



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA REGIÓN PROMOTORA DE  
CUATRO CICLINAS D DE MAÍZ**

**TESIS**

**QUE PRESENTAN**

**CARLOS EVERARDO BRAVO ALBERTO**

**Y**

**MANUEL BUENDÍA MONREAL**

**PARA OBTENER LOS TÍTULOS DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**Y**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**RESPECTIVAMENTE**



**MÉXICO, D. F.**

**2008**



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:	Profesor	Jorge Manuel Vázquez Ramos
VOCAL:	Profesora	Rosario Adelaida Muñoz Clares
SECRETARIO:	Profesora	Mireya Rodríguez Penagos
1er. SUPLENTE:	Profesora	Sobeida Sánchez Nieto
2° SUPLENTE:	Profesora	Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, UNAM**

Asesor del tema: \_\_\_\_\_  
**Dr. Jorge M. Vázquez Ramos**

Supervisor técnico: \_\_\_\_\_  
**Dr. Octavio Guerrero Andrade**

Sustentantes: \_\_\_\_\_  
**Carlos Everardo Bravo Alberto**

\_\_\_\_\_  
**Manuel Buendía Monreal**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos

Por haber puesto su confianza en nosotros, por dirigir de la mejor manera nuestro trabajo y por enseñarnos a obtener conocimiento científico y criticarlo usando el sentido común.

Al Dr. Octavio Guerrero Andrade

Por el tiempo, trabajo y paciencia que ha invertido en nuestra formación como profesionistas. Gracias por ser no sólo nuestro supervisor técnico sino un buen amigo.

Al Dr. Elpidio García Ramírez

Porque sus explicaciones, comentarios y críticas a nuestro trabajo han sido muy importantes en el transcurso de nuestra investigación.

A las doctoras Rosario Muñoz y Mireya Rodríguez por sus acertados comentarios a nuestro trabajo en la revisión de esta tesis.

A nuestros compañeros del laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica: Alfredo, Germán, Yaddith, Jorge, Silvia Karina, Ara, Luis, Javo, Iván, Silvia, Minerva, Aída, Nazul, Miguel, Jorge, Donají, Arturo. Les agradecemos mucho su compañía y su amistad.

Al Sistema Nacional de Investigadores de CONACYT por las becas de Ayudante de Investigador otorgadas a cada uno de nosotros.

Al programa PAPIIT 202002 por el apoyo económico que nos ha permitido la conclusión de esta tesis.

## DEDICATORIA

Para Gloria Monreal

La persona que más quiero, mi guía en la vida.

Muchas gracias por darme la oportunidad de hacer lo que me gusta y dedicarme a ello.

Para Valeria

Porque además de ser un apoyo que siempre está presente, me ha dado su amistad y eso me ha ayudado a estar bien. Te quiero mucho

Para mi abuelito: Jesús Buendía

Por tu apoyo, por tus consejos, por tu presencia, por todas las pláticas. He podido aprender mucho de ti. Muchas gracias.

Para mi tía Vale

Porque tu amistad, tu actitud y tus conocimientos me han servido de gran manera.

Gracias también por todos los desayunos, cafés y cenas, y por ahorrarme una enorme cantidad de viajes. Una ayuda incomparable.

Para mi abuelita: Bertha Monreal †

Por el gran cariño que aún siento...

Para Carlos

Es una fortuna trabajar con uno de mis mejores amigos. Felicidades!!!

Para Tavo

Porque además de saber conducir nuestro trabajo, lo has hecho con voluntad y con paciencia. Espero haber aprendido mucho de tu experiencia y conservar tu amistad.

Este trabajo también es tuyo.

Para Ana Laura

La chamaca horrible que le ha dado frescura a mis tardes y ha compartido conmigo mucho más que su tiempo.

Para todos mis amigos del árbol, especialmente a Claudio, Erick, María, Karla, Aranza, Norma, Enrique, Arturo, Alondra, Esaú, Carlos, Víctor, Daniela, Alfred, Flor, Seldus, Ulises, Gil y Johnatan. Ha sido agradable, interesante y muy divertido estar con ustedes, hacer fiesta con ustedes, viajar con ustedes...

Para Rebeca

Porque he aprendido mucho de ti y sé que el cariño está presente.

Para mis amigos de primer semestre: Laura, Cristina, Neus, Mona, Alicia, Mauricio, Omar, Claudia, Samuel, Víctor.

Y para todos mis maestros y compañeros que me han ayudado a sacar el mejor provecho de vivir en la Facultad de Química. Muchas gracias.

MANUEL BUENDÍA MONREAL

# DEDICATORIA

Para Emigdio Bravo y Florentina Alberto

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

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

Para Nana

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

Para Neto

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

Para Li

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

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

Gudelia, Rocío, Carlos, Catalina, Paty, Maira, Laura y Yaneth.

Gracias por todo su apoyo, los quiero mucho.

Para Manuel

Mi compañero desde el primer día en la Facultad, eres mas que un amigo. Ha sido muy bueno trabajar estos años contigo.

Para Tavo

Porque nos mostraste como trabajar y diriges nuestro trabajo día a día. Gracias por ser un amigo.

Para Cris y Kike

Gracias mis hermanos por compartir estos años.

Para el árbol: Claudio, Victor, Norma, Carlos, Daniela, Esau, Alondra, Ulises, Alejandro, Angel, Erick, Alfredo, Gil, Arturo, Miguel, Johnatan. Con todo mi cariño para mis amigos.

Para mis amigas: Mony, Haidee, Gaby, Paty. Gracias por apoyarme. Las quiero mucho.

CARLOS EVERARDO BRAVO ALBERTO

## ÍNDICE

	Página
Índice General .....	I
Índice de Figuras .....	III
Índice de Tablas .....	III
Abreviaturas .....	IV
1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	2
3. Marco Teórico .....	3
3.1. El maíz .....	3
3.2. Germinación .....	4
3.3. Ciclo celular .....	5
3.3.1. Ciclinas .....	7
3.3.1.1. Ciclinas tipo D .....	8
3.4. Fitorreguladores .....	10
3.5. Regulación de la expresión génica .....	11
3.5.1. Secuencias promotoras específicas .....	12
3.5.2. Efecto de incrementadores (enhancers) de la expresión génica .....	13
3.5.3. El papel de las regiones 5' y 3' en la expresión génica .....	13
3.6. Herramientas .....	14
3.6.1. Bioinformática .....	14
3.6.1.1. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) .....	14
3.6.1.2. PLACE Database (Plant cis-acting regulatory DNA elements) .....	15
3.6.2. Ingeniería genética .....	16
3.6.2.1. Formación de moléculas recombinantes de DNA .....	16
3.6.2.1. Transformación de bacterias .....	16
3.6.2.3. Transformación de callos embrionarios (Biobalística) .....	17
3.7. Antecedentes inmediatos .....	19
4. Objetivos .....	22
4.1. Objetivo general .....	22
4.2. Objetivos particulares .....	22
5. Metodología .....	23
5.1. Obtención <i>in silico</i> de las secuencias de las regiones promotoras .....	23
5.2. Clonación y corroboración de las regiones promotoras .....	24

5.3. Caracterización <i>in silico</i> de los promotores .....	28
5.4. Búsqueda del sitio de inicio de la transcripción .....	28
5.4.1. Búsqueda <i>in silico</i> .....	28
5.4.2. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) .....	29
5.5. Construcción de las fusiones de cada promotor al gen reportero de <i>gus</i> en pGPTV-Bar .....	30
5.6. Transformación de callos embriogénicos por biobalística .....	31
5.6.1. Preparación de las partículas de tungsteno para el bombardeo .....	31
5.6.2. Acoplamiento del DNA a las partículas .....	32
5.6.3. Bombardeo con microproyectiles de tungsteno .....	33
5.6.4. Determinación de la actividad de $\beta$ -glucuronidasa por el método histoquímico .....	33
5.6.5. Selección y regeneración de las células transformadas ....	34
6. Resultados y Discusión .....	35
6.1. Identificación y corroboración de las secuencias de las regiones promotoras .....	35
6.2. Caracterización <i>in silico</i> de las regiones promotoras .....	39
6.2.1. Caracterización <i>in silico</i> del promotor de la ciclina CYCD2;1 .....	41
6.3. Sitio de inicio de la transcripción .....	42
6.3.1. <i>In silico</i> .....	42
6.3.2. RACE .....	43
6.4. Actividad de los promotores de ciclinas D en callos embriogénicos de maíz transformados .....	46
7. Conclusiones .....	50
8. Perspectivas .....	51
9. Referencias .....	52
Anexo I .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Representación gráfica del ciclo celular .....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas .....	9
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas .....	10
<b>Figura 4.</b> Diagrama general de la metodología .....	23
<b>Figura 5.</b> Diagrama de clonación .....	26
<b>Figura 6.</b> Esquema de los <i>cassettes</i> de expresión de los vectores pGPTV-Bar/promotores de ciclinas D .....	31
<b>Figura 7.</b> PCR de las construcciones de cada promotor insertado en el vector pGEM-TEasy .....	36
<b>Figura 8.</b> Amplificación por PCR de los promotores anclados a la secuencia codificante y esquema de la organización genómica de cada ciclina .....	39
<b>Figura 9.</b> Fragmentos del promotor de CYCD2;1 amplificados mediante PCR .....	43
<b>Figura 10.</b> Resultados de RACE .....	46
<b>Figura 11.</b> Digestiones de los <i>cassettes</i> de expresión de los vectores pGPTV-Bar/promotores de ciclinas D con las enzimas XbaI y HindIII.....	48
<b>Figura 12.</b> Callos embriogénicos de maíz transformados con los <i>cassettes</i> de expresión vegetal .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del maíz .....	3
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para aislar y clonar los promotores de los genes de ciclinas tipo D de maíz .....	24
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos utilizados para obtener fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;1 .....	25
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos <i>reverse</i> , anclados en secuencia codificante de cada ciclina .....	25
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos utilizados para conocer el sitio de inicio de la transcripción, usando la técnica RACE .....	30
<b>Tabla 6.</b> Longitud de las secuencias teóricas y experimentales de las regiones promotoras de cada gen de ciclina tipo D de maíz .....	35
<b>Tabla 7.</b> Factores de crecimiento a los que responden los promotores de las ciclinas tipo D de maíz .....	40
<b>Tabla 8.</b> Fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;1 y los tipos de elementos de respuesta presentes en cada uno de ellos .....	42
<b>Tabla 9.</b> Posición del núcleo del promotor, del sitio de inicio de la transcripción y de la caja TATA obtenidos del análisis <i>in silico</i> .....	44
<b>Tabla 10.</b> Posición de los oligonucleótidos SP2 y SP3 utilizados y sus respectivos fragmentos esperados .....	45

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol acético
Arath;CYCD	Gen de ciclina D de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BA	Benciladenina
BDGP	Proyecto del genoma de <i>Drosophila</i> de Berkeley
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CYCD	Ciclina tipo D
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FW	Oligonucleótido <i>forward</i>
G1	Interfase post-mitótica
G2	Interfase post-sintética
M	Fase de mitosis
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLACE	Base de datos de elementos cis-reguladores de DNA en plantas
pRB	Proteína de retinoblastoma
promCYCD	Promotor de ciclina D
RACE	Amplificación rápida de extremos de cDNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RV	Oligonucleótido <i>reverse</i>
S	Fase de síntesis de DNA
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
X-Gluc	Acido 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-glucuronico sustrato de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

## 1. RESUMEN

La investigación acerca del ciclo celular en mamíferos es extensa; sin embargo, en plantas sólo pocas ciclinas han sido caracterizadas funcionalmente. Las ciclinas son reguladores primarios de las cinasas dependientes de ciclina (CDKs por sus siglas en inglés); las CDKs tienen funciones críticas en el control de la progresión del ciclo celular en eucariotes. Puesto que se ha visto que las ciclinas presentan expresión diferencial en la germinación, creemos que esta diferencia radica en los elementos de respuesta a factores de crecimiento presentes en sus promotores. Con el objetivo de conocer el tipo de factores transcripcionales que regulan la expresión de los genes de ciclinas tipo D de maíz, obtuvimos sus secuencias promotoras, cuyos tamaños fueron: CYCD2;1, 1007 pb; CYCD4;1, 585 pb; CYCD5;1, 1536 pb y CYCD5;2, 1254 pb. Cada secuencia promotora fue clonada y secuenciada para su corroboración. El análisis *in silico* de cada promotor nos permitió detectar la presencia de elementos de respuesta a factores de crecimiento como hormonas y azúcares. Ya se conoce el sitio de inicio de la transcripción, al menos para la ciclina CYCD2;1, y construimos los cassettes de expresión vegetal con cada promotor, que están siendo usados para comprender la regulación de la expresión de las diferentes ciclinas mediante transformación de callos embriogénicos de maíz por biobalística.

## **2. INTRODUCCIÓN**

En nuestro grupo de trabajo se han clonado cuatro diferentes ciclinas tipo D de maíz, las cuales han sido denominadas CYCD2;1, CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2. Cada una de éstas tiene expresión génica que varía durante el proceso germinativo y responden de diferentes maneras a la acción de fitorreguladores como auxinas y citocininas (Gutiérrez et al., 2005; Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Sugerimos que la diferencia en la expresión de las ciclinas D, durante la germinación, se debe a la estructura del promotor correspondiente, ya que sabemos que es en la región promotora donde se encuentra la mayor parte de los elementos de respuesta encargados de regular la expresión génica. De ahí la importancia de clonar y secuenciar cada una de las regiones promotoras para analizar la presencia de los motivos reguladores presentes en dichas secuencias y evaluar la actividad de cada región promotora mediante fusiones transcripcionales de dichos promotores a un gen reportero. Esto último, con el fin de conocer las condiciones ambientales en que se da la expresión (i.e. respuesta a la adición o eliminación de fitorreguladores, a la fuente carbonada o a otras condiciones de crecimiento o cultivo).

Lo anterior también sentaría las bases para estudios posteriores de disección e identificación de las regiones promotoras mínimas o elementos de respuesta a factores específicos de los genes de las ciclinas tipo D de maíz.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 3.1. El maíz

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

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.

Reino	Plantae
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermeae
Orden cereal	Monocotiledoneae
Familia	Poaceae (Gramineae)
Género	Zea
Especie	Zea mays

La planta del maíz alcanza de 0.5 m a 6 m de alto. Forma un tallo erguido, hueco, robusto y sin ramificaciones. Las hojas forman una vaina larga arrollada íntimamente al tallo, del cual nacen 2 ó 3 espigas o mazorcas envueltas en espatas. En cada mazorca existen filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30, y su color desde amarillo claro hasta verde pardo. En el extremo del tallo se encuentran pequeñas flores masculinas que se vuelven secas y pardas cuando se dispersa el polen. (Paliwal *et al.*, 2001).

El maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo y está entre los alimentos que tienen aplicaciones más diversas. Su uso se centra no sólo en la alimentación humana, también forma parte de la alimentación animal por sí mismo o como ingrediente en la composición de piensos para aves, cerdos y vacas. Por otra parte, los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, son utilizados como forraje.

