



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Análisis de la expresión de enzimas de la vía de  
Biogénesis de RNAs pequeños (sRNAs) durante la  
embriogénesis somática de maíz”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Vasti Tamara Juárez González

TUTOR PRINCIPAL

Tzvetanka Dimitrova Dinkova

[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Patricia León Mejía

[Instituto de Biotecnología](#)

Ernesto Soto Reyes

[Instituto Nacional de Cancerología](#)

MÉXICO, D. F. Septiembre 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de Tesis fue realizado gracias al apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con los proyectos PAPIIT IN 210912 y PAPIIT IN 211215.

De la misma manera agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo brindado como becaria durante la realización de este proyecto. Así como al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos internacionales.

A mi familia. Especialmente a mi madre quien con su visión de la vida me ha enseñado que nada es imposible y que el esfuerzo, la lealtad, la honradez y la humildad son los pilares que deben forjar al ser humano, te amo madre.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a David Flores Ceja. Por su conciencia y lucha por los derechos humanos. Los logros de este proyecto son también tuyos David, te recordamos siempre en el laboratorio y permanecerás en nuestra memoria.

A mi tutora, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova. Por su apoyo incondicional y confianza. Por ser parte de mi vida durante todos estos años y mostrarme esa infinita pasión por la ciencia. Por ser un ejemplo a seguir tanto en la academia como en la vida. ¡Gracias!

A Hugo Barajas y Dalia de la Torre, quienes me han brindado un hogar sin dudarlo un solo momento. Por ser mi segunda familia, escucharme y amarme tal y como soy.

A mis amigos, quienes han estado en todo momento en mi vida. Especialmente a Brenda I. Bañuelos Torres. Porque mientras yo permanezca en este mundo no te alcanzará el olvido, siempre estás en mi mente Cada logro y nuevo camino recorrido es por ti, y aunque te extraño y me gustaría ver tu sonrisa nuevamente, sé que me acompañas en cada paso y que has dejado una huella en la vida de todas las personas que tuvieron la fortuna de conocer y amar ese espíritu libre tan único. ¡Gracias por hacerme parte de tu historia!

A mi hermosa Universidad, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Por ser fuente de inspiración y amor por la ciencia. Por brindarme un espacio donde puedo soñar y crear. Por ser la cuna de las mentes más brillantes en un país teñido de sangre y desesperanza. Querida UNAM, en ti está la semilla para el cambio.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<b>Maíz</b>	<b>9</b>
<b>Maíz y México</b>	<b>9</b>
<b>La domesticación del maíz: Obtención de variedades e híbridos.</b>	<b>9</b>
<b>Morfología y Reproducción sexual del maíz.</b>	<b>11</b>
<b>Embriogénesis cigótica</b>	<b>13</b>
<b>Hormonas vegetales durante el desarrollo de una planta</b>	<b>14</b>
<b>Embriogénesis Somática</b>	<b>18</b>
<b>Regulación Genética.</b>	<b>21</b>
<b>RNAs pequeños (sRNAs): Grandes reguladores de la expresión genética.</b>	<b>23</b>
<b>DCL, RDR y AGO: Proteínas indispensables para la biogénesis y funcionamiento de sRNAs</b>	<b>27</b>
<b>Proteínas Dicer-Like (DCL)</b>	<b>27</b>
<b>Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs o RdRps)</b>	<b>30</b>
<b>Argonautas (AGOs)</b>	<b>32</b>
<b>Especialización de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de sRNAs</b>	<b>36</b>
<b>Vías de silenciamiento genético mediado por sRNAs</b>	<b>37</b>
<b>miRNAs</b>	<b>37</b>
<b>PhasiRNAs y tasiRNAs</b>	<b>40</b>
<b>NAT-siRNAs</b>	<b>42</b>
<b>hc-siRNAs: La vía de Metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM)</b>	<b>43</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>52</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>55</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>56</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>56</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>57</b>
<b>Análisis filogenéticos y de homología.</b>	<b>57</b>
<b>Embriogénesis somática de maíz</b>	<b>58</b>
<b>Materiales</b>	<b>58</b>
<b>Material biológico</b>	<b>59</b>
<b>Diseción de los embriones e iniciación de los callos embriogénicos</b>	<b>60</b>
<b>Subcultivo y Proliferación en medio N6P</b>	<b>60</b>
<b>Extracción de RNA</b>	<b>60</b>
<b>Diseño de oligonucleótidos</b>	<b>61</b>
<b>Retrotranscripción y Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR)</b>	<b>63</b>
<b>Extracción de Proteínas</b>	<b>64</b>
<b>Cuantificación de proteínas por Método Bradford</b>	<b>65</b>
<b>Electroforesis y Transferencia de Proteínas</b>	<b>65</b>

<b>Western Blot</b>	<b>67</b>
<b>Resultados</b>	<b>69</b>
Reconstrucción filogenética e identificación de homólogos en maíz para las familias de proteínas Dicer like, RNA polimerasas dependientes de RNA y Argonautas.	69
Evaluación de niveles de acumulación de transcritos mediante RT-qPCR.	80
Expresión de los componentes de la maquinaria de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.	80
Niveles de proteínas involucradas en la biogénesis de sRNAs.	84
<b>Discusión</b>	<b>89</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>102</b>
<b>Referencias</b>	<b>104</b>

## Resumen

La embriogénesis es uno de los procesos biológicos más importantes en las plantas. Complejas redes de regulación genética determinan el desarrollo de las plantas a partir de células gaméticas mediante diferenciación celular. Cambios en los programas de expresión genética mediante la utilización de elevadas concentraciones de fitoreguladores provocan la desdiferenciación de células no gaméticas, su propagación como células embrionarias y la capacidad de regenerar una planta; proceso conocido como embriogénesis somática. La embriogénesis somática en maíz se realiza mediante la inducción de masas embriogénicas llamadas callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros en medios de cultivo adicionados con auxinas sintéticas. Recientemente, el silenciamiento genético mediado por RNAs pequeños (sRNAs) se ha implicado como posible mecanismo de regulación durante la inducción de callos embriogénicos, debido a cambios observados en poblaciones específicas de sRNAs.

El presente trabajo se centró en el análisis de tres componentes esenciales de las vías de biogénesis de sRNAs: Las proteínas Argonautas, Dicer like y RNAs polimerasas dependientes de RNA. Los genes correspondientes a estas enzimas han sido identificado en múltiples especies de plantas. Sin embargo, el número de homólogos perteneciente a cada familia varía entre especies. Basándonos en una reconstrucción filogenética y la identidad entre secuencias proteicas de maíz y *Arabidopsis thaliana*. Se identificaron 5, 6 y 24 genes en maíz, correspondientes a las familias DCL, RDR y AGO; respectivamente. Además, mediante análisis *in silico* se encontraron diferencias en la organización estructural de los homólogos de proteínas DCL y AGO de maíz. Aunado a esto, se analizó el perfil de expresión de transcritos de enzimas involucradas en las vías de microRNAs (miRNAs) y RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz. En todos los transcritos analizados se observaron cambios en su expresión durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz. Finalmente, se realizó la identificación de proteínas Argonautas en maíz mediante inmunorélicas tipo Western. Obteniendo patrones de proteínas candidatas a formar parte de la subfamilia de AGO1. En conjunto, los resultados indican que algunos de los componentes esenciales en las vías de biogénesis de sRNAs cambian durante la embriogénesis somática, manteniendo fluctuaciones durante el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz.

## Abreviaturas

2, 4-D	Ácido 2-4 diclorofenoxiacético
AGO	Argonauta
ARF	Factor de respuesta a auxinas
C1 - 22	Callos embriogénicos de 1 - 22 meses
DCL	Dicer Like
ddp	Días después de la polinización
dsRNAs	RNAs de doble cadena
dsRBD	Dominio de unión a RNA de doble cadena
EC	Células embrionarias
EI	Embrión inmaduro
H	Híbrido
hc-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia heterocromáticos
IAA	Ácido 3-Indol acético
LT	Línea Tuxpeño
miRNA	microRNA
NAT-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia naturales antisentido
NRPD	RNA polimerasa IV (Pol IV)
NRPE	RNA polimerasa V (Pol V)
nt	Nucleótidos
no-EC	Células no embriogénicas
PEDC	Células determinadas pre-embriogénicas
phasiRNAs	RNAs pequeños de interferencia en fase
PTGS	Silenciamiento genético postranscripcional
ra-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia asociados a secuencias repetidas
RdDM	Metilación del DNA dirigida por RNA
RDR	RNA polimerasa dependiente de RNA
SAM	Meristemo apical
sRNAs	RNAs pequeños



siRNA	RNA pequeño de interferencia
ssRNA	RNA de cadena sencilla
ta-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia que actúan en trans
TE	Elementos transponibles
TGS	Silenciamiento genético transcripcional
VS	Variedad sintética

## Introducción

### Maíz

#### Maíz y México

El maíz ha sido por muchas generaciones el corazón de la cultura mexicana y permanece como un elemento esencial en el México popular. El maíz en México se cultiva mayormente como alimento y su consumo representa la mayor fuente de proteína y energía en regiones rurales, particularmente en las comunidades más pobres. El maíz está presente en las mesas de millones de mexicanos diariamente en forma de una gran variedad de platillos regionales o simplemente como tortilla. (Vielle-Calzada & Padilla, 2009).

#### La domesticación del maíz: Obtención de variedades e híbridos.

El maíz fue domesticado a partir de su progenitor el teocintle, nombre común dado a un grupo de especies anuales del género *Zea* nativo de México y Centro América. La domesticación dio como resultado un grupo de razas ancestrales distribuidas a través del continente y eventualmente al resto del mundo. Como centro de origen y diversificación de maíz, México posee la mayor diversidad de recursos genéticos de maíz con adaptación a múltiples climas, latitudes y tiempo de crecimiento (Vielle-Calzada & Padilla, 2009).

El término “raza” hace referencia a una población de individuos que comparten un gran número de rasgos heredados genéticamente, lo que permite una distinción fenotípica clara y consistente de otras poblaciones de maíz. El término “variedad criolla” se utiliza para nombrar a poblaciones nativas locales cuyo pedigrí es desconocido. La mayoría de los maíces nativos plantados hoy en día son el resultado de la hibridación entre muchas razas y a menudo entre germoplasma nativo y variedades modernas recientemente introducidas. Hasta ahora no se ha determinado el número total de razas que existen en México (Vielle-Calzada & Padilla, 2009). Sin embargo, existen clasificaciones muy completas como la propuesta por Sánchez y colaboradores en el año 2000 que incluye 50 razas.

La obtención y el mejoramiento de variedades criollas se basa principalmente en la selección de los individuos que presenten ciertas características deseables y en la forma en la que los individuos seleccionados serán cruzados para formar la siguiente generación, es decir la reproducción. Al combinar estas dos variables se obtienen

diferentes métodos de mejora de variedades como: Selección masal, selección de líneas endogámicas y selección de componentes de variedades sintéticas. La selección masal consiste en la elección de los mejores individuos dadas sus características fenotípicas y la obtención de semilla para formar un lote de varios individuos que conformarán la siguiente generación. Por otro lado, la selección de líneas endogámicas da como resultado los llamados híbridos (H). La obtención de híbridos consiste en la selección de plantas individuales en poblaciones de polinización libre, realizar autopolinizaciones sucesivas para la obtención de líneas consanguíneas y la selección de individuos que den las mejores combinaciones híbridas con una mayor proporción de genotipos favorables. Finalmente, la selección de componentes de variedades sintéticas (VS) se realiza mediante la selección de semilla obtenida por polinización libre entre varios genotipos (principalmente híbridos generados por selección de líneas endogámicas). Las VS son generadas a partir del interés de tener individuos con distintos caracteres favorables como la productividad, precocidad y resistencia a enfermedades. La productividad de dichas variedades depende del número de genotipos que intervienen para su formación. En general, las VS de maíz se caracterizan por tener una población variable en altura de planta, tamaño de mazorca, color y tamaño de hoja, jilote y espiga; mientras que en precocidad muestran mayor adaptación a condiciones adversas de clima y suelo. Mientras que los híbridos se caracterizan por tener plantas uniformes en altura, forma y color de hoja, jilote, espiga, floración y madurez. No obstante, su adaptación es más específica a áreas de alto potencial productivo, en donde expresan alto rendimiento de grano. VS-535 y H-565 representan una variedad y un híbrido obtenidas en el estado de Guerrero. VS-535 se considera una variedad de interés comercial por su tamaño mazorca y la buena calidad del grano para la molienda tradicional del sistema de maíz-masa-tortilla y es proveniente de la raza Tuxpeño. En el ciclo temporal, su floración es de 53-55 días y alcanza la madurez fisiológica a los 120 días. Por su parte, H-565 se obtuvo después de un proceso de mejoramiento del híbrido H-507 mediante un programa de obtención de variedades e híbridos de maíz destinados a la elaboración de tortillas por el método tradicional. H-507, representa uno de los híbridos con mayor aceptación entre los productores tropicales de México por su alto potencial de rendimiento. Sin embargo, este híbrido presenta problemas para la disposición de la semilla y comenzó a ser necesario la reducción de la altura de planta de más de 4 metros. H-507 es obtenido mediante la cruce de dos líneas:  $T_{11}$  y  $T_{12}$  (ambas derivadas de la raza Tuxpeño (T)).  $T_{11}$  y  $T_{12}$  se seleccionaron mediante líneas endogámicas para obtener su versión mejorada ( $T_{47}$  y  $T_{48}$ , respectivamente) con un fenotipo de plantas con menor estatura que  $T_{11}$  y  $T_{12}$ . La cruce simple entre estas dos líneas ( $T_{48} \times T_{47}$ ) generó un híbrido de altura intermedia el

