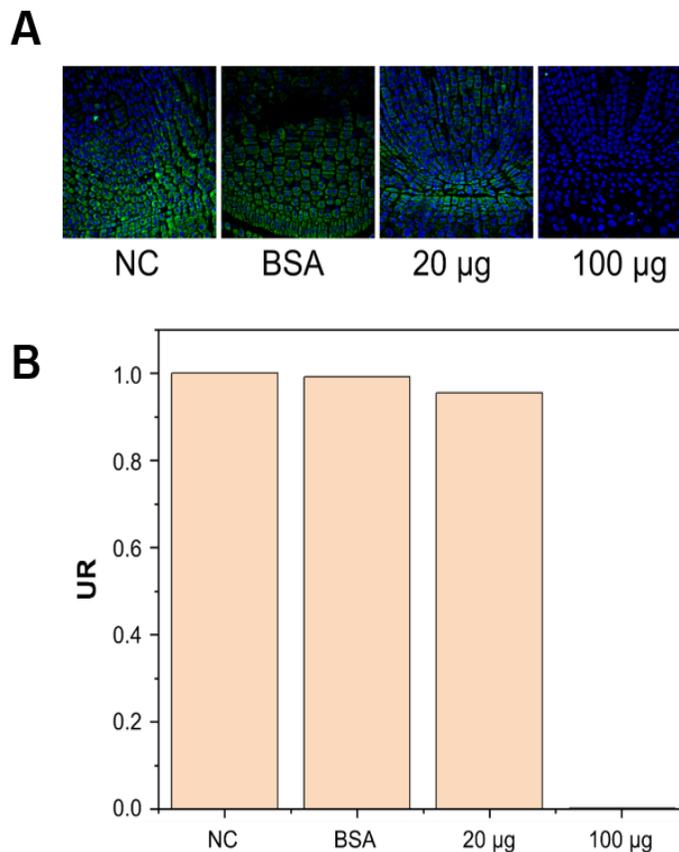
En maíz, se conoce que la mutante *rtcs* no forma primordio de raíz seminal en la etapa de desarrollo del embrión, ni primordio de raíces de corona derivadas del tallo, por tanto, carece de raíces seminales embrionarias y de raíces de corona. Tal fenotipo no puede ser rescatado aplicando auxina exógena (Hetz *et al.*, 1996). La noción de que no ocurre división celular es respaldada por la observación de que ninguna de las ciclinas (CycB1;1, CycB1;2, CycA1;1 y CycB2;1) se expresa en el nodo coleoptilar (Hochholdinger y Feix, 1998b). Por otra parte, durante la germinación de semilla de maíz en presencia de diferentes auxinas se ha visto el crecimiento de raíces seminales a las 72 h de imbibición (Martínez-de-la-Cruz, 2012). Aquí, los resultados observados sugieren que el aumento de CycD2;2 en núcleo para el SRP, podría ser un primer indicio de etapa temprana de división celular para el desarrollo de estas raíces en respuesta a IAA.

Como análisis complementario se hicieron pruebas estadísticas de la intensidad relacionada a anti-CycD2;2 en núcleo por zona entre los tratamientos a cada tiempo de imbibición (ANEXO 3 y 4). A las 18 h, no hay diferencias significativas entre glucosa e IAA, sugerencia de que la respuesta subcelular de CycD2;2 es similar ante estas señales mitogénicas. Posteriormente a las 36 h, existe diferencia entre todos los tratamientos, principalmente en los tejidos de la radícula, apuntando a una respuesta tejido-específica de activación del ciclo celular que da la sacarosa, la glucosa y el IAA, dado que se ha descrito que en etapa post-germinativa estimulan el desarrollo de diferentes tejidos del eje embrionario o raíz de *Z. mays*. (Martínez-de-la-Cruz *et al.*, 2015; Lara-Núñez *et al.*, 2017).

## 7.3 KRP4;2

### 7.3.1 Especificidad del anticuerpo anti-KRP4;2 en inmunohistoquímica

La especificidad del anticuerpo anti-KRP4;2 en inmunohistoquímica fue ensayada mediante preincubación del anticuerpo con concentraciones crecientes de la proteína recombinante GST-KRP4;2 inmovilizada y después, el anticuerpo en solución fue utilizado para identificar a la proteína KRP4;2 en cortes de tejido embrionario de maíz. La Figura 20 muestra la disminución de la intensidad del fluoróforo respecto al incremento de la cantidad de proteína recombinante, validando el reconocimiento específico de KRP4;2. También se observa que el control negativo, proteína BSA no interfirió en la detección de KRP4;2.



**Figura 20. Especificidad del anticuerpo anti-KRP4;2.** (A) Microfotografías de la competencia del anticuerpo anti-KRP4;2. (B) Cuantificación de la señal del anticuerpo anti-KRP4;2 en (A). Anticuerpo anti-KRP4;2 (mostrado en verde), DNA teñido con DAPI (mostrado en azul). NC, anticuerpo no competido; UR, unidades relativas de intensidad de fluoróforo.

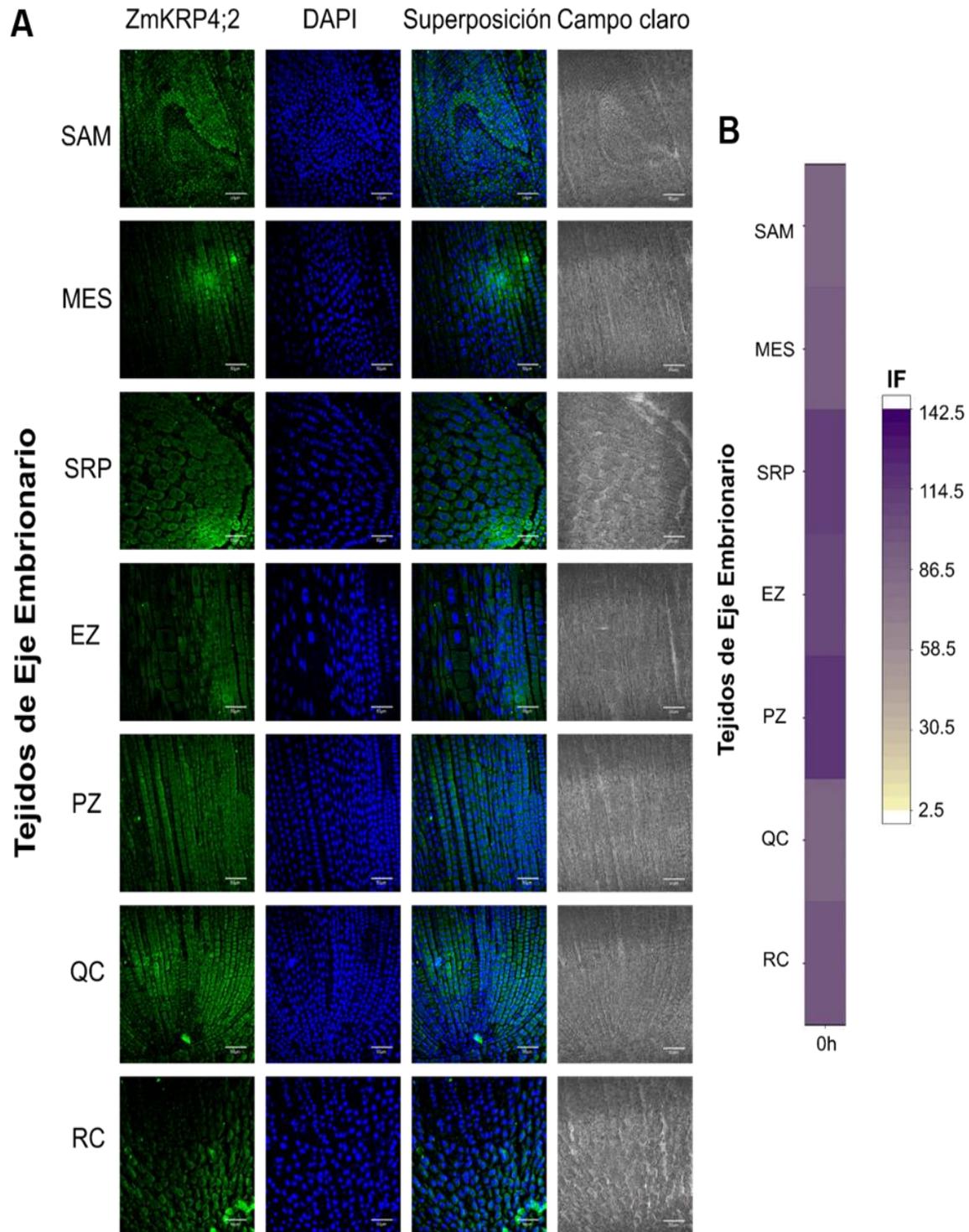
### 7.3.2 Localización tisular de KRP4;2

Durante la germinación de arroz, el gen de *OsKRP4*, el ortólogo con mayor porcentaje de identidad (60.2 %) a KRP4;2 de maíz, tiene mayor expresión en callo y en vástago, y menor en raíz principal (Mizutani *et al.*, 2010), sin embargo, hasta el momento no hay mayor información reportada. Por otra parte, la expresión de *AtKRP4* (27.6 % de identidad) se ha encontrado mayoritariamente en las primeras etapas de germinación y en tejidos con alta actividad mitótica (De Veylder, *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes y sabiendo que KRP4;2 permanece constante y que participa activamente durante las primeras horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz, se realizó la inmunolocalización de este marcador.