Desde el punto de vista industrial, esta planta es interesante para la obtención de edulcorantes alimentarios, de almidón y de alcohol. También se ha utilizado el maíz para la obtención de bebidas no alcohólicas.

A partir de las partes no comestibles también se obtiene furfural, un compuesto utilizado en la industria del caucho, resinas, plásticos e insecticidas (Paliwal et al., 2001).

### 3.2. Germinación

La germinación, desde un punto de vista fisiológico, comienza con la captación de agua (imbibición) y termina cuando parte del embrión atraviesa la cubierta de la semilla (Bewley y Black, 1994). Agronómicamente, una semilla ha germinado una vez que la plántula emerge de la superficie del suelo.

Desde un punto de vista molecular, la germinación de semillas puede ser considerada como una etapa del desarrollo de las plantas que comprende una serie de eventos metabólicos que facultan al embrión para adoptar una condición metabólica que le permita reiniciar la proliferación celular a partir de un estado quiescente.

La única señal externa que se requiere para el establecimiento de la germinación es la entrada de agua (Mayer, 1975). Cuando entra agua a la semilla se desatan diversos procesos como la hidratación de las proteínas, cambios en la estructura subcelular, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular. Ninguno de los procesos anteriores es específico de la germinación, pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado, con un metabolismo apenas detectable, en uno que tiene un metabolismo vigoroso y que culmina con el crecimiento de la radícula. La emergencia de la radícula se debe inicialmente a la elongación celular y posteriormente a la proliferación celular.

Durante la germinación ocurre el crecimiento de las células y su posterior división. Para que la célula pueda dividirse, y así formar parte de los tejidos que constituyen una planta madura, deben ocurrir una serie de pasos que se conocen como fases del ciclo celular.

### 3.3. Ciclo celular

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

El ciclo celular es una serie de eventos ordenados que conducen a la proliferación celular, ésta es necesaria para la germinación de la semilla, es decir, la formación de un nuevo organismo, y debe coordinarse de manera continua con la diferenciación celular durante el crecimiento de la planta. La división celular está fuertemente controlada por la progresión del ciclo celular, el cual consta de cuatro fases: la interfase post-mitótica (G1), la fase de síntesis de DNA (S), la fase post-

sintética (G2) y la fase mitótica (M). Durante la mitosis se divide la célula, posteriormente cada una de las células nuevas comienza su ciclo. (Figura 1).

Los puntos de mayor control en la progresión del ciclo celular en eucariontes se encuentran antes de la síntesis de DNA (límite G1-S) y antes del inicio de la mitosis (límite G2-M) (Pines, 1995; Huntley y Murray, 1999). Las ciclinas son las proteínas que regulan estas transiciones a través de la activación y direccionamiento de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) hacia compartimentos subcelulares y sustratos específicos (Jackman et al., 2003).

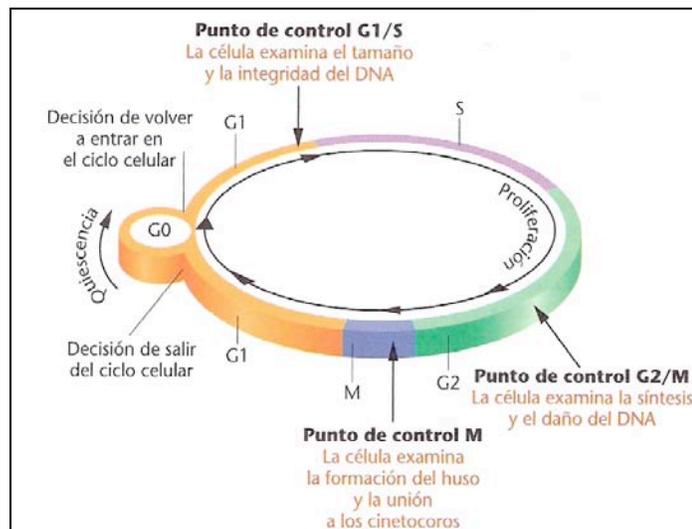


Figura 1. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control (Klug y Cummings, 1999).

### 3.3.1. Ciclinas

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

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

De acuerdo a su similitud con las ciclinas de animales, las ciclinas de plantas se han clasificado como tipos A, B, C, D, H y L (Barroco et al., 2003, Wang et al., 2004). Mediante el análisis del genoma completo de *Arabidopsis* se identificaron diez genes de ciclinas D, que se agrupan en seis o siete grupos (Oakenfull et al., 2002; Vandepoele et al., 2002). De ellas, *AtCYCD2* y *AtCYCD3* son las ciclinas más estudiadas (De Veylder et al., 1999; Riou-Khamlichi et al., 1999; Cockcroft et al., 2000; Swaminatan et al., 2000; Dewitte et al., 2003).

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

Las plantas poseen menos tipos de ciclinas que los animales pero la mayoría de esos tipos comprenden más miembros. Por ejemplo, en *Arabidopsis* existen 10 diferentes ciclinas D y en arroz existen 14 (Renaudin et al., 1996; Vandepoele et al., 2002; Wang et al., 2004), mientras que en células de humano

sólo existen 3 (Sherr, 1995). Una explicación para esto podría ser que debe haber distintas ciclinas para tejidos y órganos diferentes. Es probable que existan rutas reguladoras de la división celular específicas de plantas. No es clara la razón de la existencia de tantas ciclinas, aunque se puede especular que cada una tiene un tiempo específico de acción, o bien un tejido específico, o principal, de acción. También es probable que tengan funciones redundantes.

#### 3.3.1.1. Ciclinas tipo D

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

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

Estudios recientes han revelado que en plantas se encuentra un patrón similar al de la vía ciclinas/pRB presente en animales (Nakagami et al., 1999; Ramírez-Parra et al., 1999; Shen 2002). Las ciclinas tipo D controlan la ruta en la que están involucrados la proteína retinoblastoma (RB, en animales) o proteínas

parecidas a RB (RBR, en plantas) y los factores de transcripción E2F / DP (Figura 2). En células que no están en división, el factor E2F / DP está unido a la proteína RBR, la cual recluta desacetilasas de histonas que impiden la expresión de algunos genes. Cuando RBR es fosforilada por los complejos CYCD / CDK se libera el complejo E2F / DP, que funciona como activador transcripcional permitiendo la expresión de genes requeridos para la transición de la fase G1 a S (Dyson, 1998; Sekine et al., 1999; Uemukai et al., 2005; Inzé y De Veylder, 2006). Las ciclinas D de plantas muestran una baja similitud en su secuencia proteica cuando se comparan con las de animales, sin embargo comparten atributos claves como su participación en la vía antes mencionada (Ramírez-Parra et al., 1999).

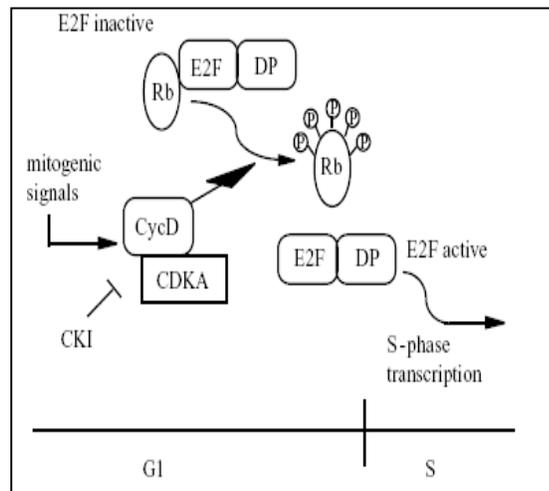


Figura 2. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas (Oakenfull et al., 2002).

Las secuencias proteicas de las ciclinas tipo D de plantas, al igual que las de otros eucariotes, muestran una misma organización estructural típica (Figura 3), con una región conservada de 250 aminoácidos que es llamada centro de ciclina, el cual consiste de dos dominios llamados amino (N) terminal y carboxilo (C) terminal (Wang et al., 2004; La et al., 2006; Menges et al., 2007). El dominio

amino terminal tiene una longitud aproximada de 120 aminoácidos y dentro de esta región se encuentra la secuencia conservada de ocho aminoácidos llamada caja ciclina, que sirve como sitio de unión a CDK. El dominio carboxilo terminal está presente en muchas, pero no en todas las ciclinas, lo que sugiere una función específica pero quizá no crítica. Otra característica de las ciclinas es la presencia del motivo LxCxE de unión a la proteína RB, el cual se encuentra cercano al extremo N terminal y está presente en casi todas las secuencias de ciclinas D. Algunas ciclinas D de plantas también poseen cajas PEST que permiten su degradación por ubiquitinación; sin embargo ninguna de las cuatro ciclinas D reportadas de maíz cuenta con esta secuencia.

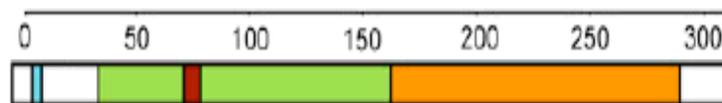


Figura 3. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas. ■ Dominio ciclina-N-terminal, ■ dominio ciclina-C-terminal, ■ caja ciclina, ■ motivo LxCxE. Escala en número de aminoácidos.

### 3.4. Fitorreguladores

Los factores involucrados en la regulación de la germinación pueden ser divididos como extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones ambientales como la cantidad disponible de agua, la presión de oxígeno, la temperatura, y para algunas semillas la luz (Mayer y Poljakoff, 1975). Dentro de los factores intrínsecos se encuentran los fitorreguladores u hormonas vegetales. Actualmente están descritos alrededor de 6 grupos de fitorreguladores, de los cuales 5 son los mejor estudiados: las

giberelinas, las auxinas, el ácido abscísico, el etileno y las citocininas (Raven, 1992).

A las giberelinas se les ha asociado un papel importante durante la germinación, principalmente a nivel de inducción de enzimas hidrolíticas en el proceso de movilización de reservas (Hill, 1977).

La liberación enzimática de conjugados glucosídicos o ribosídicos y su transporte hacia la punta del coleoptilo, en donde favorecen la elongación y el crecimiento celular, son los efectos más importantes asociados a las auxinas (Cohen, 1982).

Algunas funciones asociadas al ácido abscísico (ABA) son la síntesis de proteínas de reserva, la inducción de dormancia (Karssen et al., 1983) y la prevención del crecimiento del embrión (Karssen, 1968). Los niveles de ABA aumentan durante la embriogénesis y disminuyen en la germinación; esto último, junto con la inhibición que efectúa sobre enzimas específicas de la germinación, sugiere que el ABA actúa como un modulador negativo de la germinación (Quatrano, 1987).

Las citocininas son un grupo de fitorreguladores mitogénicos, los cuales han sido descritos como estimuladores de la germinación de semillas (Van Staden, 1993). En semillas y cultivos de tejidos vegetales, en presencia de auxinas, promueven la división celular (Miller et al., 1956).

El etileno está poco relacionado con los procesos germinativos y al respecto existen pocos reportes.

### 3.5. Regulación de la expresión génica

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

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

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

#### 3.5.1. Secuencias promotoras específicas

Para la regulación de la expresión génica se requieren secuencias promotoras específicas que pueden ser constitutivas o inducibles. Un promotor constitutivo es aquel que funciona en todos los tejidos bajo cualquier condición, mientras que uno inducible es únicamente activado en respuesta a estímulos específicos. Un

promotor constitutivo puede manejar diferentes niveles de expresión pero no puede ser completamente silenciado en ningún tejido (Lessard et al., 2002). El lugar y tiempo específico en el que se da la expresión de cada gen depende de las características de su región promotora.

### 3.5.2. Efecto de elementos incrementadores (*enhancers*) de la expresión génica

Un *enhancer* es una secuencia de DNA que incrementa notablemente la expresión de un gen cercano. Esta secuencia puede ubicarse río arriba o río abajo de una región promotora basal y puede funcionar aun si está lejos del sitio de inicio de la transcripción. Estos elementos no controlan la actividad del promotor pero sí afectan el nivel de expresión y sus efectos pueden incrementarse si están presentes múltiples copias de ellos (Wu et al., 2003).

Así como incrementan la expresión génica, algunos elementos que actúan en cis pueden silenciar la expresión de genes cercanos. Por ejemplo, el promotor de la manopina sintasa (MAS) contiene elementos que actúan como *enhancers* y como silenciadores a la vez (Guevara-García et al., 1992). El promotor de este gen actúa de forma bidireccional controlando la expresión de dos genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de manopina en tejidos de plantas infectados por *Agrobacterium tumefaciens*. Algunos de los elementos de este promotor actúan como silenciadores en una dirección y como *enhancer* en la otra. Este es un ejemplo de la complejidad del control y respuesta a elementos sobre una región corta adyacente al gen.

### 3.5.3. El papel de las regiones 5´ y 3´ en la expresión génica

Se ha mostrado que ciertas secuencias presentes sobre la cadena líder incrementan la expresión de genes. Esta habilidad es presentada tanto por secuencias no traducibles endógenas como por secuencias virales y ha sido utilizada para el diseño de sistemas más eficientes de expresión de transgenes en plantas (Groenewald et al., 2000). Sin embargo se ha encontrado que secuencias 5´ no traducibles aisladas de dicotiledóneas actúan de manera pobre en monocotiledóneas; lo mismo ocurre cuando se introduce este tipo de secuencias de monocotiledóneas en dicotiledóneas.

Por otro lado hay evidencia de que, al insertar regiones 3´ no codificantes exógenas a un gen, se incrementa su expresión debido quizá a la presencia de secuencias terminadoras de la transcripción (Ali y Taylor, 2001; Bieri et al., 2002).

## 3.6. Herramientas

### 3.6.1. Bioinformática

La bioinformática es la investigación, desarrollo o aplicación de herramientas computacionales y aproximaciones para la expansión del uso de datos biológicos, incluyendo aquellas herramientas que sirvan para adquirir, almacenar, organizar, analizar o visualizar tales datos. Su importancia es consecuencia de la generación de una enorme cantidad de datos producidos por la revolución genómica (Cullis, 2004). La generación y almacenamiento de datos han generado innovaciones computacionales en técnicas para analizar y entender los datos producidos.

#### 3.6.1.1. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Es un programa de alineamiento de secuencias, ya sea de DNA o de proteínas, con otras secuencias presentes en varias bases de datos (Altschul, 1990). La comparación puede ser vía una página web o como una herramienta aislada para comparar la secuencia problema contra una base de datos personalizada. BLAST utiliza un algoritmo heurístico que encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. Para poder juzgar los resultados obtenidos de un alineamiento, BLAST provee diversos parámetros estadísticos como el valor *expect* (Johnson et al., 2008).

#### 3.6.1.2. PLACE Database (Plant cis-acting regulatory DNA elements)

Es una base de datos de secuencias nucleotídicas publicadas que actúan como elementos cis-reguladores de DNA en plantas. Se incluyen tanto los motivos reportados originalmente, como sus variaciones en otros genes u otras especies de plantas (Higo et al., 2007).

Mediante el programa *Signal Scan Search* se puede buscar la presencia, sobre la secuencia de interés, de motivos idénticos o similares a los previamente reportados en la base de datos de PLACE.