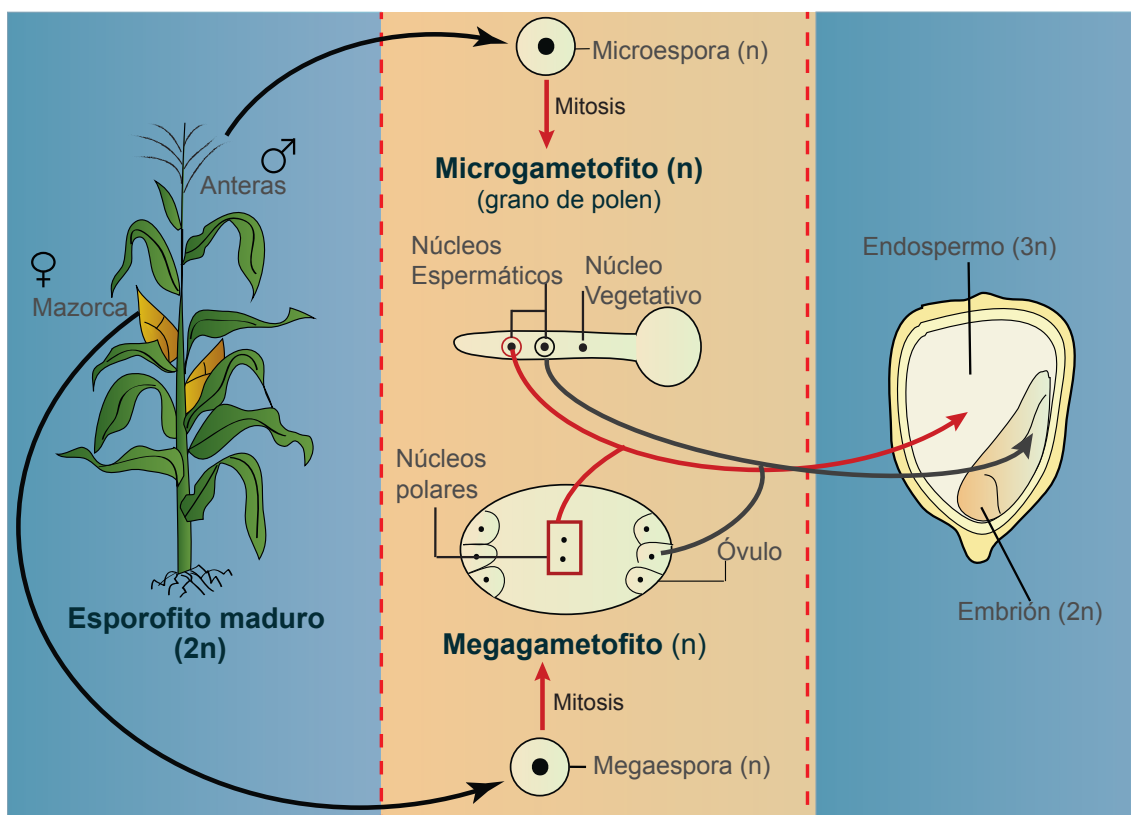
cual fue cruzado con una línea élite LT<sub>154</sub>, proveniente de la población Tuxpeño crema que pertenece a la raza Tuxpeño. La cruza trilineal (T<sub>48</sub> x T<sub>47</sub>) x LT<sub>154</sub> se registró como H-565 y conserva el potencial de rendimiento de H-507 pero con menor altura y más precocidad, permitiendo el incremento de la densidad de población para fines de producción de grano y forraje. Tiene excelente adaptación a climas tropicales y además, presenta tolerancia a la enfermedad de la mancha de asfalto causada principalmente por *Phyllachora maydis*, característica muy importante ya que esta enfermedad es recurrente en el Trópico de México. Su floración en temporal se presenta entre los 61 a 63 días y se cosecha a los 130-135 días (Gómez *et al.*, 2013; Ramírez, 2006).

### **Morfología y Reproducción sexual del maíz.**

El maíz (*Z. Mays L.*) es una gramínea de 1 - 4 m de longitud, con abundantes hojas y un sistema de raíces fibroso con un solo tallo, el cual forma una sucesión de nudos de los cuales se diferencian las hojas. El maíz es una planta monoica con una inflorescencia femenina generada a partir de dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta, la cual se desarrollará en una mazorca cubierta por hojas. En la parte superior de la planta se desarrolla la inflorescencia masculina o panoja, con una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas que producen abundantes granos de polen. En el maíz, el polen (gametofito masculino o microgametofito) es una estructura trinuclear; tiene una célula vegetativa, dos gametos masculinos (núcleos espermáticos) y numerosos gránulos de almidón. El desarrollo de la panoja precede al de la mazorca y después que todas las hojas se han iniciado. El eje de la mazorca u olote contiene numerosos megagametofitos (gametofito femenino o saco embrionario) resguardados por la pared del ovario o pericarpio. El Megagametofito se encuentra formado por 8 núcleos haploides contenidos en siete células: el óvulo, dos sinérgidas, una célula central binucleada (núcleos polares) y tres células antípodas. Los sacos embrionarios al madurar son comunicados a través de los estigmas o estambres que crecen hasta su emergencia por encima de la cobertura de las hojas en la mazorca. Los estigmas se encuentran cubiertos por numerosos pelos o tricomas donde serán retenidos los granos de polen. Los estigmas receptivos son húmedos y pegajosos y el grano de polen germina inmediatamente después de alojarse en los estigmas generando el tubo polínico, el cual necesita 24 horas para recorrer todo el estigma y alcanzar el óvulo dentro del saco embrionario para fertilizarlo. (Figura 1; Pessino & Ortiz, 2010; Cai, 2006; Paliwal *et al.*, 2001; OGTR, 2008).

La polinización de maíz consiste en la llegada de un un grano de polen al estigma. La polinización es la primera de las etapas de una serie que culmina con la formación de

la semilla. La etapa que sigue a la polinización es el desarrollo del tubo polínico que se extiende hasta el saco embrionario. La tercera etapa es un proceso de fecundación llamado “doble fertilización”, propio de las angiospermas y que por mucho tiempo fue considerado la característica distintiva de las mismas. En las etapas de la fecundación (la cual ocurre dentro del megagametofito) participan los dos núcleos espermáticos del microgametofito. Uno de los núcleos espermáticos se combina con el del gameto femenino para dar un cigoto diploide, el segundo núcleo del microgametofito se fusiona con los núcleos polares del megagametofito para formar un núcleo triploide ( $3n$ ), el cual a su vez se divide y forma un tejido triploide llamado endospermo y cuyas reservas nutren al embrión durante su desarrollo inicial hasta la formación de una semilla madura o fruto. En la semilla madura, el pericarpio se encuentra combinado con la cubierta de la semilla para conformar la pared. La semilla consiste en tres partes principales: la pared, el embrión diploide y el endospermo triploide. La parte más externa del endospermo en contacto con la pared se denomina aleurona, la cual presenta funciones digestivas importantes mediante la secreción de hidrolasas que procesan el almidón y proteínas de almacenamiento en las células del endospermo, permitiendo la acumulación de componentes de almacenamiento durante el desarrollo de la semilla y

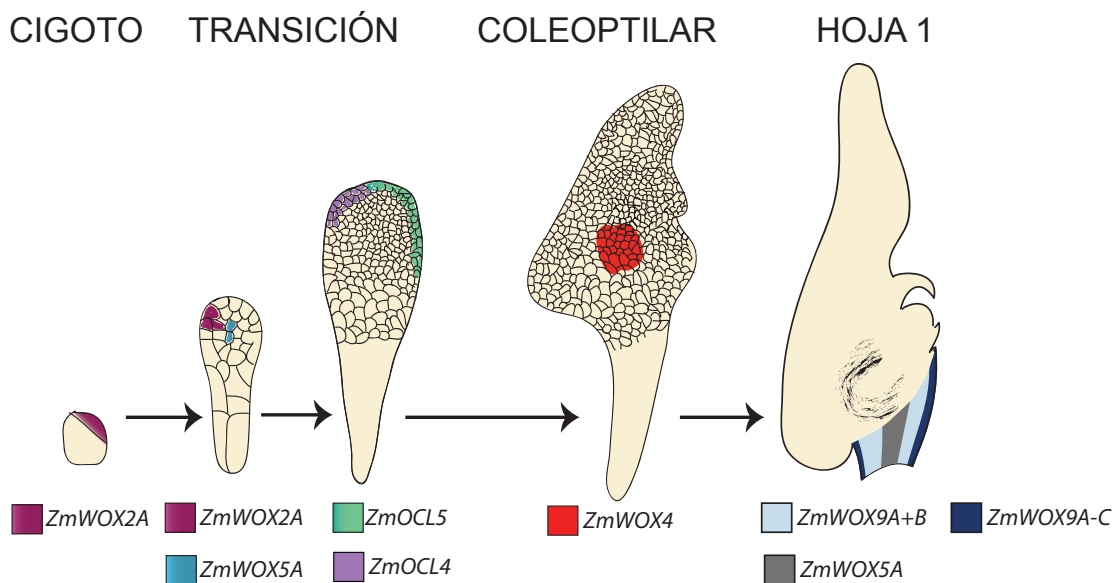


**Figura 1. Modelo de Reproducción sexual de maíz.** Se muestran las inflorescencias femenina (mazorca) y masculina (panoja) (Izquierda); el proceso de doble fertilización a nivel de gametos (centro) y la semilla de maíz (derecha) (Modificado de Walbot & Evans, 2003).

su movilización durante la germinación (Becraft, 2007; Paliwal *et al.*, 2001; Sadava *et al.*, 2009).

## Embriogénesis cigótica

La Embriogénesis cigótica es el programa de desarrollo que inicia a partir de la fertilización y formación del cigoto y continua durante etapas coordinadas para formar un embrión preservado dentro de los tejidos maternos en estructuras específicas y complejas como la semilla (Ronchi & Giorgetti, 1995). Gran parte de los estudios sobre embriogénesis cigótica se han concentrado en plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* o *Daucus carota* (zanahoria), por lo que se tienen muy bien caracterizadas las fases de desarrollo de embriones de estas especies. El maíz (*Zea mays*) es una monocotiledónea herbácea que por su importancia en la agricultura se ha convertido en el modelo embriogénico de las monocotiledóneas. Se han caracterizado diversas fases durante la embriogénesis cigótica de maíz: La primera etapa es llamada etapa proembrionaria, en la que el cigoto diploide lleva a cabo la primera división celular, la



**Figura 2. Modelo de embriogénesis cigótica en *Z. Mays*.** Se muestran las diferentes etapas caracterizadas en maíz y la localización espacio/temporal de marcadores moleculares durante el desarrollo embriogénico (Modificado de Nardmann & Werr, 2009)

cual es asimétrica y da como resultado una célula apical que se desarrollará en el embrión y una célula basal que formará el suspensor. En maíz, sólo la primera división asimétrica tiene un plano predecible y todas las divisiones subsecuentes parecen ser

al azar sin ningún patrón característico, a diferencia de los embriones tempranos de *A. thaliana*, donde se llevan a cabo patrones de división estereotípicos. La siguiente etapa es la de transición, el embrión y el suspensor se alargan a través de divisiones celulares. Las células originadas a partir de la célula apical son pequeñas y ricas en citoplasma mientras que las células del suspensor son largas y vacuolizadas, por lo que estas diferencias celulares permiten discriminar entre el embrión y el suspensor. Entre los 7-9 días de después de la polinización (ddp), se inicia el meristemo apical (SAM, por sus siglas en inglés: Shoot apical meristem) que comienza a ser aparente en secciones de los embriones en etapa coleoptilar, así como una pequeña protuberancia donde por encima emergerá la punta del coletilo. Al final de la etapa coleoptilar, que depende del genotipo y las condiciones ambientales (10-15 ddp), el escutelo, que es considerado como el único cotiledón de los pastos, se alarga apical, basal y lateralmente. Las etapas tardías de la embriogénesis de maíz se nombran acorde al número de hojas (Etapa de hoja 1-6). La última fase de la embriogénesis es la maduración, donde productos como lípidos acumulados en el escutelo incrementan y conforman una parte significativa del embrión mientras que el suspensor es degradado mediante apoptosis. Durante esta fase la capacidad resistir a la desecación se establece antes de la masiva deshidratación del embrión durante la maduración de la semilla de maíz (Nardmann & Werr, 2009; Emons & Kieft, 1995).