En tiempo 0 de imbibición, igual que la proteína CycD2;2, KRP4;2 presenta niveles similares en todos los tejidos analizados (Figura 21). En *Arabidopsis* el transcrito de KRP4 y en maíz KRP4;2, se han encontrado a tiempo 0 de germinación (Masubelele, *et al.*, 2005; De Jesús-Juárez, *et al.*, 2008). Además, la primera se ha localizado en tejidos mitóticos y endoreduplicativos (Ormenese *et al.*, 2004) y de la segunda se ha reportado incremento en el nivel de expresión del gen en el QC, implicando que está contribuyendo a la baja velocidad de división celular en esta zona (Jiang *et al.*, 2010). De tal forma que la localización tisular que presenta KRP4;2 sugiere que además de tener comportamiento similar al de su homóloga, también estaría involucrada en mantener la quiescencia celular en espera de señales proliferativas para iniciar la germinación.

Así como la respuesta de CycD2;2 al tratamiento BI, los niveles de la localización tisular de KRP4;2 disminuyen a las 18 h de imbibición, teniendo mayor decremento en el MES y SAM. Después, a las 36 h, la presencia de la proteína aumenta en todos los tejidos (Figura 22). Este patrón de acumulación de KRP4;2 parece indicar que responde de manera semejante a la expresión del gen de *Arabidopsis KRP4* el cual es inducido en ausencia de señales mitogénicas (Richard *et al.*, 2002).

Para el tratamiento con sacarosa, a 18 h de imbibición los niveles tisulares de KRP4;2 disminuyen de forma homogénea en el eje embrionario, continuando este



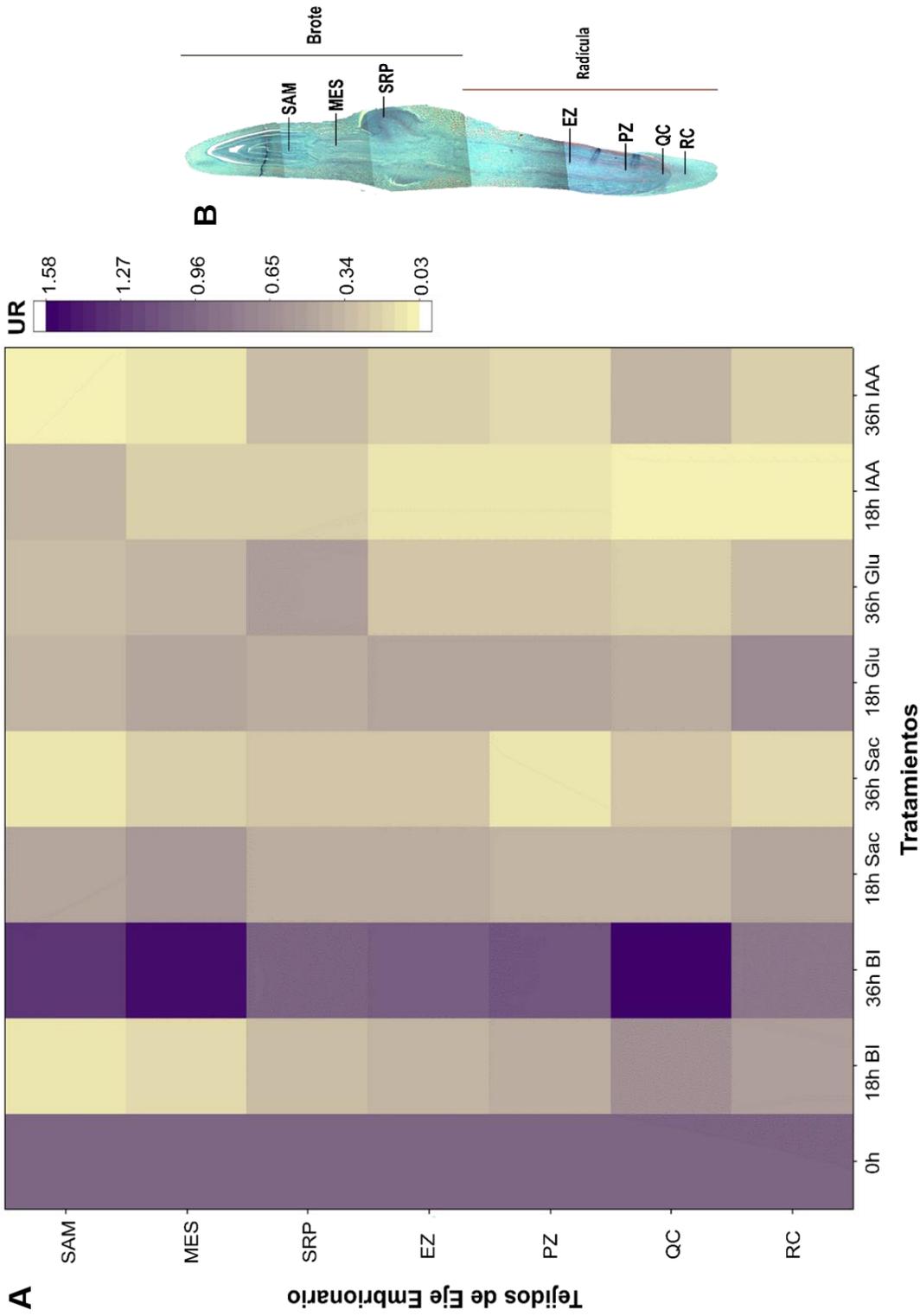
**Figura 21. Localización tisular de KRP4;2 en el eje embrionario de maíz a 0h de imbibición.** (A) Microfotografías de localización tisular de la ZmKRP4;2. (B) Cuantificación de la intensidad del fluoróforo para anti-KRP4;2. Primera columna, anticuerpo anti-KRP4;2 (mostrado en verde); segunda columna, DNA teñido con DAPI (mostrado en azul); tercera columna, superposición de verde y azul; cuarta columna, campo claro. IF, Intensidad de fluoróforo. Barras de escala= 50  $\mu$ m. Los tejidos mostrados se referencian en la Figura 13.

patrón de reducción hacia las 36 h (Figura 22). Hasta el momento se había reportado en la germinación del eje embrionario de maíz la constante presencia del transcrito y de la proteína de KRP4;2, sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en medio de imbibición enriquecido con sacarosa 60 mM (De-Jesús-Juárez *et al.*, 2008). Por el contrario, en *Arabidopsis* la expresión del gen de *KRP4* se reduce un 80% en presencia de sacarosa 90 mM (Richard, *et al.*, 2002). Lo que parece indicar que posiblemente KRP4;2 podría estar respondiendo de manera dependiente a la concentración de sacarosa, manteniendo un nivel tisular bajo durante el proceso germinativo en presencia de este azúcar.

Por otra parte, con glucosa, a las 18 h, KRP4;2 declina en todos los tejidos, respecto al nivel observado a tiempo 0. No obstante, a las 36 h la disminución es menor que en el tratamiento con sacarosa (Figura 22). La presencia de glucosa induce proliferación celular durante la germinación del eje embrionario de maíz favoreciendo la formación de callos en la región de la raíz seminal (Lara-Núñez *et al.* 2017), Por tanto, lo observado en este trabajo podría sugerir que la abundancia de KRP4;2 es baja pero constante en la proliferación celular de los tejidos durante la germinación y post-germinación del eje embrionario de maíz.

Finalmente, las diferencias más visibles suceden con el tratamiento de IAA, siendo que a las 18 h KRP4;2 presenta menor disminución en los tejidos pertenecientes al brote del eje embrionario (SRP, MES, y SAM). Contrario a esto, en el segundo tiempo analizado, el patrón de localización tisular de KRP4;2 cambia drásticamente, teniendo ahora una mayor presencia en los tejidos de la radícula (RC, QC, PZ, EZ) (Figura 22). Se ha encontrado en el ápice del brote y en radícula la expresión del gen *Os;KRP4* y *AtKRP4* (Torres-Acosta *et al.*, 2011). Del último se reportó la reducción de expresión del 40 % en presencia de únicamente auxina. Sin embargo, en presencia de auxina-sacarosa 90 mM la reducción es del 30 % (Richard *et al.*, 2002). Por tanto, en este trabajo podríamos estar observando un patrón tisular y de disminución similar para KRP4;2 que los descritos para sus homólogos.