### 3.6.2. Ingeniería genética

#### 3.6.2.1. Formación de moléculas recombinantes de DNA

Una molécula recombinante de DNA es un fragmento de DNA de interés unido covalentemente a un DNA vector. La característica esencial de un vector es que

se pueda replicar de forma autónoma en un hospedero apropiado. Para la clonación en *E. coli* se eligen como vectores los plásmidos (que aparecen de forma natural como círculos de DNA que actúan como cromosomas accesorios en bacterias) y el bacteriófago  $\lambda$ . El vector se puede preparar para aceptar un nuevo fragmento de DNA mediante su escisión por una enzima de restricción en un solo punto específico. Los cortes escalonados producidos por esta enzima generan extremos complementarios de una sola hebra, que tienen una afinidad específica entre sí y por lo tanto se denominan extremos cohesivos o pegadizos. Cualquier fragmento de DNA que tenga los mismos extremos cohesivos puede insertarse en este plásmido. El fragmento de DNA y el plásmido escindido pueden adherirse y después conectarse por la acción de la DNA ligasa, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster donde hubiere la rotura de una cadena de DNA (Stryer, 2002).

#### 3.6.2.2. Transformación de bacterias

La recombinación genética en bacterias puede estudiarse principalmente por tres distintas vías. El primer proceso a examinar es la conjugación, en donde una célula bacteriana transfiere segmentos de DNA a otra célula por contacto directo entre ambas células. Por otro lado, existen ciertos virus que pueden tomar una cadena de DNA de una célula bacteriana e inyectarla en otra célula, en donde el DNA exógeno se incorpora al DNA cromosómico; este proceso se conoce como transducción. Una célula bacteriana puede también adquirir un segmento de DNA del entorno e incorporarla a su propio cromosoma; este proceso se llama transformación (Griffiths, 1999).

Para la clonación de DNA en bacterias se han modificado ingeniosamente muchos plásmidos y bacteriófagos para aumentar la captación de moléculas de DNA por las bacterias y facilitar así la selección de aquellas bacterias que las han captado. Los plásmidos son moléculas de DNA circular de doble hebra, que aparecen de forma natural en algunas bacterias y cuyo tamaño oscila entre 2 y varios cientos de kilobases. Transportan genes para la inactivación de antibióticos, producción de toxinas y degradación de productos naturales. Estos plásmidos pueden replicarse con independencia del cromosoma del hospedero. A diferencia del genoma del hospedero, son prescindibles bajo ciertas condiciones. Una determinada célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar hasta veinte copias del mismo (Stryer, 2002).

### 3.6.3. Transformación de células vegetales (Biobalística)

La obtención de plantas transgénicas depende de la integración estable de los transgenes dentro del genoma vegetal. Con el objeto de hacer más fácil y eficiente la transferencia de DNA hacia células o tejidos vegetales, se han desarrollado diferentes métodos de transformación genética, que se pueden dividir en dos clases de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia:

- métodos basados en la utilización de vectores biológicos, como *Agrobacterium tumefaciens* o virus vegetales;
- métodos que consisten en la transferencia directa de DNA, como el de biobalística.

El término biobalística deriva de la conjunción de “biología y balística” o “balística biológica”. Éste es un método, ideado y refinado en la década de 1980

por un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell (E. U. A.), que permite introducir DNA a virtualmente cualquier tipo de célula. En este procedimiento el DNA es introducido en las células por medio de partículas microscópicas (micropartículas), aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la membrana celular. Las partículas son aproximadamente esféricas (de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro), están hechas de materiales densos como oro o tungsteno y se recubren con el DNA que se desea transferir a las plantas. Para que las micropartículas puedan atravesar las membranas celulares y llegar al núcleo de las células blanco, son impulsadas a gran velocidad por explosión de pólvora seca, liberación de gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub>), o por una descarga eléctrica de una gota de agua. Una vez dentro del tejido vegetal, el DNA se desprende de las micropartículas debido a las modificaciones del entorno iónico (Klein et al., 1992).

Si las partículas atraviesan las membranas y son atrapadas en el núcleo, el DNA puede integrarse de forma estable en los cromosomas mediante un proceso de recombinación al azar, lo que se considera como transformación estable. La transformación estable ocurre a muy baja frecuencia, por lo que es necesario utilizar un sistema de selección in vitro que permita distinguir células transformadas y no transformadas (Klein et al., 1992).

En este método de transformación, las construcciones genéticas son más simples e incluyen los genes de interés y de selección con sus secuencias regulatorias respectivas. El DNA, para ser clonado, es incluido en plásmidos que son transferidos completos durante el bombardeo a las células, o bien en forma de molécula lineal (el plásmido cortado en un punto), a diferencia de los plásmidos

utilizados con *Agrobacterium* (plásmido Ti desarmado). También es muy común que una vez obtenida la construcción genética dentro de un plásmido (en el cual se clona y se obtienen muchas copias para trabajar), luego sea extraída del mismo para sólo tener la secuencia con los genes de interés y de selección (incluidas las secuencias regulatorias) y así reducir el tamaño del fragmento de DNA a transferir (Klein et al., 1992).

### 3.7. Antecedentes inmediatos

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

Recientemente se demostró que la expresión ectópica de la CYCD2;1 de trigo en *Arabidopsis* afecta la morfología vegetal y retarda el crecimiento (Wang et al., 2006). Por otra parte, en plantas de tabaco que sobre-expresan *At*;CYCD2;1, la longitud de la fase G1 se reduce y el ciclo celular es más rápido derivando en plantas transgénicas con una tasa mayor de iniciación de hojas, aceleramiento del desarrollo y mayor número de raíces, sin ninguna alteración morfológica (Cockcroft et al., 2000). En contraste, la sobre-expresión de *At*;CYCD3;1 trajo como consecuencia hojas curvadas por un incremento en el número de células con menor tamaño y pérdida parcial de la organización celular en *Arabidopsis* (Meijer y Murray, 2001). Se ha reportado que la sobre-expresión de

Arath;CYCD3;1 lleva a la inhibición de la salida del ciclo celular y de la diferenciación de los tejidos foliares, por lo que retarda el desarrollo vegetal (Dewitte et al., 2003). De esta manera, se ha propuesto que la sobre-expresión de Arath;CYCD2;1 promueve la división celular, pero no altera los patrones de desarrollo; mientras que la sobre expresión de Arath;CYCD3;1 tiene efectos sobre la morfogénesis (Meijer y Murray, 2001; Dewitte et al., 2003).

El grupo de trabajo del doctor Vázquez-Ramos de la Facultad de Química de la UNAM ha estado involucrado en estudios del ciclo celular en maíz, particularmente durante el proceso de la germinación de la semilla. En los últimos años se han dirigido los esfuerzos a caracterizar ciclinas D, debido a que, como reguladoras fundamentales de la fase G1 del ciclo, creemos que tienen mucho que ver con el establecimiento y avance de la germinación de semillas.

Como parte de los trabajos anteriores, se han clonado cuatro diferentes ciclinas D de maíz, que han sido llamadas CYCD2;1, CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2, y se ha estudiado su patrón de expresión durante la germinación. Todas muestran niveles de RNAm diferentes y este patrón es modificado a la alza, en algunos casos drásticamente, por la adición de fitohormonas como las citocininas y auxinas (BA e AIA, respectivamente), sugiriendo que no actúan en forma redundante (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).

Los estudios se han ampliado a la observación de la conducta de las correspondientes proteínas ciclinas durante la germinación, tanto en condiciones control como en presencia de BA y AIA exógeno. Para nuestra sorpresa, la adición de fitorreguladores no modifica significativamente la cantidad de ninguna de las

ciclinas, y por el contrario, algunas muestran una ligera reducción de niveles. Por lo tanto, no existe correlación entre el nivel de RNAm y la cantidad de proteína observable para ninguna de estas ciclinas (Gutiérrez et al., 2005; Lara et al., 2008). Interesantemente, la actividad de cinasa asociada a los complejos CDK-CYCD sí responde positivamente a la adición de fitorreguladores, por lo que podemos concluir que los fitorreguladores actúan tanto a nivel de expresión génica en las ciclinas como a nivel de activación de los complejos CDK-CYCD (Lara et al., 2008).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Clonar y caracterizar las secuencias promotoras de las ciclinas tipo D de maíz.

### 4.2 Objetivos particulares

- Obtener las secuencias que corresponden a las regiones promotoras putativas de las cuatro ciclinas mediante búsquedas en las bases de datos de secuencias genómicas.
- Aislar las regiones promotoras de cada una de las ciclinas mediante PCR, clonarlas y secuenciarlas.
- Determinar el número, posición y tipo de elementos de respuesta encontrados en los promotores de las ciclinas.
- Hacer fusiones transcripcionales de los promotores de cada una de las ciclinas D al gen reportero de *gus* en el vector de expresión pGPTV-Bar .
- Verificar la actividad de los promotores de las ciclinas D mediante la expresión transitoria de *gus* en callos embriogénicos de maíz transformados mediante biobalística.

## 5. METODOLOGÍA

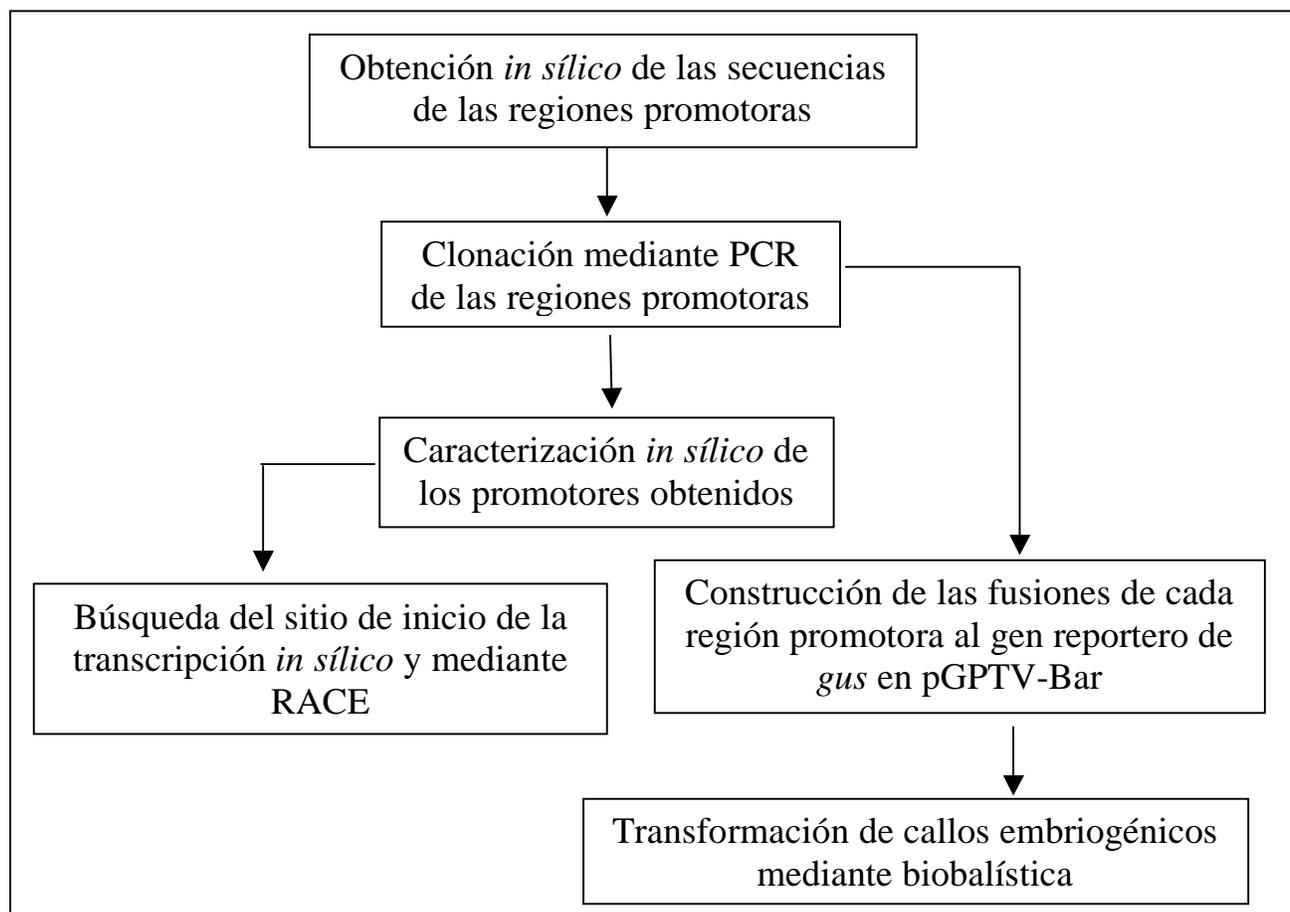


Figura 4. Diagrama general de la metodología

### 5.1. Obtención *in silico* de las secuencias de las regiones promotoras

Partiendo de las secuencias de cDNA de cada una de las ciclinas tipo D de maíz (con números de acceso en el Gene Bank del NCBI: AF351189 (CYCD2;1), AF351192 (CYCD4;1), AF351190 (CYCD5;1) y AY954514 (CYCD5;2)), se obtuvieron las secuencias de sus respectivas regiones promotoras mediante una búsqueda en la base de datos de secuencias genómicas (gss) de maíz en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta blastn. Posteriormente se seleccionaron las secuencias con mayor porcentaje de identidad en la región más cercana al extremo 5' de cada gen; se realizó un alineamiento cuidadoso de

amanera manual entre los resultados de diferentes búsquedas, haciendo uso del programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.8 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y se construyó una secuencia consenso de al menos 500 pb río arriba a partir del codón de inicio de la traducción (ATG) para cada ciclina, la cual representa la región promotora putativa.

## 5.2. Clonación y corroboración de las regiones promotoras

Conociendo las secuencias de cada promotor putativo, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para amplificar cada uno de los promotores mediante PCR (Griffin y Griffin, 1994).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para aislar y clonar los promotores de los genes de ciclinas tipo D de maíz. Se resalta en negritas el sitio de corte para las enzimas de restricción (HindIII para el oligonucleótido FW y XbaI para el RV) para los cuatro promotores.

Promotor de ciclina	Secuencia del oligonucleótido (5´- 3´)	Fragmento esperado
CYCD2;1	FW AAA <b>AAG CTT</b> GCA ATA AAA CTC CAC TCG GGA	873
	RV AAA <b>TCT AGA</b> ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	
CYCD4;1	FW AAA <b>AAG CTT</b> GAC TGT CTG TCA GTC TGT	573
	RV AAA <b>TCT AGA</b> GCT CCT GTA CTG TAC CGG CGT CTC	
CYCD5;1	FW AAA <b>AAG CTT</b> GTT GGC TGC CTC GGT ACT GCC T	1431
	RV AAA <b>TCT AGA</b> TCC TCC AGT GGT TGC GGA CTT	
CYCD5;2	FW AAA <b>AAG CTT</b> TTA GAA CAC GGA CTA TGT	1091
	RV AAA <b>TCT AGA</b> CAT GGC GTC AAT CAG AGC CCG T	

A estos cebadores se les añadió un sitio de corte específico para las enzimas de restricción HindIII (a los oligos *forward*) y XbaI (para los oligos *reverse*) con el fin de poder clonar cada una de las secuencias promotoras en el vector

pGEM-TEasy utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante ([www.promega.com](http://www.promega.com); Robles y Doers, 1994), secuenciarlas para su corroboración y darle dirección a esta clonación y a las posteriores. Las condiciones de los ensayos de PCR utilizando AccuPrime™ SuperMixII son las recomendadas por el fabricante: Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de reacción (Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C, Alineamiento: 1 minuto a 59 °C y Extensión: 1 minuto por cada 1000 pb a 72 °C) y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. También se amplificaron y clonaron fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;1. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para obtener fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;1. Se resalta en negritas el sitio de corte para las enzimas de restricción HindIII y XbaI.