## **Hormonas vegetales durante el desarrollo de una planta**

Las hormonas vegetales o fitoreguladores son un grupo de sustancias orgánicas que influyen procesos fisiológicos a bajas concentraciones. Los procesos que son influenciados por las hormonas vegetales son principalmente el crecimiento, diferenciación y desarrollo. La síntesis de las hormonas vegetales puede ser localizada (como ocurre con las hormonas animales) pero también puede distribuirse en una gran variedad de tejidos. Además, las hormonas vegetales pueden ser transportadas y llevar a cabo su acción a distancia. Por ejemplo, las citocininas son transportadas de las raíces a las hojas donde previenen la senescencia y mantienen las actividades metabólicas mientras que la producción de etileno provoca cambios en el mismo tejido o célula donde es sintetizado. Cada hormona vegetal tiene una composición característica con propiedades únicas para desempeñar múltiples funciones de regulación que afectan aspectos diferentes del desarrollo de la planta, haciendo uso de las vías de transducción de señales mediante las cuales una célula genera respuesta a un estímulo. Las señales ambientales como la disponibilidad del agua, el fotoperíodo, la temperatura y la gravedad, influyen a las plantas para que activen la producción y dispersión de fitoreguladores. Cuando una hormona vegetal accede a una célula blanco puede afectar

Tabla I. Fitorreguladores en Plantas (Starr *et al.*, 2009; Davies, 2010)

FITOREGULADOR	FUENTE Y MODO DE TRANSPORTE	EFFECTOS DE ESTIMULACIÓN O INHIBICIÓN
<b>Giberelinas</b>	Tejidos jóvenes de brotes, semillas y posiblemente raíces. Pueden viajar en el xilema y el floema (sistema vascular de la planta).	Elongación de tallos (estimula la división y elongación de células). Favorece que las semillas germinen, ayuda a inducir la floración en algunas plantas.
<b>Auxinas</b>	Meristemos apicales de brotes, coleótilos, semillas. Transporte polar a través de células del parénquima de los brotes hacia la base de la raíz.	Elongación de brotes, coleótilos. Promueve la actividad en el cambio vascular, la diferenciación del tejido vascular. Inhibe la abscisión. Formación de frutos. Bloquea la formación de yemas laterales (dominancia apical).
<b>Citocininas</b>	PREFERENTEMENTE en la punta de la raíz. Viaja de las raíces a los brotes dentro del xilema.	Estimula la división celular en raíces y brotes, la expansión de las hojas. Inhibe el envejecimiento de las hojas.
<b>Etileno</b>	La mayoría de los tejidos que experimentan maduración, envejecimiento o estrés. Se difunde en todas direcciones.	Afecta la orientación de los tejidos, suscitando o inhibiendo el crecimiento de la célula; la maduración de frutos; causa la abscisión y el envejecimiento y muerte.
<b>Ácido abscísico (ABA)</b>	Células de la raíz en respuesta a tensión por falta de agua. Viaja de las raíces a las hojas dentro del Xilema.	Estimula el cierre de estomas. Induce el transporte de productos fotosintéticos de las hojas a las semillas. Estimula la formación de embrión en las semillas. Puede inducir y mantener la latencia en algunas plantas.
<b>Brasinoesteroides</b>	Localización celular ubicua	Promueven la división y elongación celular, la diferenciación vascular. Inhiben el crecimiento y desarrollo de raíces. Promueven la síntesis de etileno.
<b>Ácido Jasmónico (JA)</b>	Tejidos jóvenes y estructuras reproductivas como frutas y flores.	Papel en la defensa contra patógenos mediante la síntesis de inhibidores de proteasas. Inhibe crecimiento y germinación de las semillas. Promueve senescencia y la pigmentación. En <i>Arabidopsis thaliana</i> es esencial para el desarrollo reproductivo masculino.
<b>Ácido Salicílico</b>	Se acumula en hojas después de infecciones por patógenos	Resistencia contra patógenos. Inducción de termogénesis y se ha reportado que induce la longevidad en flores, inhibiendo a biosíntesis de etileno. Inhibición de la germinación y revierte los efectos de ABA.
<b>Óxido Nítrico (NO)</b>	ABA estimula la producción de NO en las células oclusivas de los estomas.	Respuestas de estrés y recientemente se le ha asignado un rol específico en las células oclusivas induciendo el cierre de los estomas
<b>Estrigolactonas</b>	Son sintetizadas en células de la raíz en muy bajas concentraciones.	Estimulación de la germinación y la ramificación de raíces. Estimulan la absorción de agua y nutrientes del suelo. Censado de deficiencia de nutrientes en el suelo.
<b>Poliaminas (PAs)</b>	Localización celular ubicua	Esenciales para el crecimiento de la planta, particularmente en división y proliferación celular, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Estimula la morfogénesis. Inhibición de senescencia



la expresión de genes, la actividad enzimática o activar otras moléculas en el citoplasma. Las hormonas vegetales clásicas identificadas en la primera mitad del siglo XX son:

auxinas, ácido abscísico (ABA), citocininas, giberelinas y etileno. Recientemente, muchos componentes adicionales han sido reconocidos como fitoreguladores, incluyendo los brasinoesteroides, jasmonato, ácido salicílico, óxido nítrico, estrigolactonas y poliaminas (Tabla I). La mayoría de los procesos fisiológicos parecen estar gobernados por la interacción de estos compuestos ya sea en forma simultánea o en orden secuencial. Los diferentes fitoreguladores poseen estructuras químicas muy variadas y diversos sitios de síntesis, en consecuencia su transporte ocurre de varias formas. Se han identificado numerosas proteínas relacionadas en la señalización hormonal vegetal y el análisis de estas proteínas ha contribuido significativamente a la obtención de modelos actuales de las vías de señalización hormonal. Uno de los grandes logros ha sido la identificación de receptores de auxinas, giberelinas, jasmonatos y ácido abscísico. Sin embargo, la investigación en el campo de los fitoreguladores aun se encuentra lejos de elucidar completamente como es la percepción y señalización entre los diferentes fitoreguladores (Sadava *et al.*, 2009; Davies, 2010; Starr, 2009; Herrera *et al.*, 2006; Santner & Estelle, 2009).

Las auxinas fueron de los primeros fitoreguladores descubiertos. Las hojas jóvenes, las flores y los embriones en desarrollo producen auxinas, aunque en menor medida que los meristemos. Las auxinas son hormonas vegetales que promueven o inhiben la división y la elongación celular, dependiendo del tejido donde se lleve a cabo su acción. El ácido 3-indol acético (IAA, por sus siglas en inglés) es la auxina predominante en las plantas; es un fitoregulador indispensable que regula muchos aspectos en el desarrollo de la planta comenzando con la primera división celular del cigoto. Participa en la polaridad y el desarrollo del embrión en respuesta a estímulos ambientales (Starr *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2008; Teale *et al.*, 2006).

Existen auxinas sintéticas como el ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4-D) uno de los herbicidas más usados en el mundo. Y aun cuando se conoce la influencia de las auxinas en la división, elongación y diferenciación celular, la forma exacta en que están implicadas en cada proceso (y en qué medida se relacionan) no es completamente conocida. La razón por la que las auxinas han atraído tanta atención durante casi un siglo, no sólo es porque tienen la capacidad de influir en el crecimiento. Durante la últimas dos décadas, múltiples estudios han permitido elucidar parte de los mecanismos moleculares relacionados a la percepción y transducción de señales de las auxinas. La respuesta celular a las auxinas es mediada por receptores membranales nombrados en

*Arabidopsis thaliana* como TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) y sus proteínas homólogas AUXIN-SIGNALING F-BOX PROTEINS (AFB1/2/3/4/5), las cuales son componentes de los complejos enzimáticos tipo Skp1/Cullin/F-box (SCF) Ubiquitin ligasas 3 (E3). Las ligasas E3 son las últimas enzimas en la vía de conjugación y ubiquitinación de proteínas. Las auxinas se unen a los receptores TIR. Los receptores TIR interactúan con dos grandes familias de factores transcripcionales: Las proteínas Aux/IAA (por sus siglas en inglés; auxin/indole-3-acetic acid) y los factores de respuesta a auxinas (ARFs). La unión de la auxina a los receptores TIR promueve la afinidad de las proteínas AUU/IAA al receptor, resultando en la ubiquitación y su posterior degradación mediante el sistema de proteosoma. Permitiendo la liberación de el ARFs que se unirá a los promotores de los genes de respuesta a auxinas. El evento clave en la vía de señalización de auxinas es la degradación de AUX/IAA, puesto que permite la liberación y activación de los ARFs que llevarán a cabo la activación o represión de la transcripción. La alteración en las concentraciones de auxinas provoca cambios rápidos en la transcripción, por lo que se han implicado algunos otros receptores como ABP1 (por sus siglas en inglés; Auxin binding protein 1) cuya pérdida de función en *Arabidopsis* provoca un fenotipo letal. Importamente, se ha demostrado que ABP1 inhibe la endocitosis de los acarreadores de eflujo de auxinas PIN (por sus siglas en inglés; PIN-FORMED). Los acarreadores PIN son proteínas transmembranales esenciales para el transporte polar de auxinas, mecanismo esencial para el transporte direccional de auxinas entre células y la formación de gradientes de concentración que permiten establecer diferentes tipos celulares, principalmente durante la formación de los meristemas en etapas tempranas de la embriogénesis. La endocitosis de los PINs permite el reciclaje y una relocalización de estas proteínas resultando en respuestas dinámicas a los estímulos externos y la redistribución de las auxinas a través de los tejidos (Depuydt & Hardtke, 2011; Shan *et al.*, 2012; Durbak *et al.*, 2012; Santner & Estelle, 2009; Teale *et al.*, 2006).

Otro aspecto interesante en la regulación mediada por auxinas es su interacción con las vías de regulación de citocininas, principalmente durante las etapas tempranas de la embriogénesis. Se sabe que ratios elevados en las concentraciones de auxinas/citocininas promueven el desarrollo de tejidos relacionados a las raíces, mientras ratios bajos entre auxinas/citocininas promueven la dediferenciación celular. Señalando la pluripotencialidad de las plantas y su potencial mediante regímenes hormonales para el control de la organogénesis. En conjunto con las auxinas, las citocininas constituyen el mayor grupo de hormonas vegetales que regulan la división celular, por lo que el balance entre estos dos grupos de compuestos determinan en gran

medida la etapa de desarrollo de una planta (Galinha *et al.*, 2009; Roef & Van Onckelen, 2010)

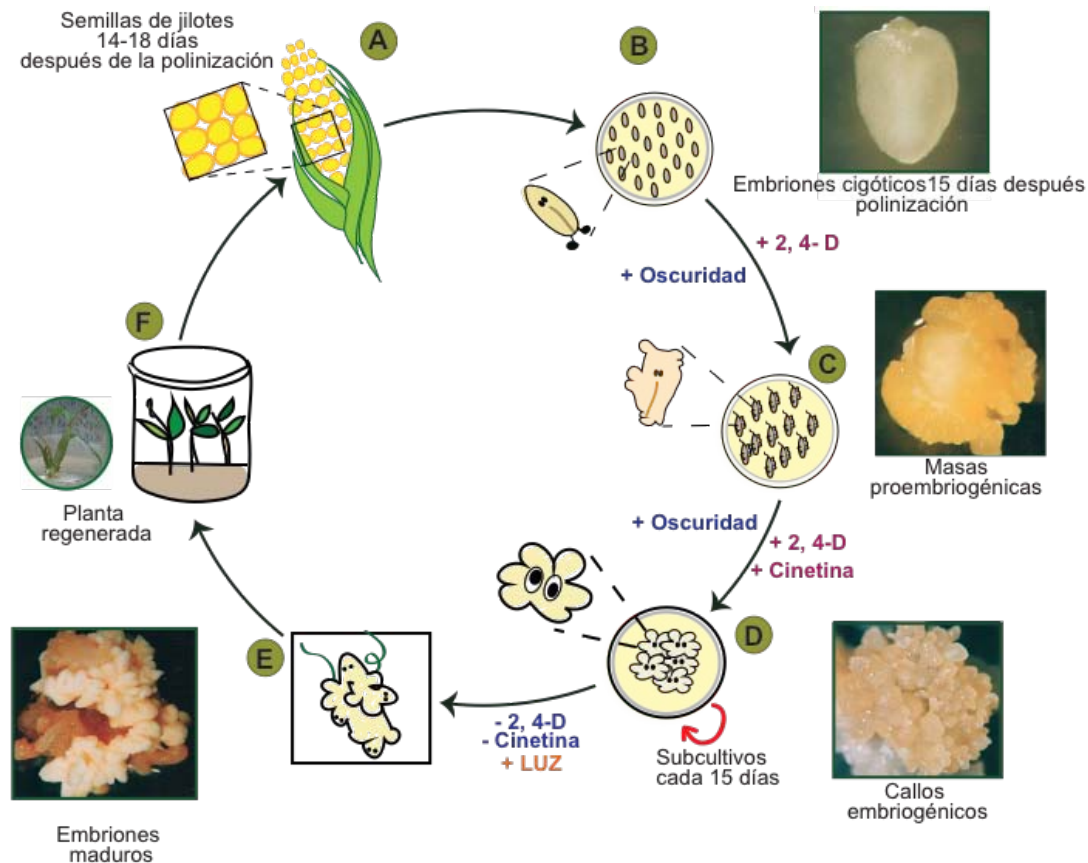
## Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática es el proceso de desarrollo por el que células somáticas bajo condiciones de inducción se reprograman para generar células embrionarias. Estas células sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que resultan en la formación de un embrión no cigótico capaz de regenerar una planta. La embriogénesis somática representa una vía única de desarrollo que incluye gran número de eventos característicos: desdiferenciación de las células, activación de la división celular, reprogramación de su fisiología, metabolismo y patrones de expresión de genes (Jakubekova *et al.*, 2011; Garrocho-Villegas *et al.*, 2012).

La inducción de embriogénesis somática parece consistir en la terminación del programa genético existente en el tejido explante y reemplazarlo por un patrón de expresión genética embrionaria en el que las células del tejido explante darán origen a embriones somáticos. Los tratamientos para la obtención de embriones somáticos dependen de si el explante inicial consiste en células que ya expresan un programa genético embrionario (PEDCs, por sus siglas en inglés “pre-embriogenic determinated cells”) o células no embriogénicas (no-EC). En el primer caso, un estímulo para la división celular será suficiente para producir embriones somáticos en el tejido de explante, proceso conocido como embriogénesis somática directa. En contraste, los tejidos no-EC, deben llevar a cabo numerosas divisiones mitóticas en presencia de una auxina durante la inducción del estado de células embrionarias (EC) . Las células resultantes de estas divisiones mitóticas se manifiestan como “callos” o agregados celulares y el término “regeneración indirecta” se utiliza para indicar que la “fase de callos o proliferación” interviene entre el explante original y la obtención de embriones somáticos (Merkle *et al.*, 1995).

Dado que la regeneración de plantas vía embriogénesis somática comienza con unas pocas células, este tipo de regeneración resulta importante para la producción de plantas y biotecnología como la propagación clonal y la transformación genética. Sin embargo, el éxito en la inducción de embriones somáticos y subsecuentemente la recuperación de plantas viables no es sencillo y eficiente para la mayoría de las especies de plantas. Además de factores nutricionales y el uso de altas concentraciones de fitoreguladores, el explante del que se parte y el genotipo de la planta influyen en la capacidad de generar EC. En pastos como el maíz, la capacidad embriogénica parece

estar limitada a la utilización de embriones e inflorescencias u hojas en estado meristemático como explante inicial. En cuanto al genotipo, se podría pensar que la embriogénesis somática debería ser un fenómeno universal para todas las plantas con semillas. Sin embargo, genotipos individuales de algunas especies (como el maíz) varían enormemente en su capacidad embriogénica. Estas diferencias entre la capacidad embriogénica podrían reflejar las diferencias entre el funcionamiento de elementos clave en las vías embriogénicas (Merkle *et al.*, 1995; Emons & Kieft, 1995).