Cabe destacar que en la germinación de *Arabidopsis*, KRP4 presenta expresión alta en tiempos tempranos de germinación y después mantiene constante un nivel bajo



**Figura 22. Niveles tisulares de KRP4;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz.** (A) Mapa de calor mostrando las intensidades relativas de fluoróforo en cada tejido por tratamiento y tiempo de imbibición. (B) Localización de los tejidos del eje embrionario de maíz. BI, buffer de imbibición; Glu, glucosa; IAA, ácido indol-3-acético-sacarosa; Sac, sacarosa; UR, unidades relativas de intensidad de fluoróforo.

(Masubelele *et al.*, 2005, Torres-Acosta *et al.*, 2011). Este patrón es semejante al observado en este trabajo para KRP4;2 en presencia de señales proliferativas.

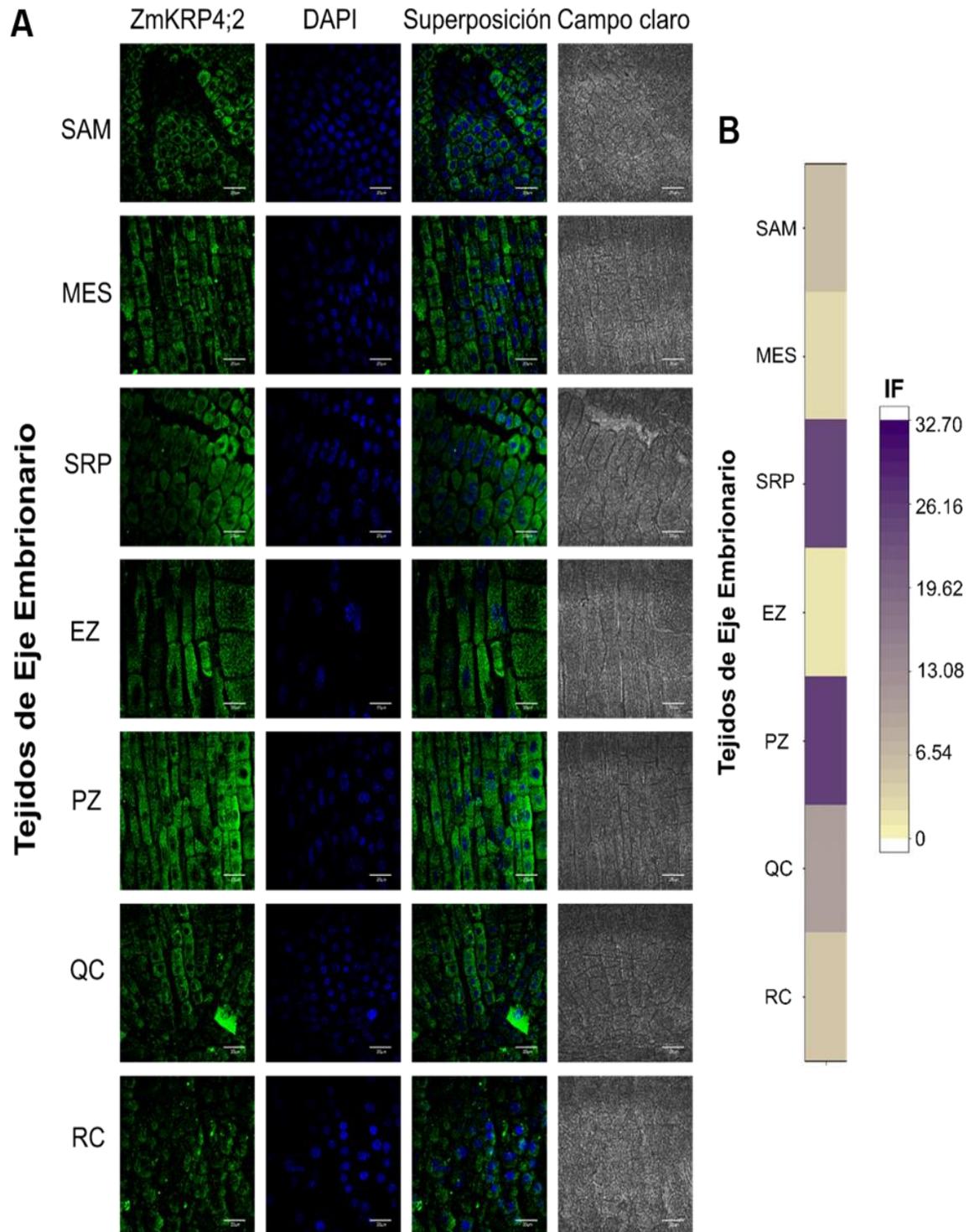
### 7.3.3 Localización subcelular

En *Arabidopsis* se ha descrito que la principal localización subcelular de las KRPs es en núcleo, independientemente de si poseen NLS. Sin embargo, diversos estudios han reportado su localización en citoplasma (Bird *et al.*, 2007; Boruc *et al.*, 2010). En la misma especie se ha observado que durante la mitosis, cuando la envoltura nuclear se rompe, KRP1 es liberada al citoplasma para posteriormente ser reclutada al nucleoplasma cuando la fase termina (Zhou *et al.*, 2003). Con respecto a AtKRP4 y OsKRP4, se conoce, mediante transfección transitoria de células de tabáco con genes que codifican para estas proteínas, que se localizan en dominios puntuales subnucleares (Bird, *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2011). No obstante, de la primera también se ha reportado su localización citoplásmica (Boruc *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta las discrepancias en los reportes anteriores se analizó la localización subcelular *in situ* de KRP4;2. Para todos los tratamientos y tejidos observados, la proteína está presente en citoplasma (Anexo 2). Sin embargo, el nivel de intensidad que refleja la presencia de esta proteína en el núcleo muestra diferencias dependientes del tratamiento, las cuales se discuten a continuación.

Se observó que a las 0 h KRP4 presenta mayor localización nuclear en los tejidos de formación de raíces QC, PZ y SRP (Figura 23). La localización en núcleo de las KRPs se ha asociado a su función de proteínas inhibidoras (Zhou *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Podemos asumir que al terminar el proceso de desarrollo de la semilla esta proteína queda en el núcleo de las células de las zonas proliferativas para así inactivar los complejos CycD-CDKA (Sanz *et al.*, 2011) hasta que las condiciones de germinación sean las adecuadas y pueda reiniciar el ciclo celular.

Similar a la respuesta de CycD2;2 al tratamiento BI (Figura 24), a las 18 h de imbibición disminuye la presencia en núcleo de KRP4;2, teniendo mayor decremento en el MES y SAM, mientras que aumenta en la punta de la raíz