Promotor de ciclina	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	Fragmento esperado
promCYCD2;1 núcleo	FW <b>AAG CTT</b> CTC AAT AAA TCA AGA AGA GGA AGA	190
	RV <b>TCT AGA</b> ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	
promCYCD2;1 proximal	FW <b>AAG CTT</b> TCA CTA TTC ACT AGG CAC AGC G	340
	RV <b>TCT AGA</b> ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	
promCYCD2;1 completo	FW <b>AAG CTT</b> GCA ATA AAA CTC CAC TCG GGA	873
	RV <b>TCT AGA</b> ACG CCA CCT ACT TGC CGA A	

Tabla 4. Oligonucleótidos *reverse*, anclados en secuencia codificante de cada ciclina, utilizados para corroborar que cada promotor pertenezca a su respectiva ciclina D.

Promotor de ciclina	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	Fragmento esperado
CYCD2;1	TCG GAG GGT CTG AAT ACC ACG AAT	2124
CYCD4;1	CTC CAG TTG AGG GTT GTT AGA ACC AG	1855
CYCD5;1	GAT GGA TGC TAC GGC GAT GGT	2468
CYCD5;2	GTT GTG GTT GTG CTT GTG GCT ATC	2553

El procedimiento para cada clonación se explica en la Figura 5.

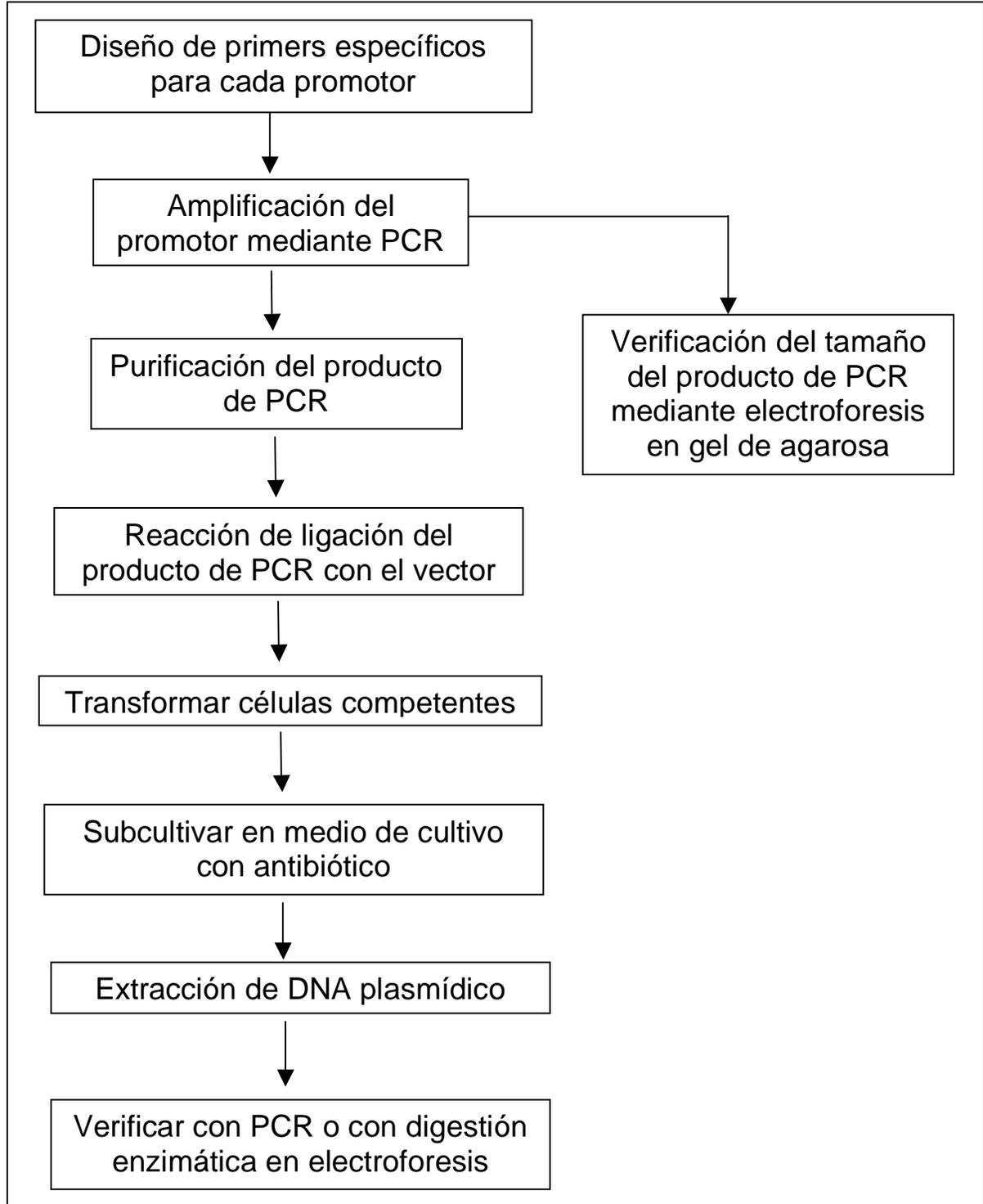


Figura 5. Diagrama de clonación

Para comprobar que los promotores amplificados correspondieran con las ciclinas estudiadas, se diseñaron oligonucleótidos *reverse* complementarios a la secuencia codificante (Tabla 4, pág 25) para amplificar, mediante PCR, el fragmento correspondiente de cada ciclina con su respectivo promotor.

La preparación y transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizó de la siguiente manera:

- a) Inocular una colonia aislada de un Stock de glicerol de la cepa de *E. coli* en 10 mL de caldo luria (LB) en un matraz de 125 mL. Incubar a 37 °C y 250 rpm por toda la noche.
- b) Transferir 2 mL de cultivo a 200 mL de LB en un matraz de 1 L. Incubar a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcance una absorbancia a 590 nm de 0.375.
- c) Transferir el cultivo a 4 tubos Falcon de 50 mL estériles y dejarlos 10 minutos a 4 °C.
- d) Centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 7 minutos. Resuspender cada botón celular en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> (60 mM/glicerol 15 %) frío.
- e) Centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 5 minutos. Resuspender cada botón celular en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> (60 mM/glicerol 15 %) frío y mantener en hielo por 30 minutos. (Nota: El contenido de los tubos puede juntarse en un mismo tubo).
- f) Centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 7 minutos. Resuspender el botón celular en 2.5 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> (60 mM/glicerol 15 %) fría, repartir en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos eppendorf y sumergir las alícuotas en N<sub>2</sub> líquido y almacenar a -70 °C.

- g) Tomar una alícuota de células competentes y adicionarle de 0.1 a 1.0  $\mu$ g de DNA plasmídico. Incubarlas en hielo por 20 minutos.
- h) Dar un choque térmico a 42 °C por 2 minutos y posteriormente adicionar 1 ml de caldo luria e incubar por 30 minutos a 37 °C.
- i) Plaquear 0.1 mL de la muestra sobre una caja con medio LB agar con el antibiótico apropiado.

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el *illustra*<sup>TM</sup> plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

### 5.3. Caracterización *in silico* de los promotores

Cada uno de los promotores fue caracterizado y mapeado utilizando la base de datos de PLACE Database (Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements (Higo et al., 1999; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) y PlantCARE (Rombauts et al., 1999; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), las cuales muestran información acerca del tipo de elementos cis-reguladores presentes en una secuencia, así como el número y posición de éstos. Estas bases de datos contienen los motivos previamente reportados.

### 5.4. Búsqueda del sitio de inicio de la transcripción

#### 5.4.1. Búsqueda *in-silico*

Para tener indicios de la posición del sitio de inicio de la transcripción, primero realizamos una búsqueda *in silico* del núcleo del promotor usando algunos

programas como Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) y la página web de Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) (<http://www.fruitfly.org/DGC/>), los cuales predicen uno o más posibles sitios de inicio de la transcripción. El núcleo del promotor consta de una región rica en pirimidinas y de una o más cajas TATA; generalmente se encuentra 30 nucleótidos aproximadamente antes del sitio de inicio de la transcripción. En ambos programas se introdujo la secuencia de la región promotora de cada una de las cuatro ciclinas; cada uno de los promotores contenía además en el extremo 3' los primeros 50 pares de bases de la región que codifica para el primer exón de la proteína ya que esto es recomendado para obtener resultados realmente significativos. El programa de BDGP arroja una página de resultados donde especifica el posible sitio de inicio de la transcripción y el posible núcleo del promotor, así como un porcentaje con el cual califica el resultado obtenido. Softberry muestra una lista de resultados en donde indica el nombre y posición de los motivos relacionados al inicio de la transcripción, como la caja TATA, encontrados en la secuencia analizada.

#### 5.4.2 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Los sitios de inicio de la transcripción fueron comprobados experimentalmente con la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA, RACE (Frohman, 1994). Se llevó a cabo con el 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, v.Oct.2005 de Roche, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos específicos para los genes de ciclina utilizados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para conocer el sitio de inicio de la transcripción usando la técnica RACE.

Ciclina	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	
CYCD2;1	TCG GAG GGT CTG AAT ACC ACG AAT	SP1
	TTT GCC TCC GCT ACC TGC AAA T	SP2
	CAG GCC GAG AAT AGC AGC GTT GTC C	SP3
CYCD4;1	CAA CAC CCG CTC CTT ATC TAC GTG A	SP1
	CTC CAG TTG AGG GTT GTT AGA ACC AG	SP2
	GTC GTA CCA CAG GAT GCT GC	SP3
CYCD5;1	GAA TCA TTG CGC TGT AGC AGG AGT	SP1
	GAT GGA TGC TAC GGC GAT GGT	SP2
	CCA GGA AGC GAT CGA GGT AAT TCA	SP3
CYCD5;2	GTT GTG GTT GTG CTT GTG GCT ATC	SP1
	GGT ACT CCA CCG AGC TTA TCA CTT TG	SP2
	AAC CAG GAA GCG ATC GAG GTA AGT	SP3

#### 5.5. Construcción de las fusiones de cada promotor al gen reportero de *gus* en pGPTV-Bar

Las regiones promotoras, ya clonadas en el vector pGEM-TEasy, fueron subclonadas en un vector de expresión para células vegetales, el pGPTV-Bar (Becker et al., 1992), el cual contiene el gen reportero de *gus*, con el que podemos detectar células transformadas por actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa.

Se realizaron construcciones de las regiones promotoras completas, así como de versiones truncadas con las que esperamos conocer la funcionalidad de los motivos encontrados *in silico* y saber más de la estructura del promotor. Para esto se ha usado la ciclina CYCD2;1. Se diseñaron cebadores específicos para aislar tres fragmentos distintos: un promotor distal (completo), un promotor proximal y un fragmento pequeño que corresponde al núcleo putativo del promotor. Dichos fragmentos fueron amplificados por PCR, clonados en un vector

de clonación (pGEM-TEasy) y luego en un vector de expresión (pGPTV-Bar). En la Figura 6 se muestran las construcciones realizadas.

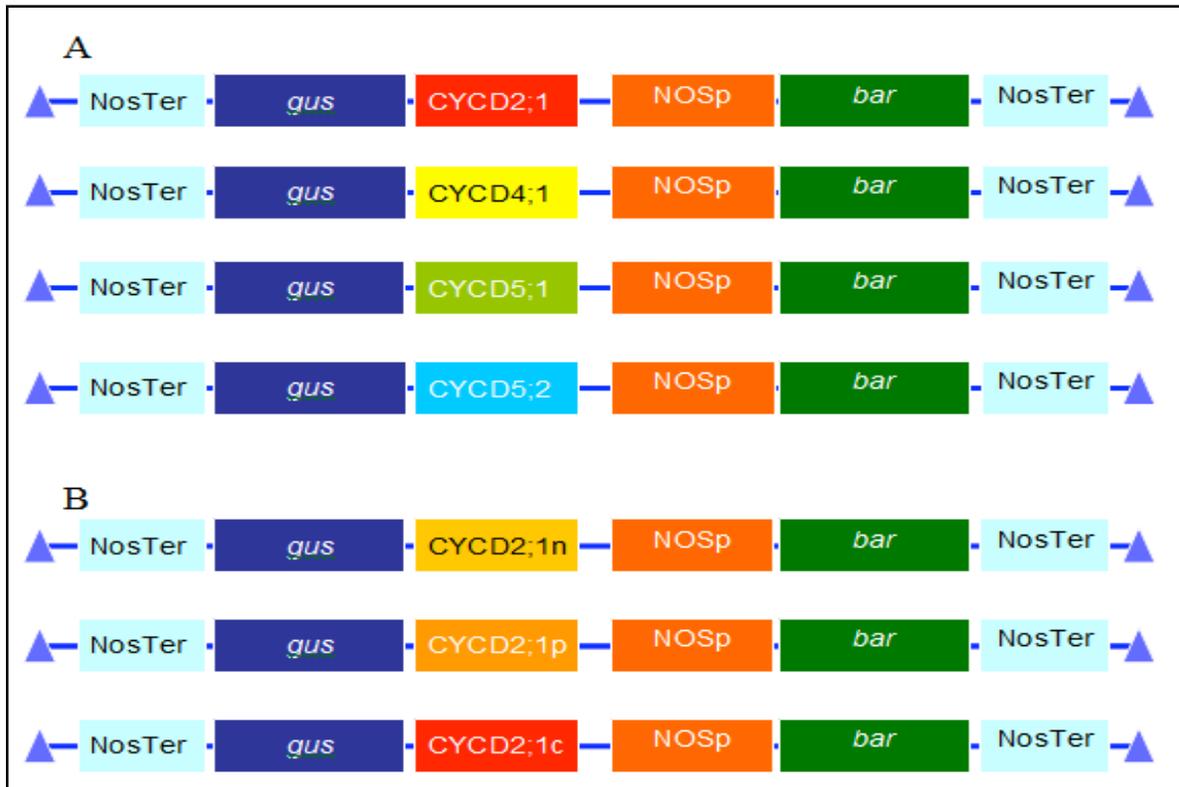


Figura 6. Esquema de los *cassettes* de expresión de los vectores pGPTV-Bar/promotores de ciclinas D. NosTer, terminador de la nopalina sintetasa; NOSp, promotor de nopalina sintetasa. (A) CYCD2;1p, CYCD4;1p, CYCD5;1p y CYCD5;2p, promotores de ciclinas. (B) CYCD2;1n, promotor núcleo; CYCD2;1p, promotor proximal y CYCD2;1c, promotor distal (completo).