**Figura 3. Embriogénesis somática indirecta y regeneración de planta a partir de embriones inmaduros de maíz.** A: Jilotes 15 días después de la polinización B: Embriones inmaduros (EI) de *Zea mays L.* 15 días después de la polinización; C: Cultivo de inducción, los EI se mantienen en el medio N6I en presencia de 2,4-D por una semana. Primeros cambios morfológicos para formar masas proembriogénicas; D: Cultivos de proliferación en medio N6P que contiene 2,4-D y cinetina. Se subcultivan las células cada 15 días. Después de varios subcultivos se obtienen callos embriogénicos de maíz; E: Al retirar las condiciones de inducción, las células comienzan a diferenciarse en embriones maduros. F: Planta regenerada (Jakubekova *et al.*, 2011).

En el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, se utilizan embriones inmaduros de maíz cosechados en un periodo entre los 14 y 18 días después de la polinización para el establecimiento de cultivos de callos embriogénicos. Para la iniciación y propagación de callos embriogénicos se utiliza el medio N6 (Chu *et al.*, 1975), un medio de cultivo capaz de mejorar la formación, crecimiento y diferenciación de callos embriogénicos, enriquecido con la auxina sintética: el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4 -D) y condiciones de

oscuridad. Una semana después de la inducción de los embriones inmaduros, son subcultivados a un medio N6 enriquecido con cinetina, una citocinina que en combinación con el 2,4-D potencia la división celular y proliferación de callos embriogénicos (Jakubekova *et al.*, 2011). Una vez que se tienen los callos en este medio de cultivo, son subcultivados cada dos semanas, removiendo las partes que presentan oxidación. Los cultivos de callos embriogénicos pueden mantenerse hasta por dos años y después regenerar una planta retirando las auxinas, citocininas y exponiendo los tejidos a la luz. En maíz, se distinguen dos tipos de callos, los de tipo I y tipo II. Los callos tipo II, también llamado “callos friables”, consisten en agregados de células indiferenciadas con células meristemáticas alrededor del agregado, las cuales se encuentran altamente empaquetadas, con pared celular delgada, ricas en citoplasma, altamente basofílicas y contienen múltiples pequeñas vacuolas, cuerpos lipídicos y granos de almidón. Durante la inducción de callos embriogénicos se encuentran estas células dividiéndose y darán origen a EC y células que no se dividen las cuales tienen paredes celulares más gruesas, son alargadas y tienen grandes vacuolas y pocos gránulos de almidón. Parece ser que los altos niveles de 2,4-D son necesarios para preservar la naturaleza indiferenciada de los cultivos. Si la concentración de 2,4-D disminuye, las células comienzan a diferenciarse y madurar, formando el escutelo. Los callos blancos y opacos Tipo I, representan una etapa posterior en la diferenciación de los callos Tipo II, contienen estructuras tipo escutelo. Durante la regeneración, un tercer tipo de callos puede ser identificado, los callos rizogénicos, en los que cuando la concentración de 2,4-D es disminuída, los callos sólo forman raíces y no una planta viable (Emons & Kieft, 1995; Che *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012).

La aplicación de auxinas es capaz de alterar el programa genético fisiológico de los tejidos explante, que previamente determinaba su estado diferenciado. Las células que responden a las auxinas, se desdiferencian y comienzan a dividirse. Sin embargo, como las auxinas provocan esta reprogramación es poco entendida. Se sabe que la aplicación de ciertas concentraciones de auxinas causa hipermetilación del DNA, sugiriendo este mecanismo epigenético como importante para la reprogramación y desdiferenciación de células. Por otro lado, se ha observado que la aplicación de auxinas sintéticas puede afectar los niveles de auxinas endógenas (especialmente ácido indolacético, IAA), los niveles de IAA se ven considerablemente reducidos en presencia de 2,4-D. Parece ser que el 2,4-D interfiere directamente con la síntesis o en la conjugación/degradación del IAA. No obstante, sea cual sea la naturaleza de la auxina, debe ser percibida por los receptores celulares para desencadenar una cascada de transducción de señales

particular que dará lugar a la respuesta fisiológica final como la expansión celular, la división celular, desdiferenciación y organogénesis, dependiendo de las concentraciones de auxina aplicada. Por lo que la presencia de distintos receptores podría explicar las diferencias en la capacidad embriogénica de los explantes iniciales. Y como se mencionó anteriormente, la mayoría de los procesos de desarrollo controlados por auxinas incluyen la modulación de la expresión genética de manera positiva o negativa. Hoy se sabe que a altas concentraciones de auxinas, los complejos ARF-Aux/IAA se disocian y las Aux/IAs son ubiquitinadas por los que los ARFs pueden activar la transcripción (Machakova *et al.*, 2008).

Otro aspecto interesante es el relacionado con la señalización entre células en los cultivos celulares, se ha reportado que durante la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis*, las señales entre las células del suspensor y el embrión propiamente dicho controlan el correcto desarrollo embriogénico (aun cuando el suspensor no influye en el desarrollo del embrión), la disrupción de las señales entre el suspensor y embrión puede causar que el suspensor obtenga un estado tipo embrionario. Durante la inducción de callos embriogénicos, parece ser importante la presencia de no-EC, que podrían jugar un papel señalizador (como el suspensor durante la embriogénesis cigótica). Recientemente, estudios realizados en *Quercus suber* mostraron la presencia de pectinas altamente esterificadas en las paredes celulares de EC en proliferación, mientras que las paredes celulares de no-EC presentaban también pectinas pero en formas no esterificadas, las diferencias entre las pectinas de paredes celulares de EC y no-EC no sólo resulta en un buen marcador de embriogénesis y proliferación celular, sino que ha servido como base para apoyar las ideas sobre la señalización celular entre los diferentes tipos celulares durante la inducción de callos embriogénicos. Además se demostró que la presencia de EC con pectinas altamente esterificadas de tipo Arabinogalactano (AGPs por sus siglas en inglés "Arabinogalactan proteins") promueve la desdiferenciación y formación de embriones somáticos en no-EC, sosteniendo de la idea de que las AGPs pueden originar moléculas con funciones en señalización celular. Sin embargo, no existe suficiente información que confirme un papel de las células no-EC durante la embriogénesis somática mediante la comunicación celular (Von Arnold, 2008; Rodríguez-Sanz *et al.*, 2012).

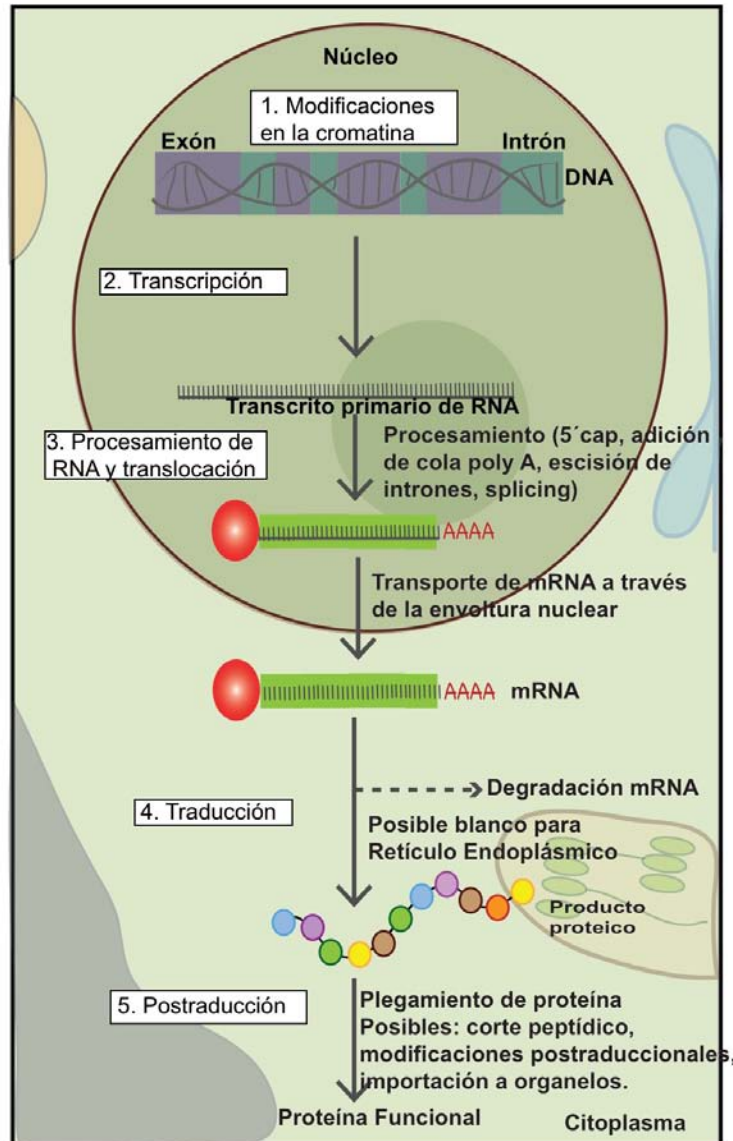
## **Regulación Genética.**

Una de las áreas de mayor importancia para comprender el funcionamiento de los seres vivos es la regulación de la expresión de sus genes. Hoy se sabe que la abundancia y

distribución del producto final de un gen se regula en diferentes niveles y que cada nivel provee una forma de incrementar la diversidad de los mismos (Figura 4). La primera etapa es la transcripción, que en el genoma nuclear es el nivel primario de la regulación génica. La transcripción es controlada mediante elementos reguladores presentes en y alrededor de cada gen. Los factores de la transcripción pueden cambiar programas enteros de desarrollo, resultando en cambios de identidad de las células y órganos (Kaufmann, 2010).

Adicionalmente, los genes nucleares también son objeto de mecanismos de regulación epigenética, los cuales incluyen expresión de RNAs pequeños no codificantes, metilación del DNA, variaciones en las proteínas que empaquetan al DNA en cromosomas (histonas), remodelación de la estructura de la cromatina y modificaciones en los extremos amino-terminal de las histonas, como metilación, ubiquitinación y fosforilación. Estas modificaciones pueden tener una gran variedad de efectos sobre la transcripción y otros procesos (TGS, por sus siglas en inglés “Transcriptional Gene Silencing”; Springer, 2013).

Mientras que la transcripción es el nivel predominante de regulación de la expresión génica al menos para genes nucleares, estudios durante la última década han revelado que la abundancia y la distribución del producto final de un gen también depende de la regulación postranscripcional. Después de la transcripción, el transcrito primario puede ser procesado en gran variedad de formas para obtener un transcrito maduro. La mayoría de los genes nucleares de las plantas contienen intrones (secuencias no codificantes) que deben ser removidos, las variaciones en los patrones de *splicing* (corte y empalme del transcrito primario para remover intrones) pueden producir diferentes tipos de RNA mensajeros (mRNA) llamados variantes de *splicing*, que codifican diferentes proteínas. Una vez que se lleva a cabo la traducción y las proteínas son sintetizadas, éstas se pliegan en conformaciones funcionales y a menudo son químicamente modificadas mediante fosforilación o glicosilación; el plegamiento y las modificaciones son factores determinantes en la estabilidad de la proteína. La regulación postranscripcional de la expresión génica es controlada mediante elementos regulatorios presentes en el transcrito primario y maduro, así como por secuencias de péptidos señalizadores en la proteína. Aunado a esto, existen mecanismos epigenéticos de regulación postranscripcional, a estos mecanismos se les conoce como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés “Postranscriptional Gene Silencing”) o silenciamiento por RNA. (Twyman, 2003).



**Figura 4. La expresión de genes en eucariontes puede ser regulada a distintos niveles.** (1) Regulación genómica; por amplificación génica, rearrreglos de DNA, descondensamiento o condensamiento de la cromatina, modificaciones en el DNA (metilación, por ejemplo) (2) Regulación transcripcional (3) Control Postranscripcional (procesamiento y translocación de RNA fuera del núcleo) (4) Control traduccional (5) Control Postraduccional (Modificado de ©Nature Education, 2010)

## RNAs pequeños (sRNAs): Grandes reguladores de la expresión genética.

El RNA tiene muchas más funciones además de ser un simple mensajero entre el genoma y el proteoma. Hace casi 30 años fueron descubiertos distintos RNAs pequeños no codificantes de ~21 nucleótidos (nt) en células eucariontes, los cuales parecían tener un papel central en diversos procesos como desarrollo respuestas a estrés y cambios ambientales (Bonnet, *et al.*, 2006).