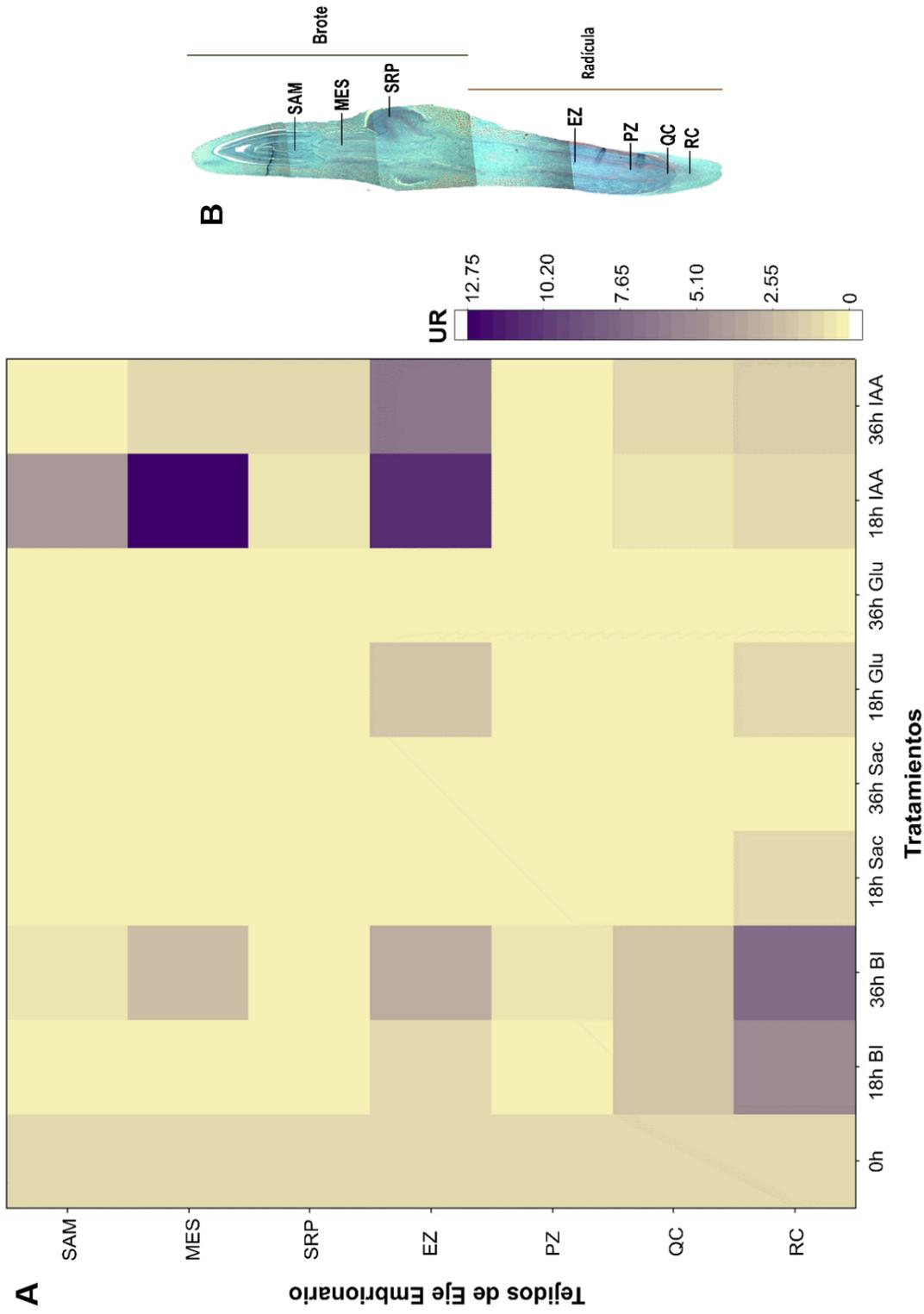


**Figura 23. Localización subcelular de KRP4;2 en el eje embrionario a 0h de imbibición.** (A) Microfotografías de localización subcelular de la ZmKRP4;2. (B) Cuantificación de la intensidad del fluoróforo en núcleo para anti-KRP4;2. Primera columna, anticuerpo anti-CycD2;2 (mostrado en verde); segunda columna, DNA teñido con DAPI (mostrado en azul); tercera columna, superposición de verde y azul; cuarta columna, campo claro. IF, Intensidad de fluoróforo. Barras de escala= 20  $\mu$ m. Los tejidos mostrados se referencian en la Figura 13.

(regiones RC y QC). Después, a las 36 h, los niveles nucleares de la proteína aumentan en todos los tejidos (Figura 24). En el inicio de la germinación *ex situ* del eje embrionario de maíz, la proliferación celular inicia en el mesocotilo, donde se observan las primeras figuras mitóticas desde las 24 h de imbibición. Sin embargo, en la germinación *in situ*, la proliferación sucede de manera sincrónica (Baiza *et al.*, 1989). Así, la inicial disminución de KRP4;2 en núcleo de células del MES y SAM, se puede asumir, sucede en función de la alteración de la germinación al extraer el eje embrionario. No obstante, en ausencia de señales mitogénicas, el ciclo celular es aberrante, sugiriéndose en este trabajo que en el segundo tiempo de imbibición analizado, la acumulación en núcleo de KRP4;2 puede ser parte del mecanismo para la inhibición de la proliferación celular.

Para el tratamiento con sacarosa, a 18 h de imbibición los niveles nucleares de KRP4;2 disminuyen de forma homogénea en el eje embrionario, continuando este patrón de reducción hacia las 36 h (Figura 24). Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que la función inhibitoria de las KRPs sucede en núcleo, y que posiblemente salga de este organelo para permitir el avance del ciclo celular, así como para su posterior degradación. Siendo que la sacarosa promueve el ciclo celular, así como la posterior diferenciación y maduración, se puede especular que los niveles nucleares disminuidos de KRP4;2 son necesarios en respuesta al azúcar para detonar estos procesos de desarrollo de la plántula.

Por otra parte, con glucosa, a las 18 y 36 h, KRP4;2 disminuye en núcleo. No obstante, en ambos tiempos presenta niveles mayores a los observados con sacarosa (Figura 24). En respuesta a glucosa se ha descrito la internalización al núcleo de CycB1;2 desde las 18 h de imbibición (García-Ayala, 2015), proceso que se ha asociado a la transición G2/M del ciclo celular, y se ha observado a las 36 h un incremento significativo de la actividad de CDK asociada a esta ciclina (Lara-Núñez, datos no publicados), proponiéndose que los tiempos de germinación se adelantan en presencia de glucosa. Además, existen reportes que indican la participación de las KRPs en la fase G2 y transición G2/M (Coelho *et al.*, 2005; Boruc *et al.*, 2010; Garza-Aguilar *et al.*, 2019). De tal forma que el patrón de



**Figura 24. Niveles nucleares de KRP4;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz.** (A) Mapa de calor mostrando las intensidades relativas de fluoróforo en núcleos de cada tejido por tratamiento y tiempo de imbibición. (B) Localización de los tejidos del eje embrionario de maíz. BI, buffer de imbibición; Glu, glucosa; IAA, ácido indol-3-acético-sacarosa; Sac, sacarosa; UR, unidades relativas de intensidad de fluoróforo.

presencia en núcleo de KRP4;2 conforme sucede la germinación, sugiere que esta proteína se mantiene constante con posible función de factor de ensamblaje o estabilizador más que de inhibidor, en respuesta a la señal mitogénica de glucosa.

Finalmente, las diferencias más visibles suceden con el tratamiento de IAA, siendo que a las 18 h KRP4;2 nuclear es mayor en los tejidos EZ, MES, y SAM. En contraste, a las 36 h, KRP4;2 en núcleo disminuye en las zonas anteriores y aumenta ligeramente en las regiones de la raíz RC y QC (Figura 24). Es conocido que las auxinas presentan gradiente de concentración en órganos en desarrollo de las plantas y que los diferentes niveles tienen como consecuencia respuestas celulares distintas, como la proliferación, expansión y diferenciación celular (Friml, 2003). De igual modo, se ha descrito que la aplicación exógena de auxina tiene efectos positivos o negativos dependientes de la concentración (Garay-Arroyo *et al.*, 2012), por ejemplo, 1  $\mu\text{M}$  de auxina reprime la elongación del eje embrionario de *Arabidopsis* (Belin *et al.*, 2009) resultando en proliferación celular continua y formando la estructura característica denominada “callo”. Por consiguiente, en este trabajo, podríamos estar observando la afectación del gradiente de auxinas, donde en tiempo temprano de germinación, estaría ocurriendo un desfase de los tiempos de ciclo celular, siendo más rápido en la radícula (concentración de auxina igual a endógena más exógena) con su correspondiente mayor disminución nuclear de KRP4;2, y a la inversa para el brote del eje embrionario (concentración de auxina en su mayoría de procedencia exógena). Posteriormente, en germinación tardía, el decremento de KRP4;2 nuclear se podría asociar a una mayor proliferación celular y su incremento en el CQ deberse a un probable mecanismo para conservar la quiescencia celular.

Como análisis complementario se hicieron pruebas estadísticas de la intensidad relacionada a anti-KRP4;2 en núcleo por zona entre los tratamientos a cada tiempo de imbibición (ANEXO 5 y 6) donde se muestra que no existe diferencia entre la sacarosa y glucosa para ninguno de los tejidos observados, mientras que, el tratamiento BI e IAA, y la comparación de estos con los azúcares presentan diferencias significativas a ambos tiempos de imbibición. Sugerencia de que la

localización subcelular de KRP4;2 es modificada cuando hay ausencia de señales proliferativas o bien en presencia de fitohormonas.

## 8. CONCLUSIONES

- Durante la germinación del eje embrionario CycD2;2 se encuentra principalmente en tejidos proliferativos y se localiza en citoplasma y núcleo. Su presencia en estas zonas, en específico de formación de raíces, y en núcleo, es favorecida con los tratamientos de glucosa e IAA, no así con sacarosa.
- La distribución tisular de CycD2;2 en imbibición con glucosa, sugiere que esta proteína participa en el aumento de la proliferación celular del RAM.
- Respecto a KRP4;2, durante la germinación se presenta en tejidos proliferativos y de elongación, encontrándose tanto en núcleo y citoplasma. Su distribución en estas zonas es favorecida por IAA y ausencia de estímulo.
- CycD2,2 y KRP4;2 en ausencia de estímulo se distribuyen en todos los tejidos analizados y presentan un aumento en núcleo, lo que sugiere que la proliferación celular no sólo depende de la localización subcelular sino también de otros factores estimuladores del ciclo celular.
- El estudio de la localización subcelular no es suficiente para determinar la participación de los marcadores del ciclo celular durante el proceso

## 9. PERSPECTIVAS

- Estudiar el patrón de localización de las proteínas CycD2;2 y KRP4;2 en presencia de inhibidores de la proliferación.
- Evaluar mediante WB los niveles de las proteínas CycD2;2 y KRP4;2 para cada tejido analizado durante la germinación con los tratamientos utilizados en este trabajo.
- Corroborar mediante fraccionamiento celular la localización subcelular descrita de CycD2;2 y KRP4;2.
- Inmunolocalizar proteínas marcadoras de fases del ciclo celular de las que se conozca patrón específico tisular y/o subcelular en diferentes condiciones

de imbibición para conocer la sincronía de la germinación del eje embrionario de maíz.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alarcón MV, Lloret PG, Martín-Partido G, Salguero J (2016). The Initiation of Lateral Roots in the Primary Roots of Maize (*Zea Mays* L.) Implies a Reactivation of Cell Proliferation in a Group of Founder Pericycle Cells. *J Plant Physiol* 192:105-10.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) Molecular biology of the cell, 5th edition.