## 5.6. Transformación de callos embriogénicos por biobalística

### 5.6.1. Preparación de las partículas de tungsteno para el bombardeo

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 mm de diámetro (M5) y se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 mL, después se añadieron 2 mL de HNO<sub>3</sub> 0.1M y se sonicó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se eliminó el

HNO<sub>3</sub>, se añadió 1 mL de agua desionizada estéril y la muestra se transfirió a un tubo de 2 mL sonicándose brevemente.

Las micropartículas se centrifugaron 30 segundos a 10 000 rpm, se eliminó el agua y se agregó 1 mL de etanol absoluto (100%). Nuevamente se sonicó brevemente, seguido de una centrifugación a 10 000 rpm durante 30 segundos para eliminar el etanol.

Posteriormente se agregó 1 mL de agua desionizada estéril, y se sonicó brevemente. Se colocaron 200 mL de la suspensión de micropartículas en tubos eppendorf y se agregaron 750 mL de agua desionizada estéril a cada tubo, almacenándolos a -20°C hasta su uso.

#### 5.6.2. Acoplamiento del DNA a las partículas

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

### 5.6.3. Bombardeo con microproyectiles de tungsteno

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

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

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

### 5.6.4. Determinación de la actividad de $\beta$ -glucuronidasa por el método histoquímico

La prueba de expresión transitoria se realizó con base en la técnica descrita por Jefferson en 1987.

Los callos bombardeados se colocaron en la solución de X-gluc y se incubaron a 37 °C por un período de 16 horas. Transcurrido este tiempo, la solución se desechó y se lavaron los callos dos veces con buffer Z pH 7.4

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM y  $\text{MgSO}_4$  1 mM), en seguida se lavaron cuatro veces con etanol al 70 % (v/v).

La clorofila se eliminó con una mezcla de acetona-metanol (1:3), lavando con esta solución los tejidos el tiempo necesario. Después de que se observara el color azul producto de la reacción, el tejido se lavó cuatro veces con buffer Z. Finalmente, para conservar los tejidos, se cubrieron con glicerol al 50 % (v/v) y se almacenaron a 4 °C.

#### 5.6.5. Selección y regeneración de las células transformadas

Las células transformadas se seleccionaron pasando los callos dos días después del bombardeo a medio de proliferación N6P líquido o sólido (Guerrero-Andrade O, 1998) adicionado con 3 mg/L de glufosinato de amonio. El agente selectivo se mantuvo en el medio líquido para la obtención de líneas celulares transgénicas o en el medio sólido durante la formación de plántulas para la obtención de plantas transgénicas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Identificación y corroboración de las secuencias de las regiones promotoras

En un principio, contábamos con las secuencias de cDNA de las cuatro ciclinas tipo D reportadas en maíz. Los números de acceso en el Gene Bank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de estas ciclinas son los siguientes: AF351189 (CYCD2;1), AF351192 (CYCD4;1), AF351190 (CYCD5;1) y AY954514 (CYCD5;2).

Para obtener las secuencias de las regiones promotoras de cada ciclina se realizaron búsquedas BLAST en la base de datos de secuencias genómicas (gss) de maíz, elegimos aquellas secuencias que nos permitieran extender el extremo 5' de cada gen de ciclina y las alineamos de forma manual con la secuencia respectiva de cDNA, utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.8.

Tabla 6. Longitud de las secuencias teóricas y experimentales de las regiones promotoras de cada gen de ciclina tipo D de maíz. También se muestra el porcentaje de identidad entre cada secuencia teórica y la experimental.

Ciclina	Promotor teórico (pb)	Promotor experimental (pb)	Identidad (%)
CYCD2;1	1007	873	98.0
CYCD4;1	585	573	92.0
CYCD5;1	1536	1431	93.0
CYCD5;2	1254	1091	95.0

Las secuencias obtenidas de las regiones promotoras de las cuatro ciclinas tuvieron un tamaño de al menos 500 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción (ver Tabla 6), esto representa una región suficiente para llevar a cabo los estudios de actividad de los promotores y para poder encontrar

diferencias entre ellos ya que en esa región debe encontrarse el sitio de inicio de la transcripción y, en la mayoría de los genes, también se encuentran los elementos de respuesta más importantes.

Mediante el diseño de cebadores específicos (Tabla 2, pág. 24), y utilizando PCR, cada una de las secuencias promotoras se clonó en el vector pGEM-TEasy y se secuenció para su corroboración. Para verificar que cada promotor ha sido insertado en el vector, se realizaron reacciones en cadena de polimerasa, las cuales se muestran en la Figura 7.

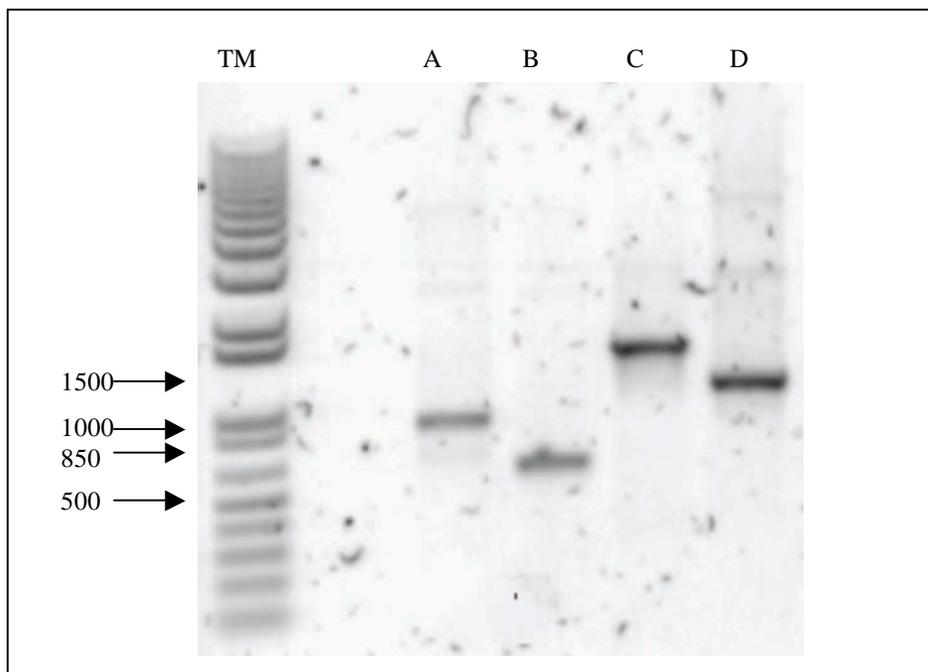


Figura 7. PCR de las construcciones de cada promotor insertado en el vector pGEM-TEasy. A: promCYCD2;1 (873 pb), B: promCYCD4;1 (573 pb), C: promCYCD5;1 (1431 pb), D: promCYCD5;2 (1091 pb). El primer carril del gel representa el marcador de tamaños moleculares.

Una vez que se clonaron y secuenciaron los fragmentos correspondientes a los promotores de las cuatro ciclinas D de maíz en pGEM-TEasy, en casos como el de las ciclinas CYCD4;1 y CYCD5;1 se observó un porcentaje de identidad relativamente bajo entre las secuencias promotoras obtenidas de las búsquedas

en las bases de datos de secuencias genómicas del Gene Bank (gss) y las aisladas mediante PCR (ver Tabla 6). Estas pequeñas diferencias son el resultado del alineamiento de las secuencias promotoras putativas de las ciclinas D de maíz de la especie B73, obtenidas mediante alineamientos con el BLAST del NCBI, y las secuencias promotoras de las ciclinas D de maíz de la especie Chalqueño clonadas en pGEM-TEasy. Debido a esto, se decidió comprobar que las secuencias promotoras obtenidas eran las correspondientes a las cuatro ciclinas tipo D que se habían reportado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo y que no pertenecieran a otros genes con secuencias similares.

Para resolver dicho problema, amplificamos fragmentos de cada ciclina correspondientes a cada promotor más una parte de la secuencia codificante, delimitados por un oligonucleótido *forward* en la parte del promotor más alejada del inicio de la traducción y por un oligonucleótido *reverse* (Tabla 4, pág. 25) anclado dentro de la región codificante (Figura 8); fue entonces que resultó necesario conocer la organización exón-intrón de cada gen y los tamaños de cada uno de ellos para saber el tamaño de los fragmentos esperados mostrados en la Tabla 4. Para esto fue necesario hacer nuevos alineamientos con secuencias genómicas de maíz eligiendo ahora aquellas que extendieran la región codificante de los cDNAs con los que contábamos, correspondientes a las ciclinas D de maíz.

La organización genómica encontrada y modelada (Figura 8) muestra que los genes correspondientes a las ciclinas CYCD2;1 y CYCD4;1 cuentan con 6 exones y 5 intrones, al igual que casi todas las ciclinas tipo D2 y D4 de otras plantas como arroz, Arabidopsis y álamo (Menges et al., 2007).

Las ciclinas CYCD5;1 y CYCD5;2 cuentan con 5 exones y 4 intrones, al igual que casi todas las ciclinas tipo D5 de arroz, Arabidopsis y álamo.

Se sabe que el gen de ciclina D del mohó *Physcomitrella patens* (originado hace 450 millones de años) presenta una estructura de 6 exones y esta característica se conserva en las ciclinas de plantas de los tipos D1, D2/D4, D6 y D7, por lo que se cree que el gen de *Physcomitrella* es el gen ancestro. Los genes de ciclinas tipo D5 parecen haber perdido uno de sus intrones a lo largo de la evolución, por esta razón sólo contienen 5 exones (Menges et al., 2007).

La organización exón-intrón obtenida para las ciclinas D de maíz es similar a la de sus genes ortólogos en otras plantas, lo que revela una conservación evolutiva de estos genes a nivel estructural.

Los productos de la amplificación se observan en la Figura 8. Se obtuvieron bandas del tamaño esperado para las cuatro ciclinas, estas bandas confirman que las secuencias aisladas de los promotores de ciclinas D corresponden a las ciclinas CYCD2;1, CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2, además confirman el modelo resultante de la estructura exón–intrón de dichos genes. Para la ciclina CYCD5;1 se observaron, además de la banda del tamaño esperado (2468 pb), otras dos bandas de mayor peso molecular.

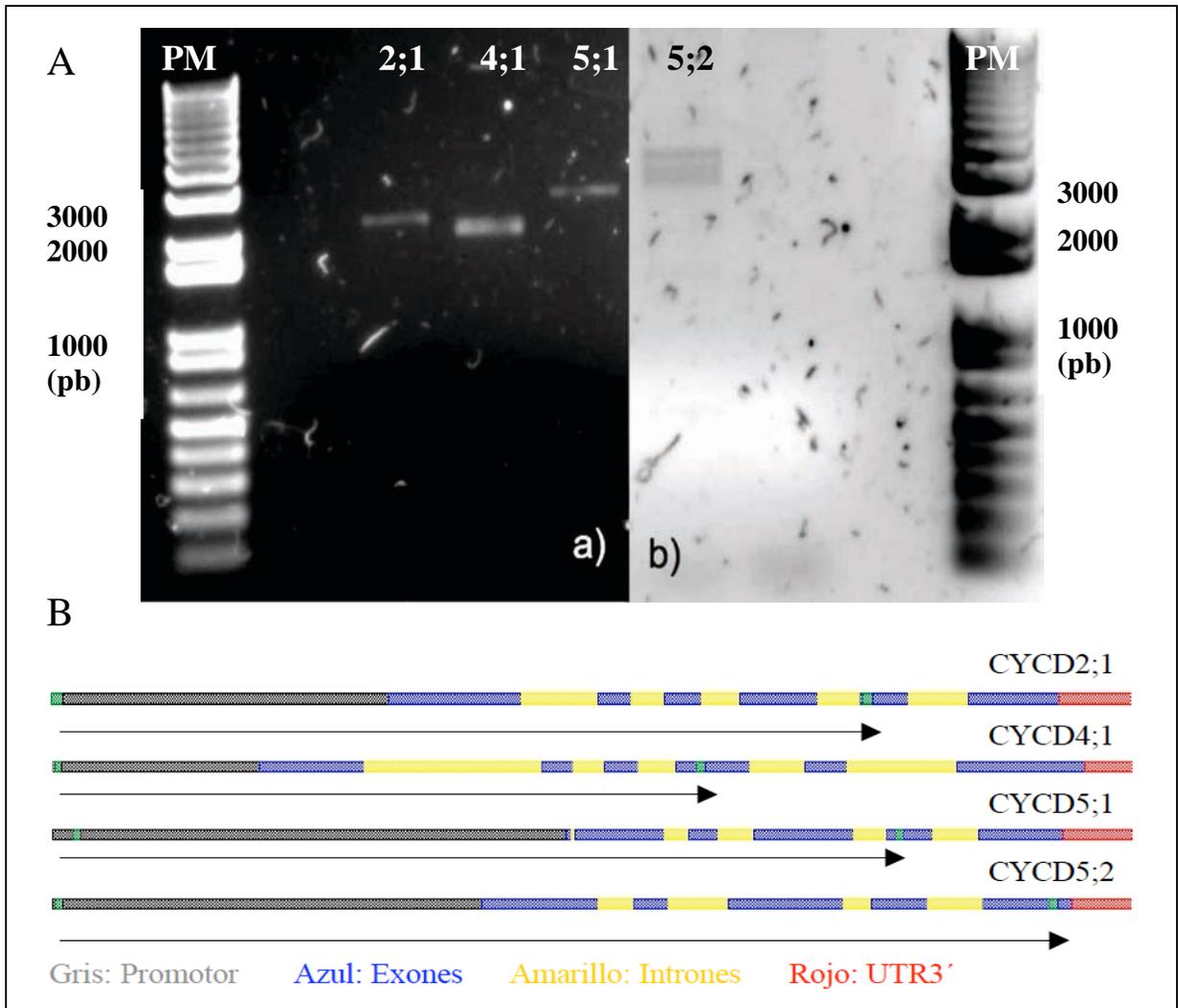


Figura 8. A) Amplificación por PCR de los promotores anclados con oligonuclótidos *reverse* en secuencia codificante. a) Se observan las bandas correspondientes a CYCD2;1, CYCD4;1 y CYCD5;2 de 2124, 1855 y 2553 nt, respectivamente, y b) las bandas correspondientes a CYCD5;1. B) Esquema de la organización genómica de las cuatro ciclinas; las flechas indican cada fragmento amplificado.

## 6.2. Caracterización *in silico* de las regiones promotoras

Los promotores de las ciclinas tipo D de maíz fueron caracterizados y mapeados, mediante su análisis en la base de datos PLACE, para saber la

posición de los elementos de respuesta que se encuentran incluidos en dichas secuencias. Entre otros, se encontraron elementos de respuesta a factores de crecimiento como hormonas (auxinas, citocininas, ácido giberélico, ácido abscísico) y azúcares. También se encontraron elementos de respuesta a factores de transcripción implicados en el desarrollo vegetal como los MYB y DOF, además de otros que responden a luz y a invasión de agentes patógenos. La tabla 7 muestra un resumen de los factores de crecimiento a los que responden, de forma putativa, los promotores de cada una de las ciclinas D de maíz y la frecuencia de motivos de respuesta a estos factores presentes en cada región promotora. Estos resultados *in silico* son preliminares, por lo que se transformarán callos embriogénicos para ver cuántos de los elementos de respuesta son funcionales y cuántos sólo se encuentran por combinaciones azarosas de nucleótidos.