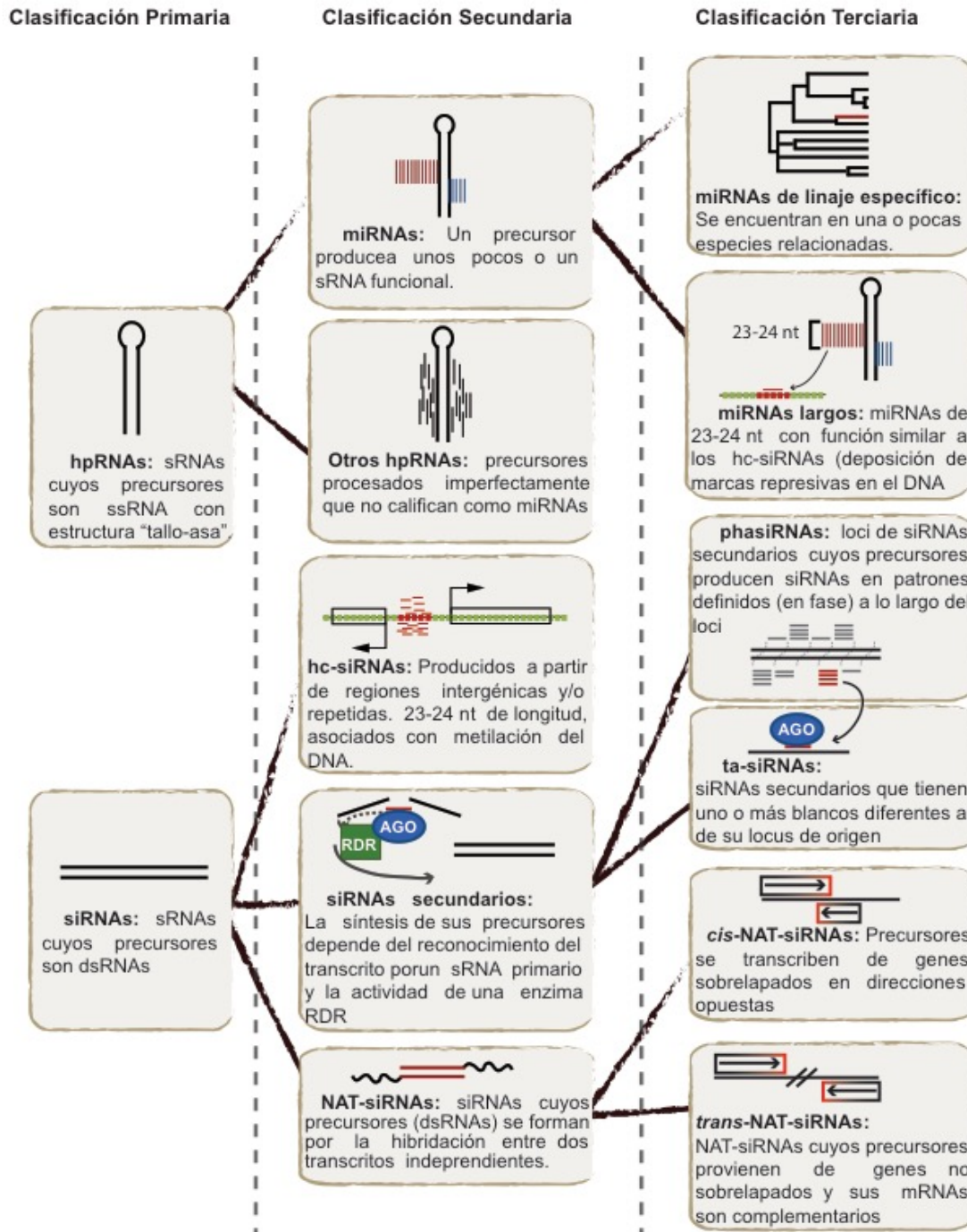


En plantas se ha encontrado la mayor diversidad de sRNAs y proteínas relacionadas con su biogénesis y función. La diversificación de las vías de silenciamiento por RNA en plantas podría reflejar la necesidad de responder ante el estrés biótico y abiótico siendo un organismo sésil. Los mecanismos basados en silenciamiento genético por RNA en plantas, se encuentran relacionados con la inactivación o represión de gran variedad de elementos genéticos exógenos y endógenos; incluyendo genes, transposones, virus y transgenes, brindando diversos niveles de regulación genética. El descubrimiento de los mecanismos de regulación basados en sRNAs han transformado nuestro entendimiento de la regulación genética, ya que mecanismos de formación de heterocromatina establecen un control en la expresión de transposones, además del silenciamiento genético postranscripcional, en los que RNAs no codificantes de ~21-24 nt de longitud y sus proteínas asociadas, participan en el reconocimiento y control de la expresión genética (Guildiyal & Zamore, 2009; Howell *et al.*, 2007; Bonnet *et al.*, 2006; Ramesh *et al.*, 2013; Malone & Doudna, 2009; Wilson, 2013).

**Tabla II. Principales Clases de sRNAs en plantas.**

CLASE	DESCRIPCIÓN	TAMAÑO	ORIGEN GENÓMICO	FUNCIÓN
miRNAs	microRNAs	21 nt	Genes MIR	Regulación de la estabilidad del mRNA y su traducción
NAT-siRNAs	RNAs pequeños de interferencia naturales antisentido	21 o 22 nt	Transcritos bidireccionales inducidos por estrés	Regulación de genes de respuesta a estrés
phasiRNAs	RNAs pequeños de interferencia en fase.	21 nt	Loci PHAS	Regulación postranscripcional
hc-siRNAs o ra-siRNAs	RNAs pequeños de intereferencia heterocromáticos o asociados a secuencias repetidas	24 nt	Secuencias repetidas y transposones	Regulación transcripcional (modificación de la cromatina)

Los sRNAs en plantas pueden dividirse en varios grupos. Dentro de las categorías más importantes se incluye a los microRNAs (miRNAs) y RNAs pequeños de interferencia (siRNAs). Dentro de la categoría de los siRNAs se encuentran: siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs; de 24 nt de longitud, también nombrados como ra-siRNAs; siRNAs asociados a secuencias repetidas); siRNAs secundarios en fase (phasiRNAs; de 21 nt de longitud, también nombrados como ta-siRNAs; por siRNAs que actúan en trans) y siRNAs naturales antisentido (NAT-siRNAs; de 21, 22 y 24 nt de longitud). Estas categorías se han definido de acuerdo a su origen y mecanismos de biogénesis (Tabla II; Fei *et al.*, 2013).



**Figura 5. Sistema de clasificación jerárquica para sRNAs endógenos de plantas.** Las líneas café oscuro indican las relaciones jerárquicas. Abreviaciones: dsRNA, RNA de doble cadena; hpRNA, RNA con estructura tallo asa; miRNA, microRNA; NAT-siRNA, RNAs pequeños de interferencia naturales antisentido; hc-siRNA, siRNAs heterocromáticos AGO, proteínas Argonauta; RDR, proteína RNA polimerasa dependiente de RNA (Modificado de Axtell, 2013).

El primer nivel para clasificar los diferentes tipos de sRNAs está dado por el origen y estructura de los precursores de sRNAs. En este sentido, se pueden distinguir 2 grupos. En primer lugar se encuentran los sRNAs derivados de precursores de cadena sencilla

(ssRNA; single strand RNA), los cuales poseen complementariedad intramolecular, por lo que forman estructuras en forma de tallo asa (hpRNAs; hairpin RNAs), los miRNAs representarían el grupo más importante de hpRNAs. El segundo grupo se encuentra conformado por sRNAs que derivan de precursores de doble cadena (dsRNA; double-stranded RNAs), dentro de este grupo se encuentran todas las clases de siRNAs (Figura 5; Axtell, 2013).

Los hpRNAs y siRNAs pueden tener clasificaciones subsecuentes, basadas en diferencias durante su biogénesis y/o función. Los hpRNAs se pueden subdividir en miRNAs y cualquier otro tipo de hpRNAs. Mientras que los siRNAs, pueden clasificarse como hcRNAs, siRNAs secundarios y NAT-siRNAs (Figura 5). Los miRNAs se pueden dividir en dos tipos: miRNAs de linaje específico, es decir, miRNAs que se encuentran en sólo una especie o en especies muy relacionadas; y miRNAs largos, que son miRNAs de 23-24nt de longitud con funciones similares a los hcRNAs, como la deposición de marcas represivas heterocromáticas. Por otro lado, los siRNAs secundarios pueden dividirse como phasiRNAs, que son siRNAs derivados de loci específicos, cuyos precursores de dsRNAs tienen un procesamiento uniforme y constante, resultando en la producción de un juego de siRNAs en fase, es decir, los patrones de producción de phasiRNAs siempre serán los mismos y se encontrarán en serie, lo cual permite mapear las poblaciones a lo largo de un locus específico y por otro lado ta-siRNAs, que son siRNAs secundarios que tienen más transcritos blancos además de su locus de origen. Finalmente los NAT-siRNAs, cuyos precursores de dsRNAs son formados por la hibridación mediante complementariedad de dos RNAs transcritos independientemente; se dividen en *cis*-NAT-siRNAs, cuyos precursores son transcritos de genes sobrelapados en distintos sentidos o cadenas, y *trans*-NAT-siRNAs, en los que sus precursores derivan de genes no sobrelapados cuyos transcritos presentan complementariedad entre ellos (Figura 5; Axtell, 2013; Fei *et al.*, 2013).

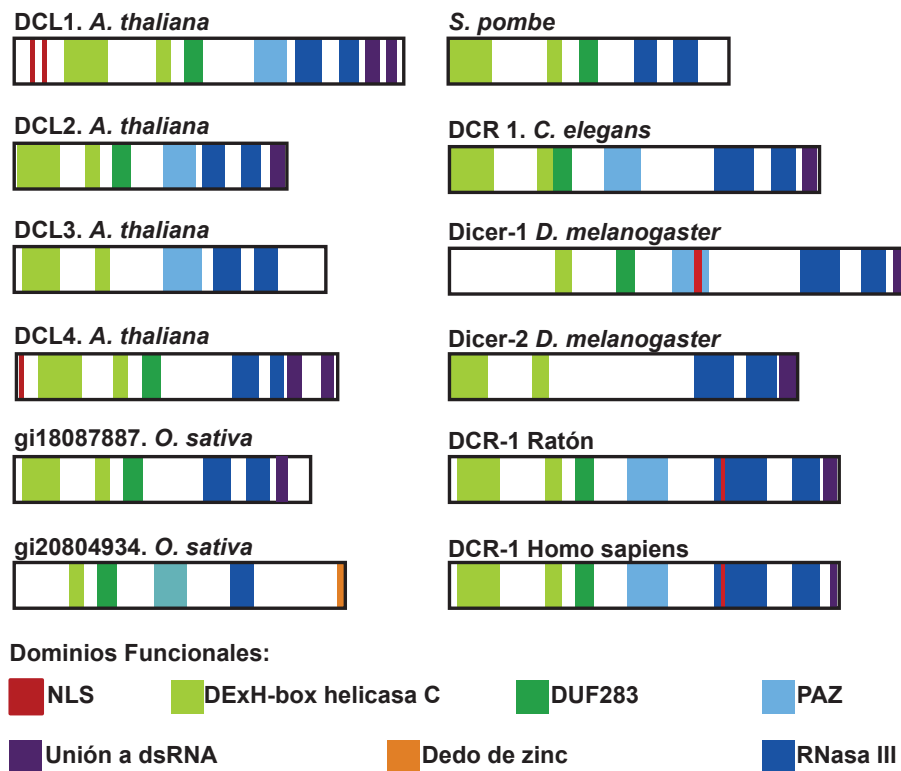
## DCL, RDR y AGO: Proteínas indispensables para la biogénesis y funcionamiento de sRNAs

Muchas son las proteínas requeridas para la biogénesis de sRNAs y en el ensamblaje de los complejos funcionales durante el silenciamiento genético mediado por sRNAs. Sin embargo, tres clases de proteínas se pueden considerar como componentes clave: Las proteínas Dicer like (DCL), las RNAs Polimerasas dependientes de RNA (RDR), importantes durante la biogénesis de sRNAs y las proteínas Argonautas (AGO), cuyo papel es indispensable para el silenciamiento.

### Proteínas Dicer-Like (DCL)

Las proteínas DCL en plantas, son proteínas nucleares que conforman una familia cuya diversificación se remonta a la emergencia de los musgos (*Physcomitrella patens*); procesan los transcritos primarios de miRNAs o transcritos largos complementarios de doble cadena (dsRNA) en duplex de RNA de 21 a 24 nt de longitud con dos nucleótidos sobresalientes en sus extremos 3' (Liu *et al.*, 2008; Bologna & Voinnet, 2014).

En plantas superiores, insectos, protozoarios y algunos hongos, Dicer o DCLs, conforman una pequeña familia génica, compuesta por dos, cuatro o cinco miembros (Figura 6). En relación a animales y hongos, la notable expansión de los miembros de la familia DCL en plantas monocotiledoneas y dicotiledoneas podría reflejar la mayor implementación del silenciamiento de RNA en la defensa antiviral. En *Arabidopsis thaliana* y uva (*Vitis vinifera*) se han identificado 4 genes correspondientes a DCL (DCL1-4) mientras que en arroz (*Oryza sativa*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) se han identificado 5 genes. Al igual que otras proteínas relacionadas con la biogénesis de sRNAs, las proteínas DCL parecen ser específicas para procesar un tipo particular de sRNA. Estudios de mutaciones múltiples y puntuales muestran que AtDCL2, AtDCL3 y AtDCL4 mantienen una relación jerárquica dada por las distintas afinidades que presentan para distintos dsRNA, la afinidad de una DCL por un sustrato de dsRNA parece depender del tamaño del dsRNA y la identidad del nucleótido 5' del duplex; AtDCL4 procesa dsRNA largos sin preferencia clara por el nucleótido del extremo 5'. Mientras que, AtDCL3 procesa preferencialmente dsRNA cortos con extremos 5' de adenina y uracilo (Liu *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010).