Arellano Y, García E, Vázquez-Ramos JM (2008). Estimulación de La Síntesis de ADN y De Proteínas Del Ciclo Celular Por Auxinas Durante La Germinación de Maiz. *Agrociencia* 42(6):637-644.

The Australian Government (2008). The Biology of *Zea mays* L. *ssp mays* (maize or corn). [En línea] [Fecha de consulta: 26 de Noviembre de 2018]. Disponible en <http://www.ogtr.gov.au>

Baíza AM, Aguilar R, Sánchez-de-Jiménez E (1986). Histones and the First Cell Cycle in Maize Germination. *Physiologia Plantarum* 68(2):259-64.

Baíza AM, Sánchez-de-Jiménez E (1989). Effect of the Auxin, 2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic Acid, on Cell Cycle Regulation in Maize Embryonic Tissues. *Physiologia Plantarum* 75(2):261-66.

Baíza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez-de-Jiménez E (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *J Plant Physiol* 135(4):416-21.

Barroco RM, Poucke VK, Bergervoet JHW, De Veylder L, Groot SPC, Inzé D, Engler G (2005). The Role of the Cell Cycle Machinery in Resumption of Postembryonic Development. *Plant Physiol* 137(1):127-40.

Belin C, Megies C, Hauserova E, Lopez-Molina L (2009). Abscisic Acid Represses Growth of the Arabidopsis Embryonic Axis after Germination by Enhancing Auxin Signaling. *The Plant Cell Online* 21(8):2253-68.

Bennetzen JL, Hake SC (2009). Handbook of Maize: Its Biology. *Springer*

- Bewley JD, Black M (1994). *Seeds: Physiology of development and germination* (2nd edition). New York, Plenum.
- Bewley JD (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell Online* 9(7):1055–66.
- Bird DA, Miruna MB, Zhou Y, Fowke LC, Wang H (2007). Arabidopsis Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Are Nuclear-Localized and Show Different Localization Patterns within the Nucleoplasm. *Plant Cell Reports* 26(7):861–72.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemse V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005). The PIN Auxin Efflux Facilitator Network Controls Growth and Patterning in Arabidopsis Roots. *Nat* 433:39–44.
- Bommineni VR, Cheng PC, Walden DB (1995). Reorganization of Cells in The Maize Apical Dome Within Six Days of Culture After Microsurgery. *Maydica* 40:289-298.
- Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H (2003). Differentiation of Legume Cotyledons as Related to Metabolic Gradients and Assimilate Transport into Seeds. *J Exp Bot* 54(382):503-512.
- Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, Rombauts S, Mylle E, Hilson P, Inzé D, De Veylder L, Russinova E (2010). Functional Modules in the *Arabidopsis* Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network. *The Plant Cell* 22(4):1264–80.
- Bravo-Alberto CE (2011). Caracterización de la región promotora de la ciclina D2;2 de maíz. Tesis de Maestría. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Bravo-Alberto CE, Buendía-Monreal M (2008). Estudio de la región promotora de cuatro ciclinas D de maíz. Tesis de Licenciatura. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM (2011). The Family of Maize D-Type Cyclins: Genomic Organization, Phylogeny and Expression Patterns. *Physiologia Plantarum* 143(3):297–308.

Centro de Información de Mercados Agroalimentarios (2019). [Fecha de consulta: 4 de Julio de 2019] Disponible en <https://www.cima.aserca.gob.mx/swb/cima/Maiz>

Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA (2005). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Maize Endosperm and Their Potential Role in Endoreduplication. *Plant Physiol* 138(4):2323–36.

Collins C, Maruthi NM, Jahn CE (2015). CYCD3 D-Type Cyclins Regulate Cambial Cell Proliferation and Secondary Growth in Arabidopsis. *J Exp Bot* 66(15):4595–4606.

Coqueret (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. *TRENDS in Cell Biol* 13(2):65-70.

Curtis D, Lehmann R, Zamore PD (1995). Translational regulation in development. *Cell* 81:171-78.

Dante RA, Sabelli PA, Nguye HN, Leiva-Neto JT, Tao Y, Lowe KS, Hoerster GJ, Gordon-Kamm WJ, Jung R, Larkins BA (2014). Cyclin-Dependent Kinase Complexes in Developing Maize Endosperm: Evidence for Differential Expression and Functional Specialization. *Planta* 239(2):493–509.

Dewitte W, Murray JAH (2003). The Plant Cell Cycle. *Annu Rev Cell and Plant Biol* 54:235-64.

Doebley J, Stec A, Wendelt J, Edwardst M (1990). Genetic and Morphological Analysis of a Maize-Teosinte F2 Population: Implications for the Origin of Maize. *Proc Natl Acad Sci* 87:9888-92.

Esau K (1985). Anatomía Vegetal 3ra edición.

Freeling M, Walbot V (1994). The Maize Handbook. New York, USA: Springer-Verlag.

Friml J (2003). Auxin transport-shaping the plant. *Curr Opinion in Plant Biol* 6:7-12.

Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007). PLETHORA Proteins as Dose-Dependent Master Regulators of Arabidopsis Root

- Development. *Nat* 449:1053-57.
- Garay-Arroyo A, Sánchez MP, García-Ponce B, Azpeitia E, Álvarez-Buylla ER (2012). Hormone Symphony during Root Growth and Development. *Dev Dynamics* 241(12):1867-85.
- García-Ayala BB (2015). Influencia de los carbohidratos en el ciclo celular durante la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Garza-Aguilar SM, Sánchez-Camargo VA, Godínez-Palma SK, Lara-Núñez A (2014). Avances Recientes en el Estudios del Cliclo Celular en Plantas. *REB* 32(2):39-47.
- Garza-Aguilar SM, Lara-Núñez A, García-Ramírez E, Vázquez-Ramos JM (2017). Modulation of CycD3;1-CDK Complexes by Phytohormones and Sucrose during Maize Germination. *Physiologia Plantarum* 160(1):84-97.
- Garza-Aguilar SM, Axosco-Marín J, Lara-Núñez A, Guerrero-Molina ED; Lemus-Enciso AT, García-Ramírez E, Vázquez-Ramos JM (2019). Proliferating cell nuclear antigen associates to protein complexes containing cyclins/cyclin dependent kinases susceptible of inhibition by KRPs during maize germination. *Plant Sci* 280:297-304.
- George Ef, Hall MA, De Klerk GJ (2008). Plant propagation by tissue culture. 3<sup>rd</sup> Edition. *Springer*.
- Godínez-Palma SK, García-Ramírez E, Sánchez MP, Rosas-Bringas F, Vázquez-Ramos JM (2013). Complexes of D-Type Cyclins with CDKs during Maize Germination. *J Exp Bot* 64(18):5661-71.
- Godínez-Palma SK, Rosas-Bringas FR, Rosas-Bringas OG, García-Ramírez E, Zamora-Zaragoza J, Vázquez-Ramos JM (2017). Two Maize Kip-Related Proteins Differentially Interact With, Inhibit and Are Phosphorylated by Cyclin D-Cyclin-Dependent Kinase Complexes. *J Exp Bot* 68(7):1585-97.
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B (2007). Auxin Transport

- Is Sufficient to Generate a Maximum and Gradient Guiding Root Growth. *Nat* 449:1008-13.
- Gutiérrez-Aguilar R (2004). Caracterización molecular y bioquímica de la ciclina D de maíz. Tesis de Maestría. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2005). Maize Cyclin D2 Expression, Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones during Germination. *Plant & Cell Physiol* 46(1):166-73.
- Hartig K, Beck E (2006). Crosstalk between Auxin, Cytokinins, and Sugars in the Plant Cell Cycle. *Plant Biol* 8(3):389-96.
- Herrera I, Sanchez MP, Molina J, Plasencia J, VazquezRamos JM (2000). Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Maize Seed Development and Germination: Regulation by Phytohormones and Its Association with Putative Cell Cycle Proteins. *Physiologia Plantarum* 110(1):127-34.
- Hetz W, Hochholdinger F, Schwall M, Feix G (1996). Isolation and characterisation of *rtcs*, a maize mutant, deficient in the formation of nodal roots. *Plant J* 10:845-57.
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, Engler JA, Inzé D, Beeckman T (2002). Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. *The Plant Cell* 14(October):2339-51.
- Hirano H, Shinmyo A, Sekine M (2011). Both Negative and Positive G1 Cell Cycle Regulators Undergo Proteasome-Dependent Degradation during Sucrose Starvation in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* 6(9):1394-96.
- Hochholdinger F, Feix G (1998b). Cyclin Expression is Completely Suppressed at the Site of Crown Root Formation in the Nodal Region of the Maize Root Mutant *rtcs*. *J Plant Physiol* 153:425-29.
- Hochholdinger F, Woll K, Sauer M, Dembinsky D (2004). Genetic Dissection of Root Formation in Maize (*Zea Mays*) Reveals Root-Type Specific Developmental Programmes. *Ann Bot* 93(4):359-68.