Tabla 7. Factores de crecimiento putativos a los que responden los promotores de las ciclinas tipo D de maíz.

Elemento	CYCD2;1	CYCD4;1	CYCD5;1	CYCD5;2
Luz	+++	+++	++	++
Frío	+++	+	+	-
DOF	++	++	++	+++
MYB	++	++	++	+++
Azúcar (+)	+	+	++	-
Azúcar (-)	+	-	++	+
E2F	-	-	+	-
Ácido abscísico	+	+++	+	++
Giberelinas	+	+	+++	++
Auxinas	+	+	+++	+
Etileno	+	+	-	+

De la tabla anterior, podemos observar que las 4 ciclinas contienen, en diferentes proporciones, elementos de respuesta a distintos factores de crecimiento vegetal y a fitohormonas.

Los promotores de las cuatro ciclinas tienen elementos de respuesta a auxinas, esto explicaría los resultados experimentales descritos previamente por nuestro grupo en los que se observa que la adición de auxinas y citocininas aumenta los niveles de expresión de los genes de ciclinas tipo D de maíz (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).

Observamos también que, para la CYCD4;1, el principal regulador hormonal sería el ácido abscísico, aunque paradójicamente éste es un potencial regulador negativo.

Los factores que más fuertemente regulan la expresión de la ciclina CYCD2;1 son ambientales (luz y temperatura). Los factores de crecimiento más importantes para la ciclina CYCD5;2 serían los factores de desarrollo vegetal MYB y DOF. Es necesario hacer los ensayos para comprobar estas suposiciones.

Para mostrar, de manera más detallada, la posición en que se encuentran los elementos de respuesta en los promotores de los genes de CYCD, en el Anexo 1 (pág. 60) se muestran los motivos encontrados en PLACE Database resaltados en colores distintos en la secuencia de cada promotor, así como una breve descripción de cada uno de ellos.

#### 6.2.1. Caracterización *in silico* del promotor de la ciclina CYCD2;1

Observando la estructura de los promotores en cuanto a la posición de sus elementos de respuesta a factores de crecimiento, diseñamos versiones truncadas del promotor, esperando que cada versión muestre una expresión diferente. Para esto tomamos como ejemplo a la ciclina CYCD2;1 y dividimos su región promotora en tres fragmentos (Tabla 8), los que fueron nombrados como Núcleo, Proximal y

Completo. El Núcleo es el fragmento formado por los primeros 189 pb, el Proximal está formado por los primeros 340 pb y el Completo contiene los 873 pb del promotor.

La mayoría de los elementos de respuesta a hormonas y azúcares se encuentran en la región llamada promotor proximal, mientras que más allá de -340 pb existen preferentemente elementos de respuesta a otros factores como luz, frío y respuesta a patógenos. La búsqueda de elementos cis-reguladores en el programa PlantCARE nos ayudó a encontrar nuevos motivos no encontrados en PLACE; de esta forma, se notó la presencia de una caja TATA putativa en -180 pb y otra en -369 pb, además de otros elementos de respuesta en la región que hemos llamado núcleo del promotor. Con los ensayos de expresión, podremos saber si la caja TATA de -180 pb es funcional o si el núcleo del promotor abarca hasta -369 pb.

Tabla 8. Fragmentos del promotor de la ciclina CYCD2;1 y los tipos de elementos de respuesta presentes en cada uno de ellos.

Región del Promotor de CYCD2;1		
Completo -873 a -1	Proximal -340 a -1	Núcleo -189 a -1
Caja TATA en -333 Caja TATA en -180 Cajas CAAT 1 <i>Enhancer</i> Cajas de respuesta a hormonas Cajas de respuesta a fuente carbonada Cajas de respuesta a luz Cajas de respuesta a frío Cajas de respuesta a patógenos	Caja TATA en -333 Caja TATA en -180 Cajas CAAT 1 <i>Enhancer</i> Cajas de respuesta a hormonas Cajas de respuesta a fuente carbonada Cajas de respuesta a luz	Caja TATA en -180 Cajas CAAT 1 <i>Enhancer</i>

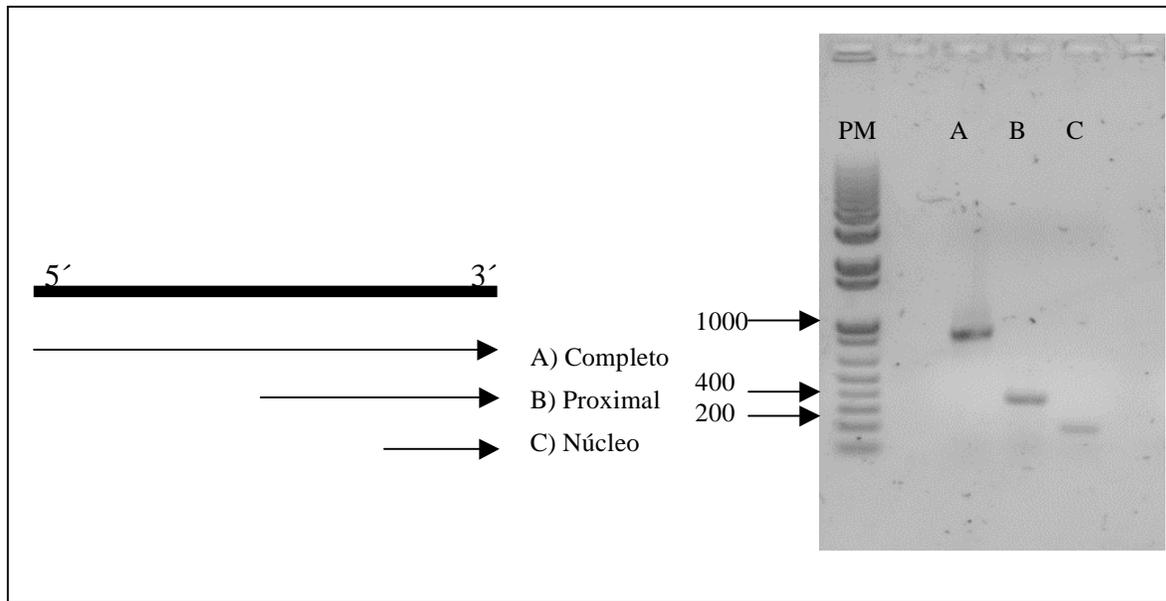


Figura 9. Fragmentos del promotor de CYCD2;1 amplificados mediante PCR. A) promotor completo 873 pb, B) promotor proximal 340 pb, C) promotor núcleo 190 pb.

Cada uno de estos fragmentos fue amplificado mediante PCR (Figura 9), clonado en pGEM-TEasy y subclonado en pGPTV-Bar, de tal manera que ya contamos con las construcciones mostradas en la Figura 6B (pág. 31).

### 6.3. Sitio de inicio de la transcripción

#### 6.3.1. *In silico*

El análisis *in silico* en BDGP de cada promotor nos permitió conocer al menos un núcleo de promotor tentativo y un sitio de inicio de la transcripción (TSS, *Transcription Start Site*) incluido en dicho núcleo. Por otra parte, el análisis en Softberry nos permitió encontrar cajas TATA putativas en cada promotor (Tabla 9).

Los resultados para CYCD2;1 y CYCD4;1 son congruentes entre ambos programas y con lo esperado ya que presentan un sitio de inicio de la transcripción

en -333 pb y -300 pb respectivamente, que es la zona donde se encuentra generalmente; además de que la caja TATA está 30 nucleótidos aproximadamente antes del sitio de inicio de la transcripción, lo cual es necesario para que la RNA polimerasa reconozca esa región específica de DNA.

El análisis para CYCD5;1 no produjo resultados satisfactorios en BDGP ya que presenta un TSS muy lejano al ATG, sin embargo en Softberry se encontró una caja TATA en -315 pb. En cuanto a CYCD5;2, por el contrario, en BDGP se obtuvieron dos TSSs y en Softberry no se obtuvieron resultados (Tabla 9).

Tabla 9. Posición del núcleo del promotor, del sitio de inicio de la transcripción y de la caja TATA obtenidos del análisis *in silico*.

Promotor de ciclina	BDGP		SOFTBERRY
	Núcleo del promotor	TSS	Caja TATA
CYCD2;1	-593 a -543	-553	-369
	-374 a -324	-333	
CYCD4;1	-341 a -291	-300	-335
CYCD5;1	-1272 a -1222	-1232	-1133 y -315
CYCD5;2	-511 a -461	-470	---
	-424 a -374	-383	

### 6.3.2. RACE

Después del análisis *in silico*, se llevó a cabo la técnica RACE con RNA extraído de ejes embrionarios de semillas de maíz y utilizando los oligonucleótidos denominados SP2 y SP3, diseñados sobre la región que codificante en cada una de las ciclinas. En la tabla 10 se muestran los fragmentos esperados para cada experimento.

Tabla 10. Posición de los oligonucleótidos SP2 y SP3 utilizados y sus respectivos fragmentos esperados, los cuales corresponden a la suma de nucleótidos del promotor más los nucleótidos de la región codificante, delimitados por el TSS y el oligonucleótido SP2 ó SP3. En negritas se muestran los tamaños de los fragmentos que concuerdan con los resultados obtenidos experimentales.

CYCD	TSS según BDGP	Posición del oligo SP2 en la secuencia codificante	Tamaño de los fragmentos esperados	Posición del oligo SP3 en la secuencia codificante	Tamaño de los fragmentos esperados
2;1	-553	533	<b>1086</b>	72	625
	-333		<b>866</b>		<b>405</b>
4;1	-300	569	869	197	497
5;1	-1232	711	1943	349	1581
	-1133		1844		1482
	-305		<b>1016</b>		654
5;2	-1232	697	1929	370	1602

Utilizando los oligonucleótidos específicos SP2, se observaron dos bandas de aproximadamente 850 pb y 1000 pb para la CYCD2;1, tamaños que concuerdan con el análisis hecho *in silico* ya que esperábamos bandas de aproximadamente 860 y 1050 pb. Para la CYCD4;1 se observaron dos bandas: una de aproximadamente 750 pb y otra menor de 650 pb. Aquí se esperaba una banda de 850 pb que indicaría que la transcripción se inicia en la posición -300 de la región promotora. En el caso de la CYCD5;1 se observaron dos bandas: una de 600 pb y otra de 1000 pb aproximadamente siendo esta última la banda del tamaño esperado y que indicaría un sitio de inicio de la transcripción en la posición -305 aproximadamente. Para la CYCD5;2 no se obtuvieron resultados (ver Figura

10A) y no se cuenta con información suficiente para suponer el tamaño de la banda que se esperaría.

Utilizando los oligonucleótidos específicos SP3 (Figura 10B) obtuvimos tres bandas para CYCD2;1: una de 200 pb, una de 250 pb y una de 400 pb, ésta última concuerda con el análisis *in silico* y con la banda esperada, lo que ratifica el inicio de la transcripción en la posición -333 ya mostrada con el oligo SP2. Para CYCD4;1 también se obtuvieron 3 bandas: 220 pb, 350 pb y 650 pb y ninguna corresponde a los 497 pb esperados. En el caso de la ciclina CYCD5;1 se obtuvo una banda de 150 pb que no concuerda con el tamaño de ninguna de las tres bandas esperadas. Estas bandas fueron clonadas en pGEM-T Easy y se secuenciarán para conocer el sitio de inicio de la transcripción de los cuatro genes de ciclinas.

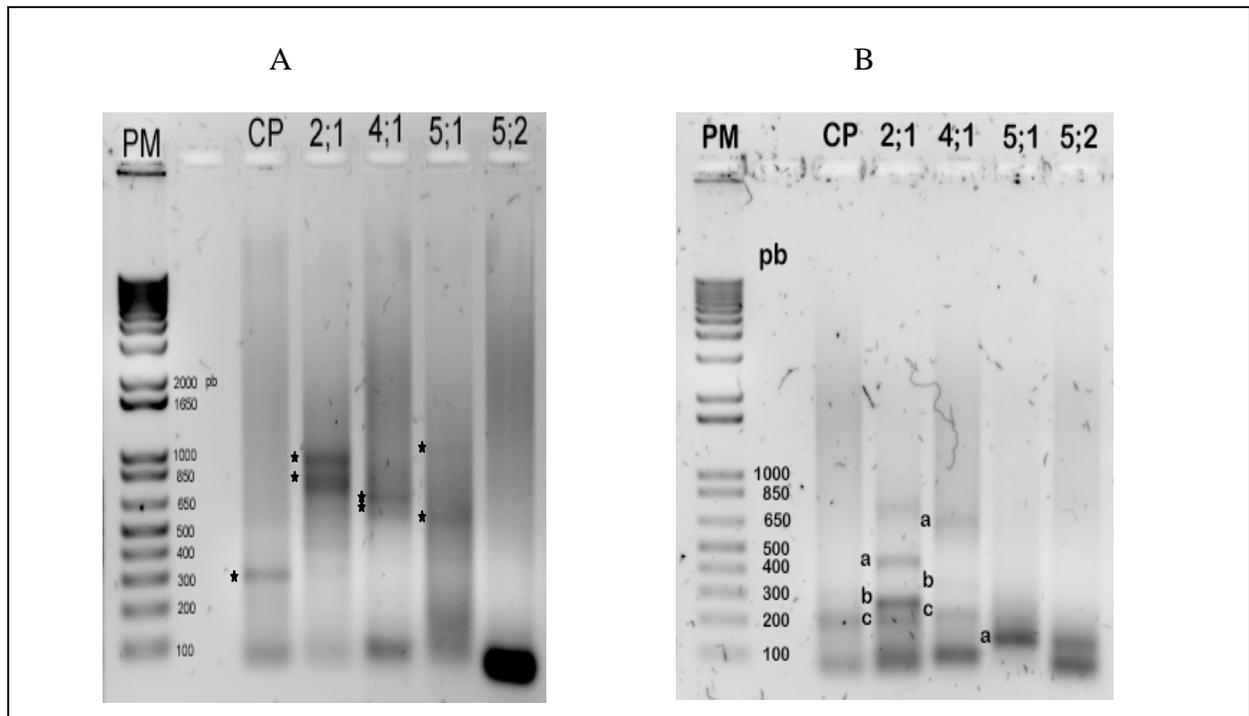


Figura 10. Resultados de RACE. A) PCR usando los oligonucleótidos SP2. B) PCR usando los oligonucleótidos SP3.

El análisis para CYCD2;1 muestra que es muy probable que el sitio de inicio de la transcripción se encuentre en -333 pb y que sea la caja TATA ubicada en -369 la que marque la región que debe reconocer la RNA polimerasa. Según los resultados obtenidos usando el oligonucleótido SP2, es probable que también tenga un TSS en -553 pb. Ambos sitios putativos de inicio de la transcripción deberán ser comprobados con la secuenciación de las bandas clonadas. Para las otras ciclinas no ha sido posible comprobar el sitio de inicio de la transcripción.