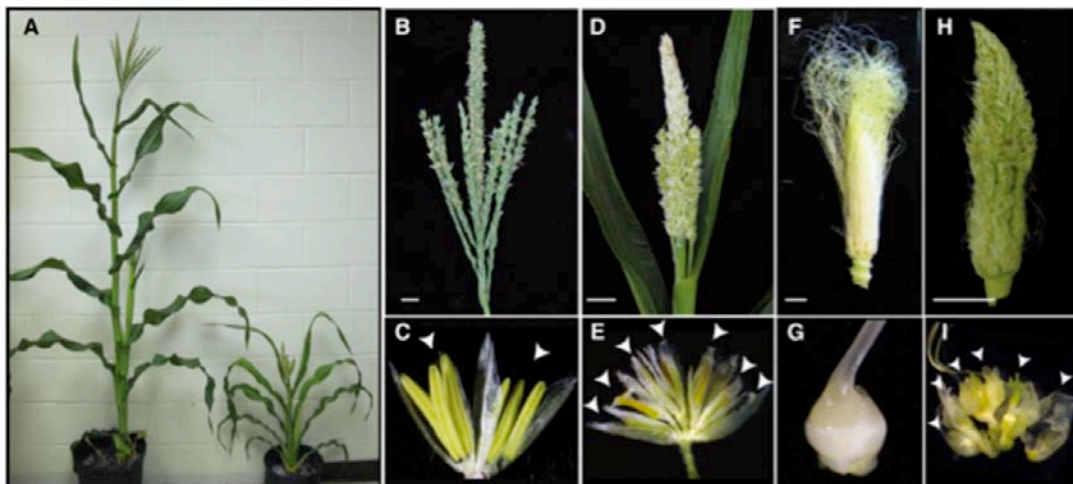


**Figura 6. Estructura proteica de algunos miembros de la familia Dicer.** Se muestran 6 miembros de la familia dicer like en plantas: *atDCL1-4* y dos genes en arroz. Adicionalmente, se muestran 6 miembros de la familia Dicer en especies diferentes a las plantas. Las estructuras de los dominios de las proteínas Dicer-like fueron predichos mediante *Pfam* y *Prosite*. (Modificado de Schauer *et al.*, 2002).

Las proteínas DCL presentan múltiples dominios. Contienen un dominio de helicasa (helicasa-C), PAZ, y DUF283 (domain of unknown function 283); dos dominios en tandem de RNasa III (a/b) y dos de unión a RNA de doble cadena (dsRBD). Mutaciones en el dominio helicasa de DCL1 de *Arabidopsis* (*AtDCL1*), mostraron que el dominio de helicasa es necesario para el procesamiento de algunos microRNAs primarios (pri-miRNAs) *in vivo* y que existe una dependencia de ATP *in vitro*. Por lo que el dominio helicasa parece tener funciones parecidas a las de una traslocasa dependiente de ATP, utilizando la energía del ATP para los múltiples cortes a lo largo de los dsRNA. Los dominios RNasa III contienen los residuos catalíticos (lisinas altamente conservadas), por lo que es el lugar donde ocurre el procesamiento para cortar los precursores de sRNAs. Las proteínas DCL adoptan estructuras tipo hacha (Hatchet-like), en la que el dominio PAZ es indispensable para el reconocimiento de los extremos 3' de los dsRNAs para su posterior procesamiento en duplex de sRNAs; Además, el dominio PAZ se encuentra conectado con el dominio catalítico (RNasa IIIa) a través de una  $\alpha$ -hélice, cuya longitud parece determinar el tamaño del duplex de sRNA. Por otro lado, mutaciones en el extremo C-terminal del segundo dominio dsRBD presente en *AtDCL1*,

señalan que el dominio promueve la localización de la proteína en el núcleo donde se congrega con otros factores de la biogénesis de miRNAs en cuerpos de procesamiento. Se ha propuesto que el dominio DUF283 se encuentra relacionado con la selección de la cadena de los duplex de siRNAs/miRNAs y con el reconocimiento de asimetrías en los duplex de RNA. (Liu *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Bologna & Voinnet, 2014).

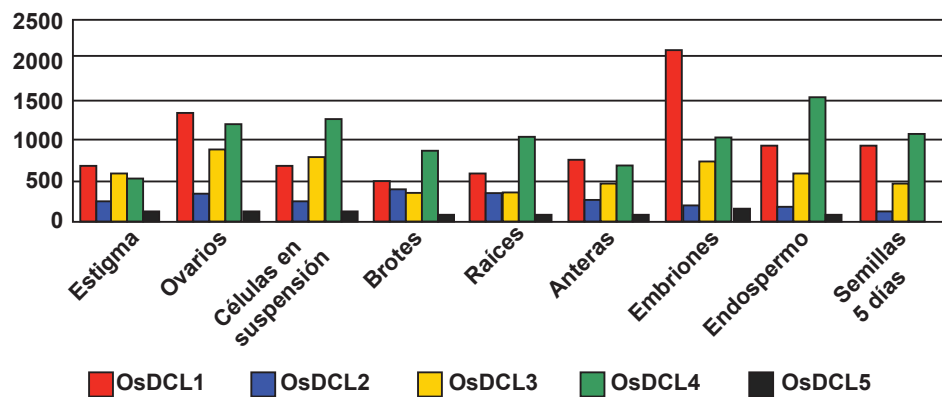
Análisis bioquímicos y genéticos muestran una gran especificidad y redundancia en las funciones de DCLs durante el metabolismo de sRNAs. En algunos casos como AtDCL1 y OsDCL1 generan fenotipos letales. Recientemente, mediante estudios de mutagénesis en maíz utilizando etil-metil-sulfonato se logró identificar una mutante nombrada “fuzzy tassel” (*fzt*). La mutante *fzt* presenta diversos defectos en tejidos vegetativos y reproductivos como: defectos en la homeostasis de células meristemáticas y determinación del sexo, exposición de los órganos florales con una apariencia confusa (de ahí el nombre de “fuzzy”; Figura 7), esterilidad, estatura reducida de las plantas y una disminución de ciertas poblaciones de miRNAs. Se encontró que las plantas con fenotipo *fzt* contenían una mutación puntual en el primer dominio RNasa IIIa de la supuesta DCL1 de maíz (ZmDCL1; GRMZM2G040762), por lo que se ha sugerido que el alelo *dcl1-fzt* resulta en la disminución del funcionamiento de ZmDCL1 y que dicho fenotipo es consecuencia de la disminución en los niveles de miRNAs (Song *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2014).



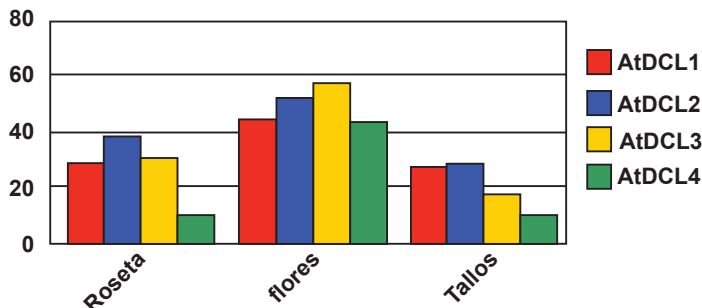
**Figura 7. Las mutantes *fzt* tienen severos defectos en tejidos vegetativos e inflorescencias.** **A)** Planta silvestre o WT (izquierda), las plantas mutantes *fzt* (derecha) son mucho más pequeñas que las WT. **B)** Panícula normal **C)** Panoja normal. Espigas contienen dos floretes. Las glumas fueron removidas para exponer los floretes. **D)** Panoja mutante *fzt*. Las espigas carecen de glumas reconocibles. **E)** La espiga *fzt* contiene floretes extra. Los floretes extra contienen estambres anormales que no arrojan polen y otras anomalías en los órganos florales. **F)** Mazorca normal **G)** Espigas disectadas de una mazorca normal, contienen un único florete. **H)** Mazorca *fzt* contiene pocos estigmas y bracteos anormales, presentan esterilidad. **I)** Las espigas de la mazorca *fzt* contienen floretes extra, órganos florales anormales y estambres no desarrollados. Las flechas blancas indican los floretes. Barras = 2 cm. (Tomado de Thompson *et al.*, 2014).

Otros estudios muestran que en general las DCLs se expresan de manera ubicua en todos los tejidos, pero de manera diferencial en las distintas etapas de desarrollo y en respuesta a estrés ambiental. En *Arabidopsis*, *AtDCLs* 1, 2, y 4 muestran patrones similares de expresión durante el desarrollo de las hojas y el tallo. Mientras que *AtDCL3* se encuentra altamente expresada en inflorescencias (Figura 8B). En arroz, *OsDCL1* mantiene un alta expresión en embriones, a diferencia de *OsDCL3* y *OsDCL5* cuya expresión se ve favorecida en suspensiones celulares, comparado con otros tejidos. Así mismo, *OsDCLs* 2, 4, y 5 se expresan más fuertemente en raíz, endospermo y embriones, respectivamente (Figura 8A). Además, la respuesta de la expresión de las DCLs a la sequía, frío y salinidad es diferente. Estos resultados sugieren que podrían tener mecanismos regulatorios especializados en respuesta a los diferentes tipos de estreses abióticos (Liu *et al.*, 2009).

### A) *O. sativa*



### B) *A. thaliana*



**Figura 8. Patrones de Expresión de DCLs.** Expresión DCLs en arroz (A) y *Arabidopsis* (B) en diferentes tejidos. El eje vertical indica los niveles de expresión, la intensidad de la señal fue calculada mediante GCOS 1.2.1 (arroz) y Affymetrix Microarray Suite 5.0 (*Arabidopsis*), respectivamente. (Modificado de Liu *et al.*, 2009).

## Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs o RdRps)

Estas enzimas se encuentran involucradas en la producción de RNAs de doble cadena (dsRNA) a partir de un molde de RNA, e inician la amplificación del mecanismo de silenciamiento mediado por siRNAs, ya que el dsRNA producido por una RDR será utilizado como sustrato por las proteínas DCL para producir siRNAs. Bajo condiciones fisiológicas, las RDR catalizan la formación de uniones fosfodiéster entre los ribonucleótidos en una manera dependiente a un molde de RNA. Se sabe que para llevar a cabo su actividad, es indispensable la presencia de iones divalentes que sirven como activadores para la enzima (Weiberg, 2014; Calo *et al.*, 2012, Kenneth, 2008).

En un principio, las RDRs fueron identificadas en virus de RNA, asociándolas a una gran variedad de procesos como la replicación del genoma viral, síntesis de mRNA y recombinación de RNA. Las RDRs resultan cruciales en la sobrevivencia de los virus no sólo por su relación con la replicación sino porque proveen al genoma viral de variabilidad, impactando en la rápida evolución de los virus (debido a la alta tasa de error de las RDRs virales; un error cada  $10^{-4}$  nt). Sin embargo, se han identificado RDRs en muchos organismos eucariontes. Una de las primeras RDRs caracterizadas en eucariontes fue en tomate, esta puede producir fragmentos de RNA de al menos 100 nt de longitud mediante un molde de RNA a partir del extremo 3' del molde. Homólogos del gen RDR de tomate fueron encontrados en *Arabidopsis* y otras plantas, así como en *C. elegans*, *N. crassa* y *S. pombe*. Interesantemente, las RDRs virales y las encontradas en eucariontes no parecen tener relaciones de homología y no se identificó un homólogo para la RDR de tomate en *Drosophila* ni en el genoma humano, sugiriendo la posibilidad de divergencia entre las RDRs virales y dentro de los mismos eucariontes. Posteriormente, se estableció una clasificación para las RDRs eucarióticas (tres clados; RDR $\alpha$ , RDR $\beta$  y RDR $\gamma$ ). Mientras que las RDR $\alpha$  han sido encontradas en tres clados (plantas, animales y hongos), RDR $\beta$  son encontradas en animales y hongos mientras que RDR $\gamma$  están presentes en plantas y hongos (Ahlquist, 2002; Bologna & Voinnet, 2014).

Las RDRs se caracterizan por un dominio conservado, el cual contiene un motivo catalítico en el extremo C-terminal (DLDGD), presente en la mayoría de las RDRs eucariontes y requerido para el copiado de un RNA de cadena sencilla (ssRNA) dando como resultado un dsRNA. En *Arabidopsis* se han caracterizado seis RDRs (AtRDR1-6) Los miembros del clado RDR $\alpha$  (AtRDRs 1, 2 y 6) parecen tener alguna relación indirecta en la defensa contra patógenos virales, mediante la producción de sRNAs. La pérdida de función AtRDRs 1, 2 y 6 aumenta la susceptibilidad de las plantas a la