- Hochholdinger F, Zimmermann R (2008). Conserved and Diverse Mechanisms in Root Development. *Curr Opin in Plant Biol* 11(1):70-74.
- Inzé D (2005). Green Light for the Cell Cycle. *EMBO J* 24(4):657-62.
- Inzé D, De Veylder L (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Ann Rev Genet.* 40:77-105.
- Ishida T, Adachi S, Yoshimura M, Shimizu K, Umeda M, Sugimoto K (2010). Auxin Modulates the Transition from Mitotic Cycle to the Endocycle in Arabidopsis. *Development* 137:63-71.
- Ishikawa H, Evans ML (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol* 109:725-27.
- Ivanov VB, Bystrova EI, Mesenko MM, Kotova LM, Kotov AA (2011). Cell Division Activation in the Quiescent Center of Excised Maize Root Tip. *Russian J Dev Biol* 42(5):311-16.
- De Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA (2005). The developmental context of cell-cycle control in plant. *Seminars in Cell & Dev Biol* 16:385-96.
- Jakoby MJ, Weini C, Pusch S, Kujit SJH, Merkle T, Dissmeyes N, Schnittger A (2006). Analysis of the Subcellular Localization, Function, and Proteolytic Control of the Arabidopsis Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1/KRP1. *Plant Physiol* 141: 1293-1305.
- Jasinski S, Riou-Khamlichi C, Roche O, Perennes C, Bergounioux C, Glab N (2002a). The CDK Inhibitor NtKIS1a Is Involved in Plant Development, Endoreduplication and Restores Normal Development of Cyclin D3; 1-Overexpressing Plants. *J Cell Sci* 115(5):973-82.
- Jasinski S, Perennes C, Bergounioux C, Glab N (2002b). Comparative Molecular and Functional Analyses of the Tobacco Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor NtKIS1a and Its Spliced Variant NtKIS1b 1. *Plant Physiol* 130:1871-82.

- De Jesús-Juárez N, Mancilla A, García-Ramírez E, Vázquez-Ramos JM (2008). Expression and Activity of a Kip-Related Protein, Zeama;KRP1, during Maize Germination. *Seed Sci Res* 18:67-75.
- Jiang K, Meng YL, Feldman LJ (2003). Quiescent Center Formation in Maize Roots Is Associated with an Auxin-Regulated Oxidizing Environment. *Development* 130(7):1429-38.
- Jiang K, Zhu T, Diao Z, Huang H, Feldman LJ (2010). The Maize Root Stem Cell Niche: A Partnership between Two Sister Cell Populations. *Planta* 231(2):411-24.
- Kato TA, Mapes C, Mera LM, Serratos JA, Bye RA (2009). Origen Y Diversificación Del Maíz. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México, D.F.
- Kiesselbach TA (1999). The Estructure and Reproduction of Corn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Koch KE (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 47:509-49.
- Koch KE (2004). Sucrose Metabolism: Regulatory Mechanisms and Pivotal Roles in Sugar Sensing and Plant Development. *Curr Opinion in Plant Bioly* 7(3):235-46.
- Koorneef M, Bentsik L, Hilhorst H (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opinion in Plant Biol* 5:33-36.
- Lara-Núñez A, García-Ayala B, Garza-Aguilar SM, Flores-Sánchez J, Sánchez-Camargo VA, Bravo-Alberto CE, Vázquez-Santana S, Vázquez-Ramos JM (2017). Glucose and Sucrose Differentially Modify Cell Proliferation in Maize during Germination. *Plant Physiol and Biochemistry* 113:20-31.
- Lara-Núñez A, De Jesús-Juárez N, Vázquez-Ramos JM (2008). Maize D4;1 and D5 Cyclin Proteins in Germinating Maize. Associated Kinase Activity and Regulation by Phytohormones. *Physiologia Plantarum* 132(1):79-88.
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014). Sugar Signals and the Control of Plant

- Growth and Development. *J Exp Bot* 65(3):799-807.
- Leivar P, Quail PH (2010). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Cell press* 16(1):19-28.
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom T, Provart N, Patel R, Myers RC, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP (2010). The Developmental Dynamics of the Maize Leaf Transcriptome. *Nat Genets* 42(12):1060-69.
- Lilley JL, Gee GW, Sairanen I, Ljung K, Nemhauser JL (2012). An Endogenous Carbon-Sensing Pathway Triggers Increased Auxin Flux and Hypocotyl Elongation. *Plant Physiol* 160:2261-70.
- Ljung K, Nemhauser JL, Perata P, Smith SM, Zeeman SC (2015). New Mechanistic Links between Sugar and Hormone Signalling Networks. *Curr Opinion in Plant Biol* 25:130-37.
- López-Ríos GF (2012). Botánica: Anatomía, Morfología y Diversidad. *Universidad Autónoma de Chapingo*. 2nd edition.
- Lui H, Wang H, DeLong C, Fowke LC, Crosby WL, Fobert PR (2000). The Arabidopsis Cdc2a-Interacting Protein ICK2 Is Structurally Related to ICK1 and Is a Potent Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase Activity in Vitro. *Plant* 21(4):379-85.
- Márquez-Guzmán J, Collazo M, Martínez M, Orozco A, Vázquez S (2013). Biología de Angiospermas. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Martínez-de-la-Cruz E (2012). Regulación de la arquitectura de la raíz de maíz (*Zea mays* L.) en respuesta a auxinas y su efecto sobre proteínas del ciclo celular. Tesis de Maestría. *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.
- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH (2005). D-Type Cyclins Activate Division in the Root Apex to Promote Seed Germination In Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* 102:15694-99.

- Menges M, Murray JAH (2002). Synchronous Arabidopsis Suspension Cultures for Analysis of Cell-Cycle Gene Activity. *Plant J* 30(2):203-12.
- Mews M, Sek FJ, Moore R, Volkmann D, Gunning BES, John PCL (1997). Mitotic Cyclin Distribution during Maize Cell Division: Implications for the Sequence Diversity and Function of Cyclins in Plants. *Protoplasma* 200(3-4):128-45.
- Mews M, Sek FJ, Volkmann D, John PCL (2000). Immunodetection of Four Mitotic Cyclins and the Cdc2a Protein Kinase in the Maize Root: Their Distribution in Cell Development and Dedifferentiation. *Protoplasma* 212(3-4):236-49.
- Mishra BS, Singh M, Aggrawal P, Laxmi A (2009). Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling Arabidopsis Thaliana Seedlings Root Growth and Development. *PLoS ONE* 4(2):1-13.
- Mizutani M, Naganuma T, Tsutsumi KI, Saitoh Y (2010). The Syncytium-Specific Expression of the Oryza;KRP3 CDK Inhibitor: Implication of Its Involvement in the Cell Cycle Control in the Rice (*Oryza Sativa* L.) Syncytial Endosperm. *J Exp Boty* 61(3):791-98.
- Nakai T, Kato K, Shinmyo A, Sekine M (2006). Arabidopsis KRPs Have Distinct Inhibitory Activity toward Cyclin D2-Associated Kinases, Including Plant-Specific B-Type Cyclin-Dependent Kinase. *FEBS Letters* 580(1):336-40.
- Nannas NJ, Dawe RK (2015). Genetic and Genomic Toolbox of *Zea mays*. *Genetics* 199:655-69.
- Nonogaki H, Bassel GH, Bewley JD (2010). Germination-Still a Mystery. *Plant Sci* 179(6):574-81.
- Ormenese S, De Almeida J, De Groot R, De Veylder L, Inzé D, Jacquard A (2004). Analysis of the Spatial Expression Pattern of Seven Kip Related Proteins (KRPs) in the Shoot Apex of Arabidopsis Thaliana. *Ann Bot* 93:575-80.
- Osuna D, Prieto P, Aguilar M (2015). Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. *Frontiers in Plant Sci* 6(November):1-14.