6.4. Actividad de los promotores de ciclinas D en callos embriogénicos de maíz transformados.

Los *cassettes* de expresión vegetal que cuentan con el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa bajo control de cada uno de los promotores de las ciclinas aislados, fueron obtenidos mediante una digestión del vector pGPTV-Bar, en sitios para las enzimas de corte único XbaI y HindI, y una posterior ligación con los fragmentos del promotor de la CYCD2;1 y los promotores completos de las CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2 (Figura 11).

Se transformaron callos embriogénicos mediante biobalística, sin embargo los callos embriogénicos de la variedad tuxpeño presentaron actividad de *gus* endógena (Figura 12 A), situación que no da lugar a resultados que se puedan interpretar.

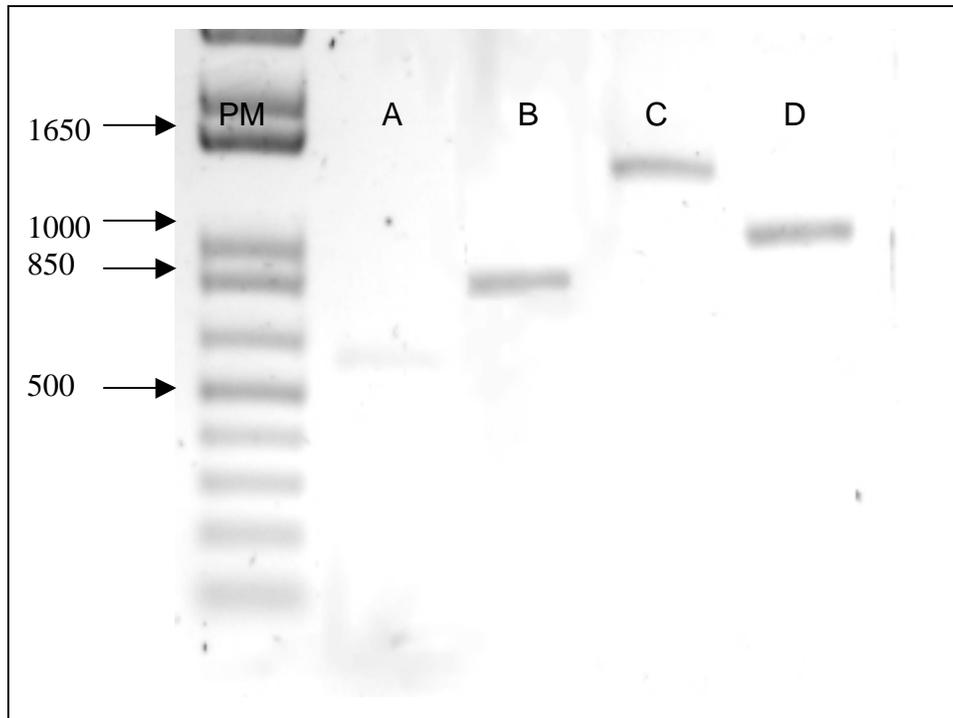


Figura 11. Digestiones de los *cassettes* de expresión de los vectores pGPTV-Bar/promotores de ciclinas D con las enzimas XbaI y HindIII. A) promCYCD4;1 (573 pb), B)promCYCD2;1 (873 pb), C)promCYCD5;1 (1431 pb), D)promCYCD5;2 (1091 pb).

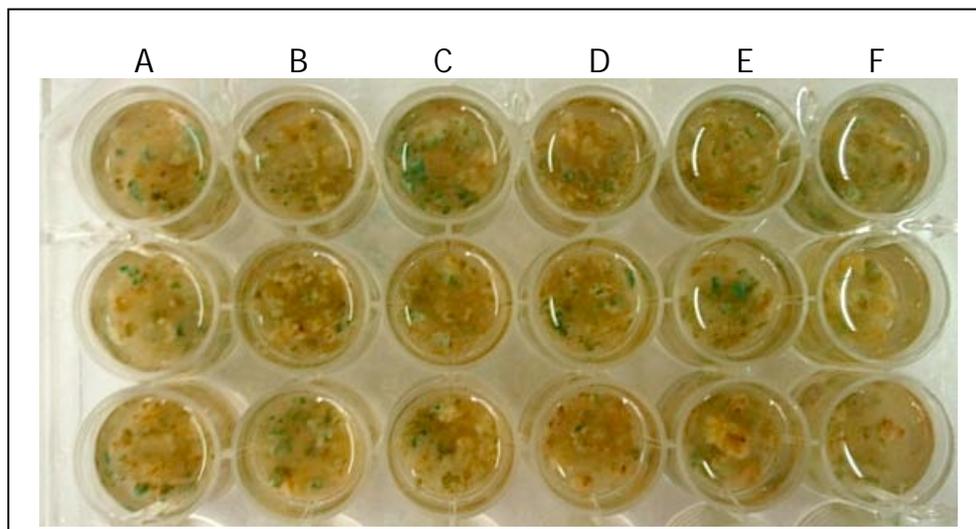


Figura 12. Callos embriogénicos de maíz transformados con los siguientes *cassettes* de expresión vegetal: A, Control negativo (pGPTV-Bar); B, promCYCD2;1/pGPTV-Bar; C, promCYCD4;1/pGPTV-Bar; D, promCYCD5;1/pGPTV-Bar; E, promCYCD5;2/pGPTV-Bar; F, mezcla de las cuatro construcciones. Cada transformación se realizó por triplicado.

Por el momento es de mayor importancia eliminar la actividad endógena de *gus* que presentan los callos embriogénicos con los que contamos para poder determinar la funcionalidad de los promotores evaluados. Otra alternativa que pensamos seguir es el poner a la enzima  $\beta$ -glucuronidasa bajo el marco de lectura del mismo promotor al que se encuentra unido; esto pensando en que esta condición puede incrementar la expresión de este gen y así probablemente incremente la presencia de esta proteína ( $\beta$ -glucuronidasa) en los callos embriogénicos transformados bajo estas nuevas condiciones y seamos capaces de observar una diferencia entre la actividad de *gus* endógena y la producida por la sobreproducción de la enzima debida a la presencia del promotor de cada una de las ciclinas tipo D de maíz.

## 7. CONCLUSIONES

Se clonaron las regiones promotoras de los cuatro genes de ciclinas tipo D de maíz reportados con anterioridad y se comprobó que dichos promotores pertenecen a los genes de las ciclinas CYCD2;1, CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2.

Se logró una caracterización a nivel estructural de los genes de las cuatro ciclinas que corresponde a la reportada de los genes ortólogos de arroz y Arabidopsis, mostrando una conservación evolutiva a través del tiempo en estas tres especies.

Su caracterización *in silico* muestra que cada secuencia promotora contiene elementos de respuesta a factores de crecimiento como hormonas y azúcares pero el número, posición y tipo de estos elementos es diferente en cada promotor, lo cual podría explicar la expresión diferencial de las ciclinas en la germinación.

De acuerdo a los resultados de RACE, la ciclina CYCD2;1 tiene dos sitios de inicio de la transcripción ubicados en -333 pb y -553 pb.

Se obtuvieron los *cassettes* de expresión vegetal con las versiones truncadas del promotor de la ciclina CYCD2;1 y con las versiones completas de cada promotor de las ciclinas CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2 con los que estamos analizando su actividad en cultivos de callos embriogénicos de maíz.

Es necesario seguir con esta metodología para conocer de manera más profunda la estructura de los promotores restantes, es decir, de las ciclinas CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2 y poder determinar los elementos críticos en la regulación de la expresión de estos genes.

## 8. PERSPECTIVAS

- Eliminar la actividad endógena de gus que presentan los callos embriogénicos de maíz para así poder determinar la funcionalidad de los promotores evaluados.
- Segmentar los promotores de las ciclinas CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2 de tal manera que facilite su estudio y se logre determinar los motivos que son cruciales en la regulación de la expresión génica de estas ciclinas, para posteriormente hacer fusiones transcripcionales que permitan evaluar la actividad de dichos fragmentos.
- Realizar nuevamente los ensayos con RACE para poder determinar de manera experimental el sitio de inicio de la transcripción de las ciclinas CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2.
- Realizar fusiones transcripcionales, de todos los promotores mencionados, con la proteína verde fluorescente (GFP) para observar la expresión de dicha proteína bajo el control de cada promotor de ciclina tipo D.
- Transformar cultivos celulares de tabaco y/o arroz, con los *cassettes* de expresión contruidos, para evaluar la expresión de algún gen reportero bajo el control de cada promotor de ciclinas D y comparar los patrones obtenidos en ambos modelos biológicos.

## 9. REFERENCIAS

- **Ali S, Taylor WC** (2001) The 3' non-coding region of a C4 photosynthesis gene increases transgene expression when combined with heterologous promoters. *Plant Mol Biol* **46**: 325–333
- **Altschul SF, Boguski MS, Gish W, Wootton JC** (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet* **6**: 119-129
- **Barroco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inzé D, Mironov V** (2003) Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol Life Sci* **60**: 401–412
- **Becker D, Kemper E, Shell J, Masterson R** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* **20**: 1195–1197
- **Bewley JD, Black M** (1994) In seeds, physiology of development and germination. Ed. Plenum Press, NY.
- **Bieri S, Potrykus I, Fütterer J** (2002) Geminivirus sequences as bidirectional transcription termination/polyadenylation signals for economic construction of stably expressed transgenes. *Mol Breeding* **10**: 107–117
- **Cullis-Wiley CA** (2004) *Plant Genomics and Proteomics*. John Wiley and Sons, Inc. Biblioteca web del IBT-UNAM, pp 89-102
- **Cockcroft CE, den Boer BG, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* **405**: 575–579
- **Cohen, JD** (1982) Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-L-aspartate from seeds of *Glycine max* L. *Plant Physiol* **70**: 749-753

- **De Veylder L, Engler JDA, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Mongagu MV, Engler G, Inzé D** (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* **208**: 453–462
- **Dewitte W, Murray JAH** (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 235–264
- **Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH** (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79–92
- **Dyson N** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**: 2245-2262
- **Frohman MA** (1994) On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods Appl* **4**: S40–S58
- **Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H y Sicinski P** (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**: 431–443
- **Griffin HG, Griffin AM** (1994) *PCR Technology: Current Innovations*. CRC Press, Inc. Boca Raton, E.U.
- **Griffiths A, Gelbart W, Miller J, Lewontin R,** (1999) *Modern Genetics Analysis*. Freeman and Co., cap VII
- **Groenewald JH, Hiten NF, Botha FC** (2000) The introduction of an inverted repeat to the 5´ untranslated leader sequence of a transgene strongly inhibits gene expression. *Plant Cell Rep* **19**: 1098–1101
- **Guerrero-Andrade O** (1998) “Transformación de células de maíz (*Zea mays*

raza tuxpeño) por medio del bombardeo de partículas”. Tesis de Licenciatura.  
Facultad de Ciencias, UNAM

- **Guevara-Garcia A, Lopez-Bucio J, Herrera-Estrella L** (1999) The mannopine synthase promoter contains vectorial cis-regulatory elements that act as enhancers and silencers. *Mol Gen Genet* **262**: 608–617
- **Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F y Vázquez-Ramos JM** (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* **46**:166-73
- **Guo J, Song J, Wang F, Zhang XS** (2007) Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol Biol* **64**: 349-360
- **Harbour JW, Dean DC** (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**: 2393–2409
- **Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300
- **Hill AT** (1977) *Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal*. Ed. Omega, Barcelona
- **Huntley RP, Murray JAH** (1999) The plant cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 440–446
- **Inzé D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105
- **Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J** (2003) Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**: 143–148
- **Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions, beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.

EMBO J **6**: 3901-3907

- **Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL** (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* **36**: W5-9
- **Karszen CM** (1968) The Light promoted germination of the seeds of *Chenopodium album* L. II. Effects of (RS) abscisic acid. *Acta Bot Neerl* **17**: 293-308
- **Karszen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Breekland AE, Koornneef M** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**: 158-165
- **Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, Fitzpatrick-McElligott S** (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* **10**: 286-291
- **Klug SW, Cummings MR** (1999) *Conceptos de genética*. Ed. Prentice Hall, Madrid, pp 43
- **Lara-Núñez A, De Jesús N, Vázquez Ramos JM** (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant* **132**: 79 – 88
- **La HG, Li J, Ji ZD, Cheng YJ, Li XL, Jiang SY, Venkatesh PN, Ramachandran S** (2006) Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa* L.). *Mol Genet Genomics* **275**: 374-386
- **Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ** (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng* **4**: 67–79

- **Mayer AM, Poljakoff A** (1975) The germination of seeds. Ed. Pergamon Press, pp 21-26
- **Meijer M, Murray JAH** (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 44–49
- **Menges M, Pavesi G, Morandini P, Bögre L, Murray JAH** (2007) Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. *Plant Physiol* **145**: 1558-1576
- **Miller CO, Skoog F, Okamura FS, Von Saltza MH, Strong FM** (1956) Isolation structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J Am Chem Soc* **78**: 1375-1380
- **Minshull J, Blow JJ, Hunt T** (1989) Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell* **56**: 947–956
- **Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* **18**: 243–252
- **Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C, Murray JAH** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 749–760
- **Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR** (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal – 28
- **Pines J** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308**: 697–711

- **Quatrano RS** (1987) Plant hormones and their role in plant growth and development. Ed. PJ Davies, Nijhoff, Dordrecht, Hol., p. 494
- **Quiroz-Figueroa F y Vázquez-Ramos JM** (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant* **128**: 556-568
- **Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutiérrez C** (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**: 3527-3533
- **Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE** (1992) *Biology of Plants*. Worth Publishers, Inc. NY, pp 545-562
- **Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrel DA, Sundaresan V, Murray JAH** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* **32**: 1003-1018
- **Robles J y Doers M** (1994) pGEM-T Vector Systems troubleshooting guide. *Promega Notes* **45**: 19
- **Rombauts S, Déhais P, Van Montagu M, Rouzé P** (1999) PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res* **27**: 295–296
- **Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH** (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541–1544
- **Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A** (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett* **460**: 117-122

- **Shen WH** (2002). The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* **7**: 505–511
- **Sherr CJ** (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551–555
- **Sherr CJ** (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **20**: 187 - 190
- **Sherr CJ, Roberts JM** (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**: 2699–2711
- **Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL** (2002) *Bioquímica*. Ed. Reverté, pp 152-153
- **Swaminathan K, Yang Y, Grotz N, Campisi L, Jack T** (2000) An enhancer trap line associated with a D-class cyclin gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 1658–1667
- **Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, De Jager S, Kato K, Kondorosi E, Murray JAH, Ito M, Shinmyo A, Sekine M** (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* **57**: 83-100
- **Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inzé D** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 903–916
- **Van Staden J** (1983) Seeds and cytokinins. *Physiol Plant* **58**: 340-346
- **Wang GF, Kong HZ, Sun YJ, Zhang XH, Zhang W, Altman N, Depamphilis CW, Ma H** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**: 1084–1099
- **Wang F, Huo SN, Guo J, Zhang XS** (2006) Wheat D-type cyclin

Triae;CYCD2;1 regulate development of transgenic Arabidopsis plants. *Planta* **224**:1129-1140.