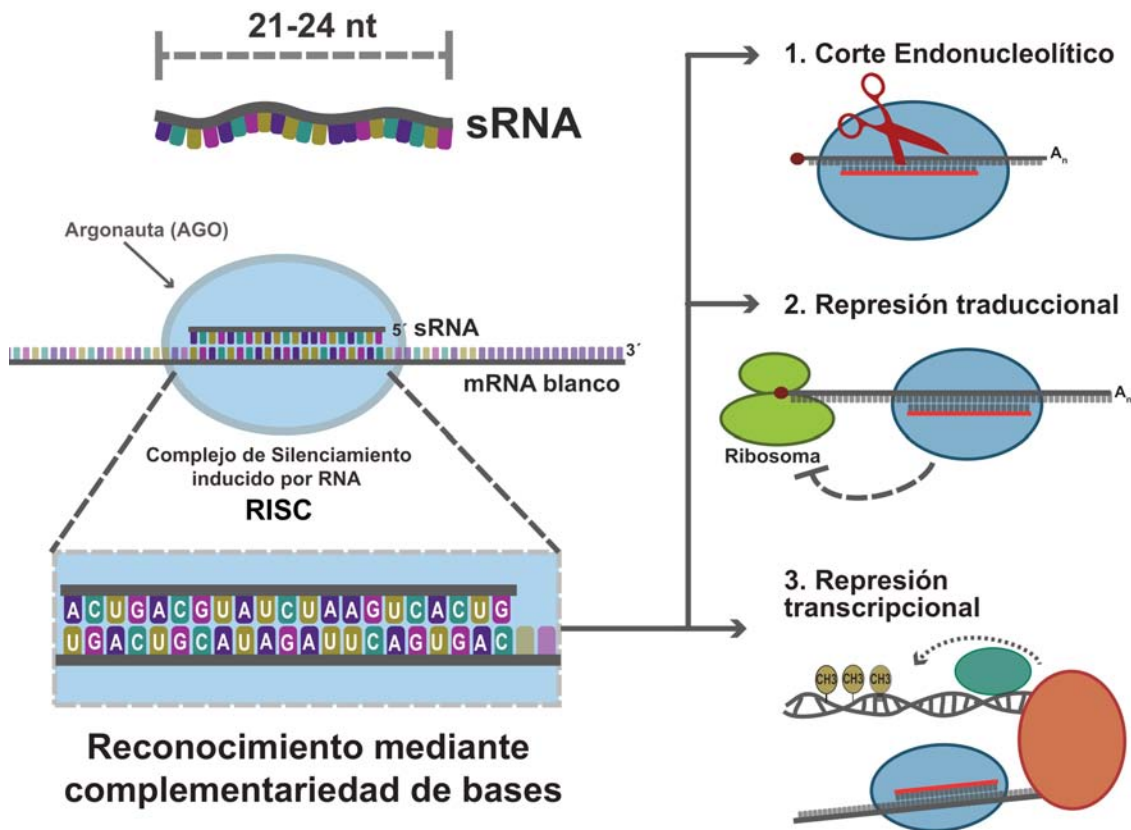


infección por virus de DNA o RNA. Mientras que los miembros del clado RDR $\gamma$  (AtRDRs 3, 4 y 5) tienen un motivo catalítico atípico (DFDGD) y no se les ha asignado ninguna función relacionada al silenciamiento por RNA. Sin embargo, las 6 *AtRDRs* muestran distintos patrones de expresión a lo largo del desarrollo y durante respuestas a estrés. Además, muestran diversificación funcional en las distintas vías de silenciamiento, manteniendo una relación con alguna proteína DCL. Por ejemplo, AtRDR6 se encuentra sobreexpresada en plantas que poseen una mutación en AtRDR2, sugiriendo que existe una relación complementaria entre estas dos enzimas y en su funcionamiento en vías específicas de biogénesis de sRNAs, en las que recientemente se ha visto que la participación de AtRDR2 o AtRDR6 en la misma vía de regulación por sRNAs, produciendo diferentes poblaciones de sRNAs y estableciendo mecanismos no canónicos de silenciamiento de sRNAs. En cuanto a su función y localización, AtRDR2 se ha relacionado con desarrollo de gametofitos femeninos y se ha localizado alrededor del nucleolo y en cuerpos de procesamiento junto con DCL3 y la proteína Argonauta 4. AtRDR6 se ha implicado al silenciamiento genético postranscripcional y se ha detectado en fosas citoplasmáticas denominadas “siRNA bodies”, que aparentemente se encuentran asociados a la membrana y enriquecidos en proteínas relacionadas a la biogénesis de ta-siRNAs. Mientras que la localización de RDR1 aun es desconocida (Bologna & Voinnet, 2014).

### **Argonautas (AGOs)**

Una vez que los precursores de sRNAs han sido procesados en duplex de sRNAs (21-24 nt de longitud), se unen invariablemente a una proteína argonauta (AGO). Las proteínas AGO son miembros de una familia conservada de proteínas encontradas en bacterias, arqueas, hongos, plantas y animales. El complejo RNA-proteína comúnmente denominado RISC (por sus siglas en inglés: RNA-Induced Silencing Complex); consiste en un sRNA de cadena sencilla y una proteína AGO. El sistema de silenciamiento genético por RNAs pequeños es un sistema en el cual el sRNA es guiado y requiere a AGO para la actividad enzimática; la proteína no tiene la secuencia específica necesaria para catalizar el silenciamiento de su RNA o DNA blanco, la especificidad de la secuencia se consigue mediante el sRNA del complejo RISC. Una vez que el complejo RISC es ensamblado, éste realiza la búsqueda de transcritos blancos, los cuales tienen una complementariedad de bases con el sRNA del complejo y al encontrar un transcrito blanco se lleva a cabo la actividad de silenciamiento por uno de tres mecanismos: 1) Escisión del mRNA blanco; 2) Represión traduccional (mecanismos conocidos como silenciamiento genético postranscripcional, PTGS); 3) Silenciamiento genético transcripcional (TGS) a través de la metilación del DNA (Figura 9). La función de

silenciamiento canónica de los miRNAs, *cis*-NAT-siRNAs y ta-siRNAs es a través de eventos a nivel postranscripcional (PTGS), como es la escisión del mRNA y/o su represión traduccional (sólo los miRNAs, han mostrado ser capaces de reprimir la traducción), mientras que los ra-siRNAs o hc-siRNAs funcionan principalmente a través del TGS, mediante un mecanismo exclusivo de plantas conocido como RdDM; RNA-directed DNA methylation (Saito *et al.*, 2010; Chen, 2009; Lee *et al.*, 2012).



**Figura 9. Mecanismos de silenciamiento genético por RNAs pequeños.** Los RNAs pequeños se encuentran unidos a una proteína argonauta, ensamblando un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Para regular la expresión genética, RISC puede (1) Realizar un corte endonucleolítico al mRNA blanco, (2) Reprimir la traducción del mRNA, o (3) Reprimir la transcripción del gen blanco a través de modificaciones en la cromatina, como la metilación del DNA mediante RdDM. (Modificado de Lee *et al.*, 2012)

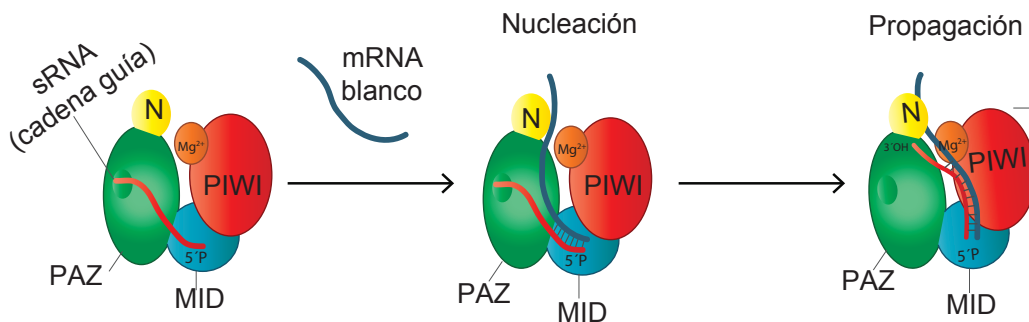
Las proteínas AGOs tienen cuatro dominios funcionales: El extremo amino terminal y los dominios PAZ, MID y PIWI. La primera estructura cristalográfica de una proteína AGO se obtuvo a partir de la archa extremófila *Pyrococcus furiosus* y reveló que PfAGO adopta una arquitectura bilobular, en la que un lóbulo contiene el extremo amino terminal y el dominio PAZ (N y PAZ), y el otro lóbulo está formado por el extremo carboxilo terminal y el dominio PIWI (MID y PIWI; Wang *et al.*, 2009).

En el complejo binario o RISC maduro, el sRNA interacciona con el dominio MID y lo hace mediante un desapareamiento del primer nucleótido del extremo 5' en el dúplex de sRNA generado por DCL. El dominio MID secuestra el grupo fosfato del extremo 5' de la cadena guía (el sRNA) y el dominio PAZ reconoce los 2 nucleótidos superpuestos del extremo 3' del sRNA. Durante el cargado del dúplex de sRNA en AGO, dos eventos importantes tienen lugar. En primer lugar, se requiere la selección de una AGO específica para una clase particular de sRNA. Después, la selección de la cadena del dúplex de sRNA que permanecerá asociada con AGO (la cadena guía) y la cadena que será removida (cadena pasajera). En los primeros estudios realizados para determinar como se seleccionaba la cadena guía, se estableció lo que se conoce como "Regla de asimetría", la cadena del dúplex de sRNA con el extremo 5' menos estable termodinámicamente será la que se elija como cadena guía. Sin embargo, estudios recientes mediante mutaciones en los nucleótidos del extremo 5' muestran que la identidad de los nucleótidos es importante para la elección de la cadena guía así como para la elección de una AGO en particular. Por ejemplo, en *A. thaliana*, el dominio MID de AtAGO1 se encuentra asociado a miRNAs que contienen 5' U pero también permite la unión de miRNAs con 5' C. Por otro lado, mediante inmunoprecipitaciones (IP) de los complejos formados por AtAGOs 4, 6 y 9 se encontró que las tres AtAGOs estudiadas se unen preferentemente a sRNAs con extremo 5' A. Recientemente, se ha propuesto que la función del dominio N-terminal se encuentra relacionada con la separación del dúplex de sRNA en el complejo binario (Wang *et al.*, 2009; Havecker *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2012).

La razón por la cual el dominio MID puede percibir qué tipo de sRNA puede cargarse en cada una de las AGOs se encontró mediante la cristalografía del dominio MID de la proteína humana hAGO2 y de AtAGO1, 2 y 5 de *A. thaliana* unidas a nucleósidos fosfatados. Dichos estudios revelaron que existe un asa rígida en el dominio MID: "Asa de especificidad de nucleótidos", la cual genera puentes de hidrógeno específicos dependiendo del mononucleótido que se use como sustrato. Esto sugiere que esta asa en los dominios MID es un elemento que según su conformación, puede ser utilizada para seleccionar qué nucleótido en el extremo 5' del sRNA puede ser permitido y cual puede ser discriminado (Frank *et al.*, 2012).

El complejo ternario se encuentra conformado por la unión de AGO, el sRNA y el mRNA blanco. Para su formación, AGO sufre cambios conformacionales permitiéndole unir el mRNA blanco, a este proceso se le conoce como nucleación, que inicia con la formación del apareamiento de bases entre la cadena guía y el mRNA blanco, a partir del extremo 5' - PO<sub>4</sub> de la cadena guía y, después AGO gira sobre su propio eje mientras que ambos

extremos del sRNA se mantienen en los sitios de unión de los dominios MID y PAZ (Figura 10). La propagación del apareamiento entre el sRNA y el mRNA blanco da como resultado la liberación del extremo 3' del sRNA del dominio PAZ, lo que permite la rotación del dominio y así favorece el posicionamiento del sitio de corte del mRNA blanco cerca de los residuos catalíticos del dominio PIWI. El dominio PIWI adopta una estructura similar a los miembros de la familia de endonucleasas RNasa H, las cuales usan DNA como templado para unir las moléculas blanco de RNA. Sin embargo, las proteínas AGO de plantas y animales han evolucionado para utilizar RNA de cadena sencilla como molde para unir los blancos de RNA. Además, las estructuras cristalográficas muestran que se necesitan dos cationes  $Mg^{2+}$  localizados en cada uno de los lados del sitio catalítico (Frank *et al.*, 2012; Bouasker *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).



**Figura 10. Funcionamiento del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC)** (Modificado de Bouasker *et al.*, 2009)

De las 10 proteínas AGO identificadas en *Arabidopsis*; AtAGO1, AtAGO2, AtAGO4, AtAGO6, AtAGO7, AtAGO9 y AtAGO10 han sido relacionadas funcionalmente con sRNAs. AtAGO1 se une a la gran mayoría de los miRNAs y ta-siRNAs, posee actividad de corte y media las funciones de estos RNAs pequeños *in vivo*. AtAGO1 y AtAGO10 se encuentran también implicadas en la represión traduccional de mRNAs blancos de miRNAs. AtAGO7 es la única que se asocia preferencialmente a un miRNA particular: miRNA 390, que conduce a la producción de ta-siRNAs. AtAGO4, AtAGO6 y AtAGO9 (denominado el grupo AGO4 en *Arabidopsis thaliana*) están relacionadas con modificaciones epigenéticas, en particular con el silenciamiento de transposones y secuencias repetidas mediante la vía RdDM. El grupo AGO4 se asocia preferencialmente con los hc-siRNAs (sRNAs de 24nt con un extremo 5' A). Aunque parecen tener funciones redundantes, mediante ensayos de complementación se demostró que AtAGO6 y AtAGO9 son incapaces de complementar el papel de AtAGO4

en la metilación del DNA, aun cuando estos genes se expresen bajo el promotor de AtAGO4. Aunado a esto, la expresión de los genes del grupo AGO4 es diferencial a lo largo de distintos tiempos de desarrollo y tejidos. Finalmente, mediante inmunoprecipitación de los complejos formados por el grupo AGO4 se observó que cada miembro del grupo se asocia preferencialmente a ciertos loci del genoma y AtAGO9 se ha visto involucrada en el proceso de gametogénesis femenina. Todas estas evidencias sugieren una especialización de los miembros del grupo AGO4 de *Arabidopsis thaliana* (Chen, 2009; Bonnet *et al.*, 2006; Pillot *et al.*, 2010; Havecker *et al.*, 2010).