- Pavletich NP (1999). Mechanism of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *J Mol Biol* 287:821-28
- Perrot-Rechenmann C (2010). Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5):1-15.
- Pines J (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308:697-711.
- Del Pozo JC, Estelle M (1999). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *TRENDS in Plant Sci* 4:107-12.
- Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2006). Expression of Maize D-Type Cyclins: Comparison, Regulation by Phytohormones during Seed Germination and Description of a New D Cyclin. *Physiologia Plantarum* 128(3):556-68.
- Ren H, Santner A, Del Pozo JC, Murray JAH, Estella M (2008). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *The Plant J* 53:705-16.
- Reyes J, Jiménez-García LF, Gonzalez MA, Vázquez-Ramos JM (1991). Benzyladenine-Stimulation of Nuclear DNA Synthesis and Cell Division in Germinating Maize. *Seed Sci Res* 1(2):113-17.
- Richard C, Lescot M, Inzé D, De Veylder L (2002). Effect of Auxin, Cytokinin, and Sucrose on Cell Cycle Gene Expression in Arabidopsis Thaliana Cell Suspension Cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:167-76.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH (2000). Sugar Control of the Plant Cell Cycle: Differential Regulation of Arabidopsis D-Type Cyclin Gene Expression. *Molecular and Cell Biol* 20(13):4513-21.
- Sablowski R, Dornelas MC (2014). Interplay between Cell Growth and Cell Cycle in Plants. *J Exp Bot* 65(10):2703-14.
- Sairanen I, Novák O, Aleš P, Ikeda Y, Jones B, Sandberg G, Ljung K (2012). Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in Arabidopsis. *The*

*Plant Cell* 24:4907-16.

Sanz L, Dewitte W, Forzani C, Patell F, Nieuwland J, Wen Bo, Quelhas P, De Jager S, Titmus C, Campilho A, Ren H, Estelle M, Wang H, Murray JAH (2011). The *Arabidopsis* D-Type Cyclin CYCD2;1 and the Inhibitor ICK2/KRP2 Modulate Auxin-Induced Lateral Root Formation. *The Plant Cell* 23(2):641-60.

Sheen J, Zhou L, Jang JH (1999). Sugars as Signalling Molecules. *Curr Opin in Plant Biol* 2:410-18.

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*. 13;1501-12.

Smeekens S (2000). Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol* 51:49-81.

Sorrell D, Combettes B, Chaubet-Gigot N, Gigot C, Murray JAH (1999). Distinct Cyclin D Genes Show Mitotic Accumulation or Constant Levels of Transcripts in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol* 119:343-51.

Stals H, Inzé D (2001) When plant cells decide to divide. *TRENDS in Plant Sci* 6(8): 359-64.

Stokes ME, Chattopadhyay A, Wilkins O, Nambara E, Campbell MM (2013). Interplay between Sucrose and Folate Modulates Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:1552-65.

Strzalka WK, Aggarwal C, Krzeszowiec W, Jakubowska A, Sztatelman O, Banas AK (2015). *Arabidopsis* PCNAs Form Complexes with Selected D-Type Cyclins. *Frontiers in Plant Sci* 6(July):1-11.

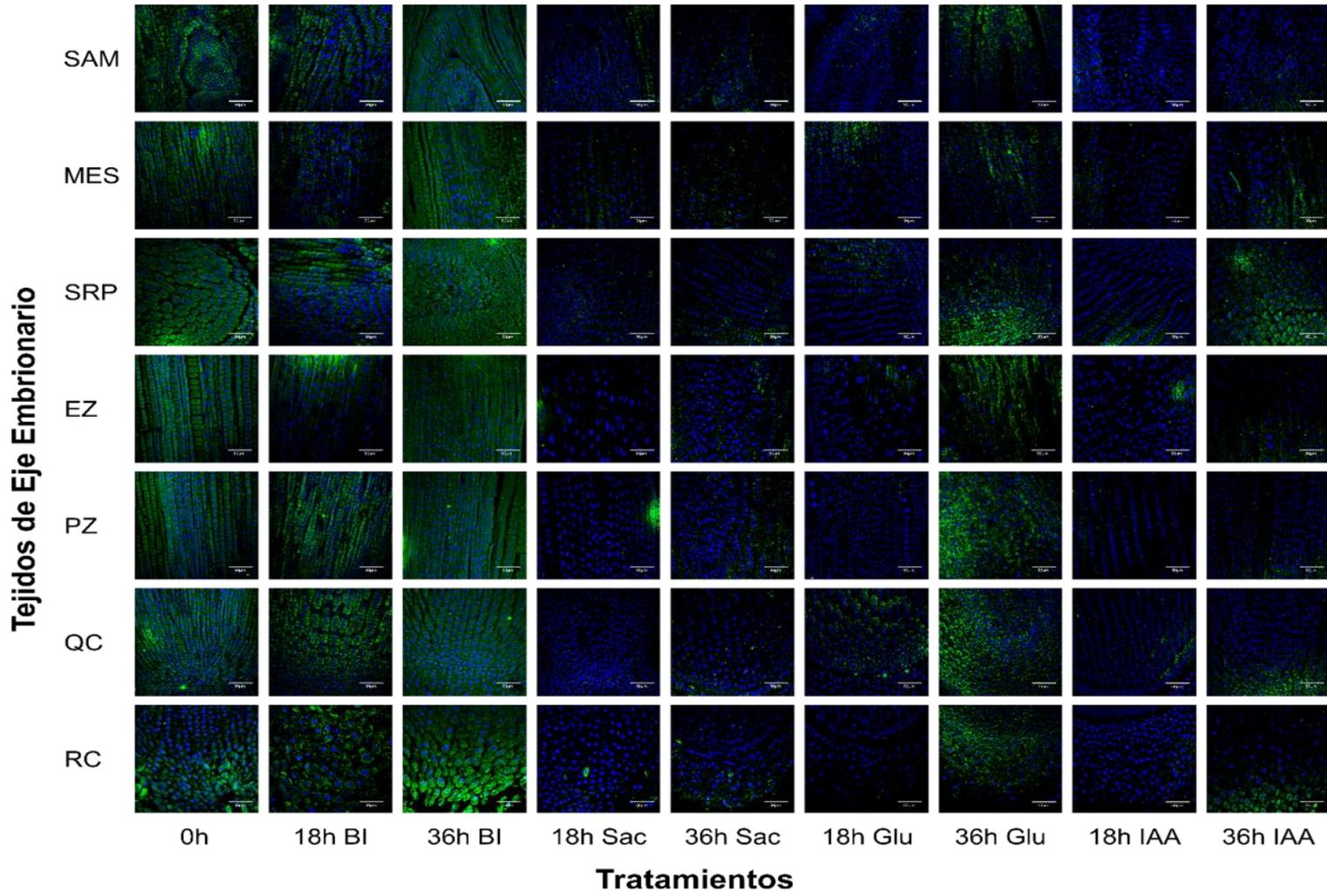
Torres-Acosta JA, Fowke LC, Wang H (2011). Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Ann Bot* 107:1141-57.

Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP (2003). The Cell Cycle and Seed Germination. *Seed Sci Res* 13(2):113-30.