- **Wu KQ, Hu M, Martin T, Wang C, Li XQ, Tian L, Brown D, Miki B (2003)** The cryptic enhancer elements of the tCUP promoter. *Plant Mol Biol* **51**: 351–362

## ANEXO 1

Secuencias de las regiones promotoras de las ciclinas D de maíz obtenidas experimentalmente. A la derecha de cada secuencia se muestra la posición a partir del sitio de inicio de la traducción. También se muestra una breve descripción de la funcionalidad de cada motivo de unión a factores transcripcionales involucrados con fitohormonas.

```
>CYCD2;1, 873 pb
AAGCTTGCAATAAAACTCCACTCGGGATGACCTGAGGCCAAATTATATAG

TTACAATTTAACGCTTGGGTGGAACCGGAACCATTCAATTTCCGAGTTCG      -774

CTGTCCAAATTCAAAAGATTTAATTGCGTCTCGATAAATCAACAATCAAAT

GAACTAGTCCGTATAATTTTCTCAACATGTTTTGTTTTCTACTAGTACTA      -674

GACTTCCCTTCAATGCCGACGCGCCCTGCATCGAATTTACTAGCCTACAA

TGACGCAGTTTTGAATGATGATACAGTGACAACGGGAAAAAAACTTGCC      -574
TGACG                               YTGTCWC
CCCGCGACACACCTCACGCAAAACACGATCCAGTGTTCGTGCGCGCAAAGG

ATCCGCGCTCCAAAAACCTCTCCTAGGAAAATGCCAAAAACAAAACAAAAC      -474

AAAGCCCCAAGGAGTCGCAGGCATGTTTTACAGAAAACCTCGTCTCTA

TCCAAAACCCGCTCCACCACCACCATCACTATTTACTAGGCACAGCGCCC      -374

GGCCGCCCTACATAAACCCCTGCTCTCCTCCACTCCACTAGTCTCTCTCCT

ACTGTTTACACACTGCAGTGGCCTTGCCGGTGTCTTCTCTCCCTCCTCT      -274

CTCTCGCTCCTCTGTCTCTCCCACTGGGATAAAGAACACAATTAAGAAA

AAATAGGCAAAAAAACATGTACCTTTTTTCTATCTATATTATCTGAATA      -174

AATCAAGAAGAGGAAGAGGGGAGAGGGAGCAGGGAGGGGGAGGAGTAGCA

AATCCAGACTCCATAGAATCAGCTCGCAAGAAGGGGAAAGGGAGGAGGAG      -74

CTTCGCTGGTGAATTGATTGCTCGCTGCTCCAGTCCCGCATTTCGTGCCGT

TTTCGGCAAGTAGGTGGCGTGGCAAGCTT
```

**PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A /CCTTTT (1)** Caja pirimidina. Con GARE (giberelina), está involucrado en represión por azúcar.

**PYRIMIDINEBOXHVEPB1/TTTTTTCC (2)** Caja pirimidina del gen EPB1 (cisteína proteinasa); expresión regulada por giberelina y ABA.

**GCCCORE /GCCGCC (1)** Elemento de respuesta a etileno. Regulación por jasmonato

**DPBFCORED CDC3 /ACACNNG (2)** Regulado por ABA.

**WRKY71OS /TGAC (3)** Sitio de unión a WRKY71 (represor transcripcional en señalización de giberelina).

SEBFCONSSTPR10A /YTGTCWC (1) (*Silencing element binding factor*). Similar a elemento de respuesta a auxina.

ASF1MOTIFCAMV /TGACG (1) Activación transcripcional de genes por auxina y/o ac. salicílico.

ERELEE4 (1) AWTTCAAA Elemento de respuesta a etileno.

>CYCD4;1, 573 pb

```
GGATCCGACTGTCTGTCAAGTCTGTCACTCTCCTCCGGCCGCGTCAACCGG
                YTGTCWC                GTCAA
                                      CGTCA
                                      VCGCGB
CGCGTGCAGCCACGTCCGCCGATCCCCTCGCGGGACGCCTCCCAACCGCC -474
      GMCACGT
GGATCCAGCCGCGCGTACGGCAACGCCCGACTTTCCCCTGCACCCGTCGC
      VCGCGB
GACCGTCCGCCTCCTCCGTTGGCGCCCCGGATGTCTCAGTTTCGGCGTAC -374
                GTCTC
CGCCGCGTGCCTTTCCCAAAACACTCGCGTCCCCCGTGCCCGATACAAA
GCGCGAGGGGCGAAGGCACGCCACCACAACTGCACCGCACTCTGCCTCCC -274
                YAACKG
TCCTCCGTCCGTCCGTCCCTCCCCCCTTGTGCCTTGTCTGCTTCTCCAC
TCGCCACTGCCGCATTCTGCCCAAGTTCCAAACACGCGCACCCAGCCACCC -174
ACCACCCAGCACTCCAGCCGCCAGACCAGAGTCTACGGCGCCCGCCGTTCGC
ACGACAGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGAGGCGCGGGCTTTG -74
                TTGAC
ACTTGCCGCCCGGTGCGTCCGTGCGTGCCTGGTGGGAGGAGTGGGAGACGC
CGGTACAGTACAGGAGCGGATCC
```

GCCCORE /GCCGCC (3) Elemento de respuesta a etileno. Regulación por jasmonato.

WRKY71OS /TGAC (4) Sitio de unión a WRKY71 (represor transcripcional en señalización de giberelina).

WBOXATNPR1 /TTGAC (2) W-box reconocido por ác. salicílico inducido por proteína de unión a DNA WRKY.

MYCCONSENSUSAT /CANNTG (1) Sitio de unión a ATMYC2 (activador transcripcional en señalización de ABA).

MYB2CONSENSUSAT/YAACKG (2) ATMYB2 es activador transcripcional en la señalización de ABA.

ARFAT /TGCTC (1) Factor de respuesta a auxina.

ABREOSRAB21 /ACGTSSSC (1) Elemento de respuesta a ABA en genes rab21 de arroz.

ACGTABREMOTIFA2OSEM /ACGTGKC (1) Secuencia del centro ACGT del motivo A en ABRE.

ASF1MOTIFCAMV /TGACG (1) Activación transcripcional de genes por auxina y/o ac. salicílico.  
 SEBFCONSSTPR10A /YTGTCWC (1) (*Silencing element binding factor*). Similar a elemento de respuesta a auxina.  
 CGCGBOXAT /VCGCGB (7) Regulación por calcio y calmodulina.  
 SURECOREATSULTR11 /GAGAC (2) Elemento de respuesta a sulfuro. Contiene secuencia de unión al factor de respuesta a auxina.

```

>CYCD5;1, 1528 pb
CNATGGGCCGACGNCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATT
                                     VCGCGB
CGATTGGATCCGTTGGCTGCCTCGGTACTGCCTCATCCCGCGTGCAGGTC -1429
CTCCAGAGATTATTGTTACTGCTACCTCCGTCTACCAAAAGGTATAATAA
TTGTAGTTTCTTTCTCCGGACAAAGGTATCTGAAGTTTAGTTGTATTTAT -1329
ATTAATAAATGATATCCGTCCCAAATAGGATTCATTTTAGCTATTAAT
TTTCATATATATATATATATATAACATAATCAAATATTGTATGAATCT -1229
ATTAATTATCTAAAACGAATTTTATTTTGGGGCAGATGGAGTATTATATT
AAATAGGTATATGTATTGCATAAAGAAACTGACTCTACCTATTTAATATT -1129
ATAAATACGGAGACATTCTATATAATTTATTTAAATTGATTGCATTACTC
      GAGAC
CTAGTCATAGGGAGTGTGCTCGAGAGAGCTTGCAACACAATGTCGTAACG -1029
ATCGGTATTTCGCATGAACCCCGTAGAGGTCTACTTTGAAGTTTTTTATAT
GAGACATTACAACCTTTACTTTGAAGTTTTTTGTATGAGACATTACAACCTT -929
GAGAC                                     GAGAC
TCACGGATAAAAAAAAAATTACTGTTATTGTCGTCGTGATTGCAAAGTAAGT
ATAAAAAGAAGCTAACGGTTAGCTGATAAAATTATTTTAGGCTAACAAT -829
TAGTTCATTAGTTTACTGAACCCAGTAAAATAATTTGCTAGCTGTCTAGT
TATTAGTCCTGCGGGTTCCAAACAAGGCCAAGAACTAGTGGCCTCCAGG -729
AATCGAATGACGACCCACAGATTTAAACGCTAAATCGTTACCATCTCTAG
      TGACG
GAACAAAGCATTGGTCTCTAACACTGTAGCTTGTGTTGGTTTTATGTAAAT -629
TAGATGTCTCTGCTAGTTAGGCACCTAATGCGTAGAACACCTACTAAGGA
      GAGAC
TGATCCCCGCTGGTTGCATCCCTGAAGATGTAAATTATTTTCTTCAAAA -529
AATCATCATAATACACATGACTATCCATGAAGATGTATCCAAAAAGATAT
      ACACNNG TATCCAY
CCAGAAAAATATATCTGAAAATTTATCAGGTTATCCGAAATTCGACGGAT -429
  
```

ATCAGTCAATCCGATATTTGTATCCAATATCTAAACTATACTATCCGGATT  
CGAACCCAAAAAACTATCAGACTGAATAATTAGCCTCTTGCAACTATAG -329  
GGTCAATCAAATAACATCCATAAAATTTACATCCTAACTCCACCTCCCATT  
CCTGCTACGGCGAACTCCACCTCCCAATCTCCCATGACTCCATTTTCATTT -229  
CTGTACCTCTCCAGCTGCCCACTTCTCCCCTGTGCTCGCGGGCGCGCGCG  
VCGCGB  
AGTGTGGAGAGAAGGGAGGGAATTCCTCCCTTTTCTGTTTCGGCGCCGTGCT -129  
CGCGCACACACCCGCACGCCCCACGCTGCACGCCGCCTTTTCTCCGTCT  
CCTTT  
TGCTGCTGCAAGTCCGCAACCGCTGGAGGAGGATCCTTTTCCTTCACTTT -29  
TCTTCCCTTTCCCCTGGCACGCGGTCAAT  
VCGCGB

**GCCORE /GCCGCC (3)** Elemento de respuesta a etileno. Regulación por jasmonato.  
**WRKY71OS /TGAC (8)** Sitio de unión a WRKY71 (repressor transcripcional en señalización de giberelina).  
**DPBFCOREDCDC3 / ACACNNG (4)** Regulado por ABA.  
**PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A / CCTTTT (3)** Caja pirimidina. Con GARE(giberelina), está involucrado en la represión por azúcar.  
**E2FCONSENSUS /WTTSSCSS (2)** Consenso E2F.  
**TATCCAOSAMY / TATCCA (4)** Regulación hormonal y por azúcar del gen de  $\alpha$ -amilasa.  
**ARFAT /TGCTC (4)** Factor de respuesta a auxina.  
**SREATMSD /TTATCC (2)** Elemento de represión por azúcar.  
**TATCCAYMOTIFOSRAMY3D / TATCCAY (1)** Elemento de represión de  $\alpha$ -amilasa.  
**ASF1MOTIFCAMV /TGACG (1)** Activación transcripcional de genes por auxina y/o ac. salicílico.  
**CGCGBOXAT /VCGCGB (6)** Regulación por calcio y calmodulina.  
**SURECOREATSULTR11 /GAGAC (5)** Elemento de respuesta a sulfuro. Contiene secuencia de unión al factor de respuesta a auxina.

>CYCD5;2, 1091 pb  
GGCATCCTTAGAACACGGNACTATGTAAATACCATTTAAACATGATAGAT  
TAATCATTTGATTTCTGGTATTTTTAGAGTAGCTAAAAAGTTTTGTGCGT -992  
TGACG  
CACTCTGCCTATATTCTTAAGTAAAAAGATATCTCGCGCAATCAGGCTTG  
TTGATGCCTATGCAATCAAGAGATATGGTGAATCCAACCAAAATCCAACG -892  
GTGATTATTATTTTAAAGTGAAAGGTGTAAAATGTAAAATAGTTACTAGGT  
TTAAGGTGGAAGAGGATAAATATAAAATAAGAGACACTATTAAATTTTGA -792  
TTGGTGGCACCAAAATCGCCTGATTGTCATGATTGCACCAACATGCATGATT

CATGCA

GATTCTTGAAAATATATTCCCTATTTATGCGGACAAACTTGCTAGTGAC -692

ATCCGNAACTAAATGTGTGCGTAGCAAGCATAAAAATCTCAATGCTAAGAA

ATTACGGGACCTAATGTACAACCCTAACACTTTTTGTGCGATAGCAAATCA -592

CGGCCATCTTAATAAATGGAAAGGTATCTAGTTCTGGTAGGGGTTTTTTTT

TTGTTCTGAAGATAAGAGTTGTTTTCCATAAATATGTAGATAAATATGCC -492

AAAAAATCATGCAAAACACGCAATATATGTAAGGTCTACACGAGTAAAAAA

ATTGTAGAAGGCATCGGAACCAAATATATATTGGTGCCATTTTTCCATCT -392

AACAGCCACGTTTCCCAGCAAAGATCAAGCCGCAACAGGTAAACCACAT

GGACGTTACGACTAGCAACCAGCAAATAAGACGTCTAGTTCATGTATGT -292

ATGTATCGCTAACACGTACACAGTACAAGTTGTGGTTCCCACGCTGGCAC

GCCACGCTCCCACTTCTCTTCTCTGCAACTGCTCACCCCTGTGAAAG -192

CGCGCGAGCGTGGAGAAGAATAGGGAGGAAGTTCAGTTCGGTGCCGTGCT

CGCGCGCACCCACCCCGCACGCCGATGCCGCTTTTACTCCGCGCTGCT -92

GCCGCC

CATGCCGCC

GCTGCTGCTGGGACGAAGAAAATCTTTTCTTTCACCTTTCTCTCCTCTTT

ACCCAGTTCATGCACGGGCTCTGATTGACGCCATGGGATCC

TGACG

TTGAC

**DPBFCORED CDC3 / ACACNNG (1)** Regulado por ABA.

**PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A / CCTTTT (1)** Caja pirimidina. Con GARE (giberelina), está involucrado en la represión por azúcar

**WRKY71OS / TGAC (3)** Sitio de unión a WRKY71 (represor transcripcional en señalización de giberelina).

**ASF1MOTIFCAMV / TGACG (2)** Activación transcripcional de genes por auxina y/o ac. salicílico.

**WBOXATNPR1 / TTGAC (1)** W-box reconocido por ác. salicílico inducido por proteína de unión a DNA WRKY.

**RYREPEATBNNAPA / CATGCA (5)** Responde a ABA.

**GCCCORE / GCCGCC (1)** Elemento de respuesta a etileno. Regulación por jasmonato.

**GRAZMRAB28 / CATGCCGCC (1)** Respuesta a ABA.

**SURECOREATSULTR11 / GAGAC (1)** Elemento de respuesta a sulfuro, contiene secuencia de unión al factor de respuesta a auxina (ARFAT).

**CACGCAATGMGH3 / CACGCAAT (1)** Confiere inducibilidad a auxina.