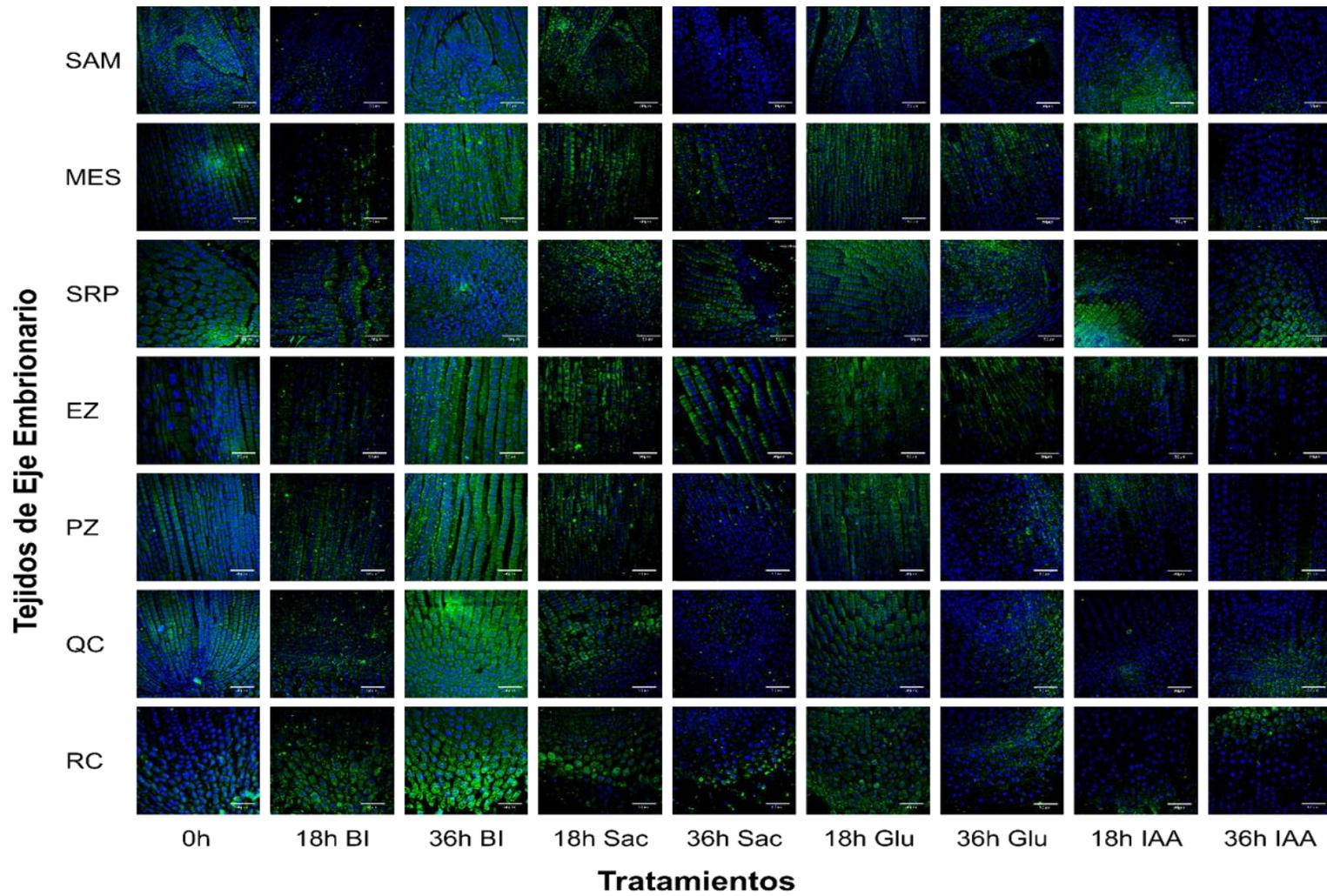
- Verkest A, Weinl C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A (2005). Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiol* 139(November):1099-06.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GTS, Frols L, Terras F, Landrieu , Van Der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D (2001). Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 13(7):1653-68.
- De Veylder L, Joubès J, Inzé D (2003). Plant Cell Cycle Transitions. *Curr Opinion in Plant Biol* 6(6):536-43.
- Vincent PLD (2012). Zea Mays (Maize, Corn). *Enciclopedia of Life Sci* 37(2000):19-30.
- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, Claude W, Ma H (2004). Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in *Arabidopsis* and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *Plant Physiol* 135(June):1084-99.
- Wang H, Zhou Y, Bird DA, Fowke LC (2008). Functions, Regulation and Cellular Localization of Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J Microscopy* 231(2):234–46.
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC (1998). ICK1, a Cyclin-Dependent Protein Kinase Inhibitor from *Arabidopsis Thaliana* Interacts with Both Cdc2a and CycD3, and Its Expression Is Induced by Abscisic Acid. *Plant J* 15(4):501-10.
- Wang L, Ruan YL (2013). Regulation of Cell Division and Expansion by Sugar and Auxin Signaling. *Frontiers in Plant Sci* 4(163):1-9.
- Weinl C, Marquardt S, Kujit SJH, Nowack MK, Jakoby MJ, Hülskamp M, Schittger A (2005). Novel Functions of Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, ICK1/KRP1, Can Act Non-Cell-Autonomously and Inhibit Entry into Mitosis. *The Plant Cell* 17:1704-22.
- Xiao Q, Zhang C, Li H, Wei B, Wang Y, Huang H, Li Y, Yu G, Liu H, Zhang J, Liu Y,

- Hu Y, Huang Y (2017). Identification and Functional Analysis of the ICK Gene Family in Maize. *Sci Rep* 7(43818):1-12.
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J (2013). Glucose-TOR Signalling Reprograms the Transcriptome and Activates Meristems. *Nat* 496(7444):181-86.
- Yang R, Tang Q, Wang H, Zhang X, Pan G, Wang H, Tu J (2011). Analyses of Two Rice (*Oryza Sativa*) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors and Effects of Transgenic Expression of OsICK6 on Plant Growth and Development. *Ann Bot* 107:1087-01.
- Zhou Y, Li G, Brandizzi F, Fowke LC, Wang H (2003). The Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1 Has Distinct Functional Domains for in Vivo Kinase Inhibition, Protein Instability and Nuclear Localization. *Plant J* 35(4):476-89.
- Zhou Y, Niu H, Brandizzi F, Fowke LC, Wang H (2006). Molecular control of nuclear and subnuclear targeting of the plant CDk inhibitor ICK1 and ICK1-mediated nuclear transport of CDKA. *Plant Mol Biol* 62:261-78.

**Anexo 1.** Microfotografías de ZmCycD2;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz a 0h de imbibición, con buffer de imbibición, sacarosa, glucosa e IAA . Barras de escala= 50  $\mu$ m.



**Anexo 2.** Microfotografías de ZmKRP4;2 durante la germinación del eje embrionario de maíz a 0h de imbibición, con buffer de imbibición, sacarosa, glucosa e IAA. Barras de escala= 50  $\mu$ m.



**Anexo 3.** Diferencias significativas entre tratamientos a 0h vs 18h por tejido de eje embrionario para ZmCycD2;2

En rojo se resaltan las diferencias significativas.

Comparaciones	Tejidos de Eje Embrionario						
	RC	QC	PZ	EZ	SRP	MES	SAM
0h vs 18h BI	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.05
0h vs 18h Sac	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.05	insignificante
0h vs 18h Glu	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.05	insignificante
0h vs 18h IAA	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.05	insignificante
18h BI vs 18h Sac	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
18h BI vs 18h Glu	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
18h BI vs 18h IAA	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
18h Sac vs 18h Glu	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.05	insignificante	insignificante	insignificante
18h Sac vs 18h IAA	insignificante	p<0.05	insignificante	p<0.05	insignificante	insignificante	insignificante
18h Glu vs 18h IAA	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante

**Anexo 4.** Diferencias significativas entre tratamientos a 0h vs 36h por tejido de eje embrionario para ZmCycD2;2

En rojo se resaltan las diferencias significativas.

Comparaciones	Tejidos de Eje Embrionario						
	RC	QC	PZ	EZ	SRP	MES	SAM
0h vs 36h BI	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.05
0h vs 36h Sac	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante
0h vs 36h Glu	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante
0h vs 36h IAA	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante
36h BI vs 36h Sac	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
36h BI vs 36h Glu	insignificante	p<0.01	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.05	p<0.01
36h BI vs 36h IAA	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.01	insignificante	insignificante	p<0.01
36h Sac vs 36h Glu	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.05	insignificante	insignificante	insignificante
36h Sac vs 36h IAA	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.01	p<0.05	insignificante
36h Glu vs 36h IAA	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.01	insignificante	insignificante

**Anexo 5.** Diferencias significativas entre tratamientos a 0h vs 18h por tejido de eje embrionario para ZmKRP4;2

En rojo se resaltan las diferencias significativas.

Comparaciones	Tejidos de eje embrionario						
	RC	QC	PZ	EZ	SRP	MES	SAM
0h vs 18h BI	p<0.01	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.05	insignificante	insignificante
0h vs 18h Sac	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	insignificante	insignificante
0h vs 18h Glu	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.05	insignificante	insignificante
0h vs 18h IAA	insignificante	insignificante	p<0.01	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01
18h BI vs 18h Sac	p<0.01	p<0.05	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante
18h BI vs 18h Glu	p<0.01	p<0.05	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante
18h BI vs 18h IAA	p<0.01	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01
18h Sac vs 18h Glu	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante
18h Sac vs 18h IAA	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01
18h Glu vs 18h IAA	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01

**Anexo 6.** Diferencias significativas entre tratamientos a 0h vs 36h por tejido de eje embrionario para ZmKRP4;2

En rojo se resaltan las diferencias significativas.

Comparaciones	Tejidos de Eje Embrionario						
	RC	QC	PZ	EZ	SRP	MES	SAM
0h vs 36h BI	p<0.01	p<0.05	insignificante	insignificante	insignificante	p<0.01	p<0.01
0h vs 36h Sac	insignificante	p<0.05	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.01
0h vs 36h Glu	insignificante	p<0.05	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.01
0h vs 36h IAA	insignificante	insignificante	p<0.01	p<0.01	insignificante	insignificante	p<0.01
36h BI vs 36h Sac	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.05	insignificante	p<0.01	p<0.01
36h BI vs 36h Glu	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.05	insignificante	p<0.01	p<0.01
36h BI vs 36h IAA	p<0.01	p<0.05	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01
36h Sac vs 36h Glu	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante	insignificante
36h Sac vs 36h IAA	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.05	insignificante
36h Glu vs 36h IAA	insignificante	p<0.01	insignificante	p<0.01	p<0.01	p<0.05	insignificante