### Especialización de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de sRNAs

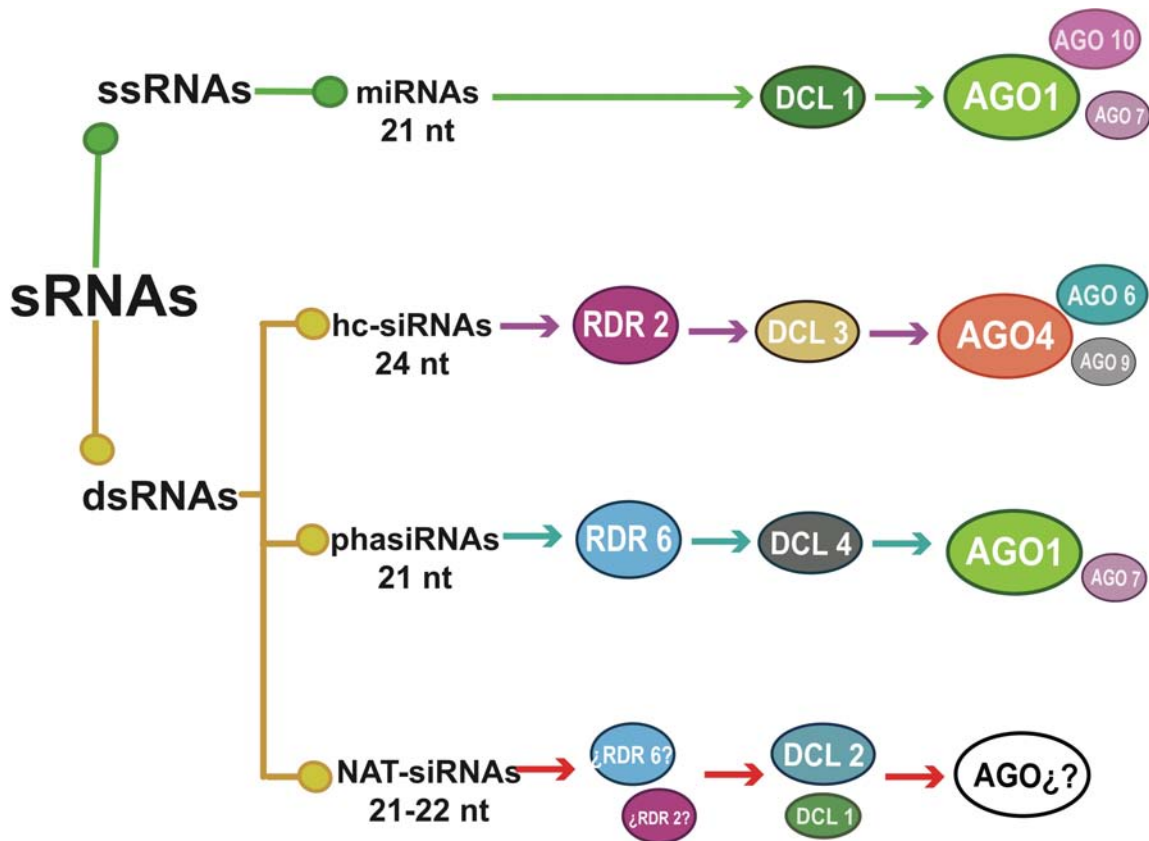


Figura 11. Las distintas clases de sRNAs se encuentran asociados a miembros específicos de las familias de proteínas DCL, RDR y AGO.

Al analizar las enzimas clave en las vías de biogénesis y funcionamiento de sRNAs, resulta evidente la especificidad de los miembros de una familia de proteínas para relacionarse con una vía en particular (Figura 11). Evidencias obtenidas principalmente a partir de *Arabidopsis thaliana* señalan que los miRNAs se han asociado a DCL1 en su procesamiento para producir miRNAs de 21-22 nt preferencialmente, que formarán el

RISC con AGO1/10. DCL3 produce los hc-siRNAs de 24 nt que se asocian con AGO4/6/9. Así mismo, RDR2 y RDR6 producen los dsRNAs que serán procesados por DCL3 y DCL1/4, respectivamente. Aun cuando se han realizado estudios para tratar de entender como funciona esta correlación entre DCL/AGO, RDR/DCL o bien RDR/DCL/AGO, poco es lo que se conoce con certeza.

## Vías de silenciamiento genético mediado por sRNAs

En plantas, las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs han sido caracterizadas en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, gracias al mejoramiento y la disminución de los costos en los métodos de secuenciación masiva, se han obtenido los genomas completos de diversas especies de plantas con gran valor económico y agronómico, esto ha permitido realizar estudios globales y sobre todo la identificación de los mecanismos de sRNAs en plantas, que canónicamente no son consideradas como modelos de estudio (arroz, trigo y maíz, por citar algunos ejemplos). Con esta información han surgido nuevos cuestionamientos al haber una gran diversificación y duplicación de los componentes clave caracterizados previamente en *Arabidopsis*.

A continuación, se describen los mecanismos principales de regulación basados en sRNAs presentes en *Arabidopsis thaliana*, basados en extensiva evidencia experimental, mencionando en algunos casos las evidencias de estas vías en otras especies de plantas.

### miRNAs

Los miRNAs derivan de precursores de RNA de cadena sencilla (ssRNA) formando estructuras secundarias y se originan a partir de los genes *MIR*. La mayoría de los miRNA maduros tiene 21 nt de longitud, sin embargo existen casos reportados de miRNAs de 22 y 24 nt. Los genes *MIR*, son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II). El transcrito inicial de miRNA es comúnmente llamado miRNA primario (pri-miRNA). Pol II genera pri-miRNAs como un transcrito normal maduro (con su extremo 5'cap y 3' poliadenilado; Sun, 2012; Fei *et al.*, 2013; Bonnet *et al.*, 2006).

Después de que el pri-miRNA es transcrito, una proteína de unión a RNA llamada DAWDLE (DDL) se une al pri-miRNA, probablemente para estabilizar el transcrito y protegerlo de la degradación. Posteriormente, la enzima Dicer like 1 (DCL1) corta los

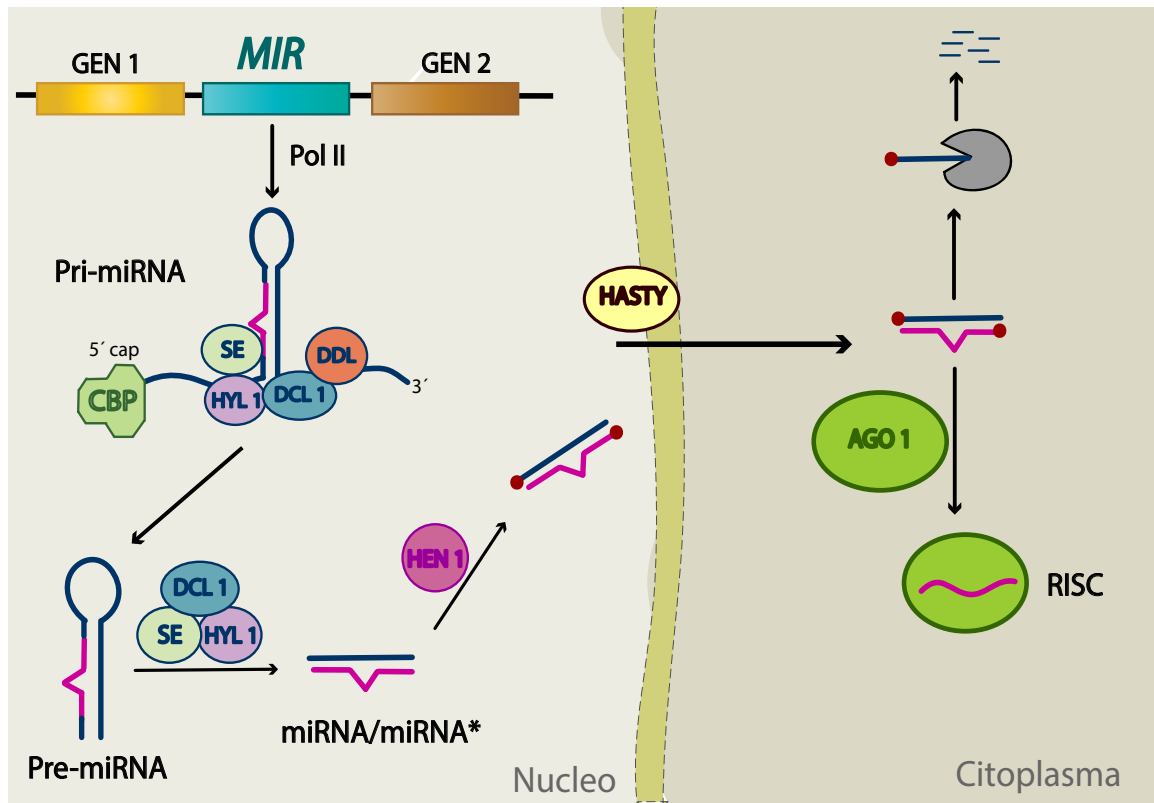
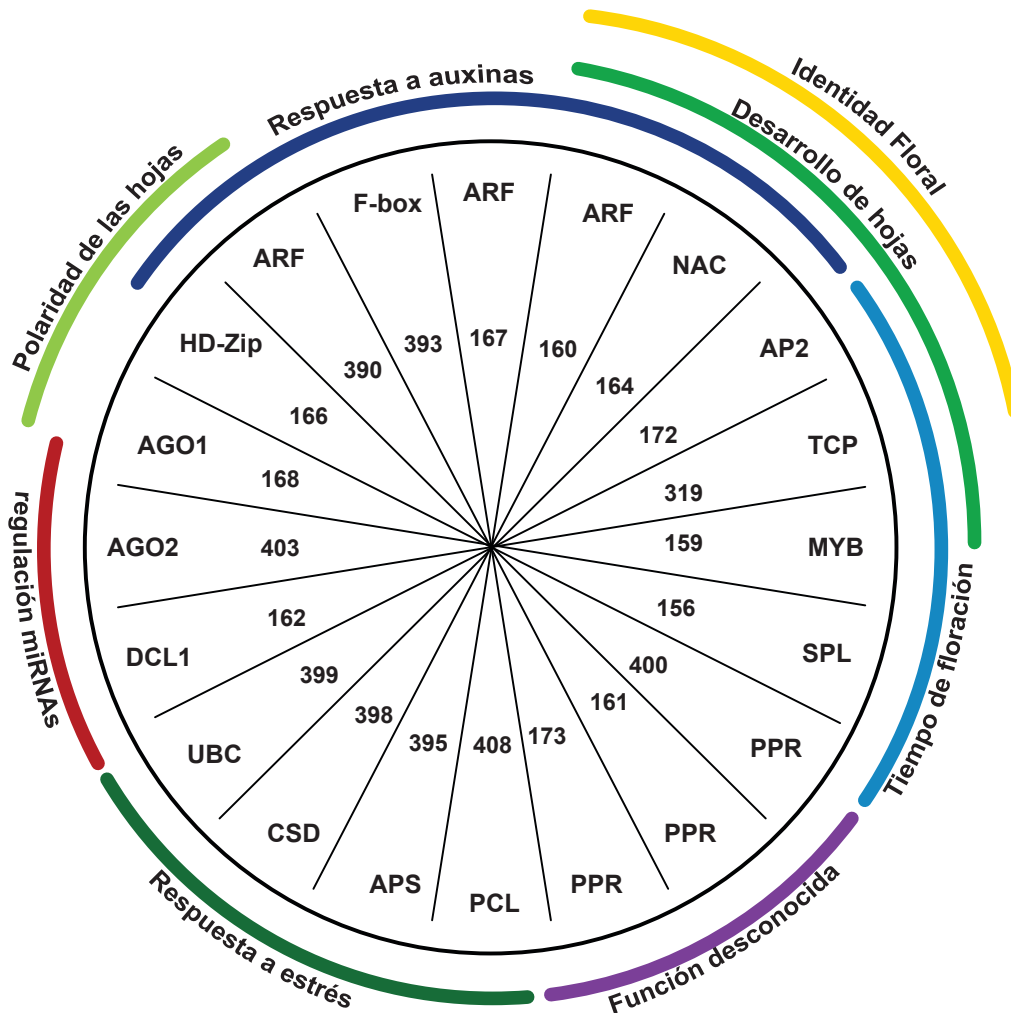


Figura 12. Biogénesis de microRNAs (miRNAs). (Modificado de Chen, 2009).

extremos mal apareados del pri-miRNA para generar un pre-miRNA con una estructura secundaria de tallo-asa. En este proceso, son necesarias interacciones físicas entre varias enzimas, incluyendo la proteína de unión a RNA de doble cadena HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1); SERRATE (SE), una proteína con estructura de dedo de zinc; el complejo de unión a cap (CBC) y una enzima DCL (Figura 12). Los dos pasos de procesamiento en la biogénesis de miRNAs son realizados en su mayoría por DCL1. Una vez que se ha procesado el pri-miRNA, el pre-miRNA es cortado por DCL1 en dúplex de miRNA/miRNA\*; estos dúplex tienen dos nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' de cada cadena y pueden ser fácilmente degradados por una exonucleasa llamada SDN (por sus siglas en inglés: Small RNA Degrading Nuclease). Para estabilizar el dúplex, una metiltransferasa de RNA llamada HEN1 (por sus siglas en inglés: Hua Enhancer1) metila inmediatamente los nucleótidos terminales 3' de cada cadena del dúplex para prevenir su posterior degradación. Después, el dúplex de miRNA/miRNA\* es transportado del núcleo al citoplasma por una proteína llamada HASTY. En el citoplasma, el dúplex de miRNA/miRNA\* se asocia con AGO1/10 donde sólo una de las cadenas (cadena guía) conformará el RISC, mientras que la cadena complementaria (comúnmente llamada miRNA\*) es degradada por un mecanismo aún desconocido. Una vez conformado el RISC, los miRNAs pueden reprimir la expresión

de genes endógenos mediante los mecanismos antes mencionados (escisión o represión traduccional del mRNA blanco; Sun, 2012; ; Mateos, 2011; Bonnet, 2006; Czech & Hannon, 2010; Liu & Paroo, 2010).

En plantas, se cree que el mecanismo predominante es la escisión o corte del mRNA blanco. Los miRNAs se han asociado a la regulación genética de múltiples factores transcripcionales que regulan a su vez genes importantes para el correcto desarrollo de la planta (tiempo de floración, polaridad de las hojas, desarrollo de las hojas), respuestas a estrés; así como a la regulación de genes relacionados con la respuesta a hormonas (específicamente auxinas) e interesantemente regulan los mRNAs de algunas de las enzimas involucradas en su biogénesis (DCL1 y AGO1; Figura 13; Mallory & Vaucheret, 2006).



**Figura 13. Procesos regulados por miRNAs.** En este diagrama, los miRNAs (al centro del círculo) se encuentran agrupados por los mRNAs blanco que regulan (en los bordes del círculo) y su función (líneas de colores) en programas de desarrollo, respuestas adaptativas al estrés y la regulación de la vía de miRNAs por si misma. (Modificado de Mallory & Vaucheret, 2006).



Hasta Noviembre del 2013, la base de datos miRBase contenía 6000 genes MIR anotados, provenientes de más de 70 especies de plantas. Hay familias de miRNAs altamente conservadas a lo largo de diferentes especies, mientras que algunos miRNAs resultan específicos de un sólo clado o incluso especie, lo que hace evidente la importancia y diversificación del PTGS mediado por miRNAs (Arikiti *et al.*, 2014).

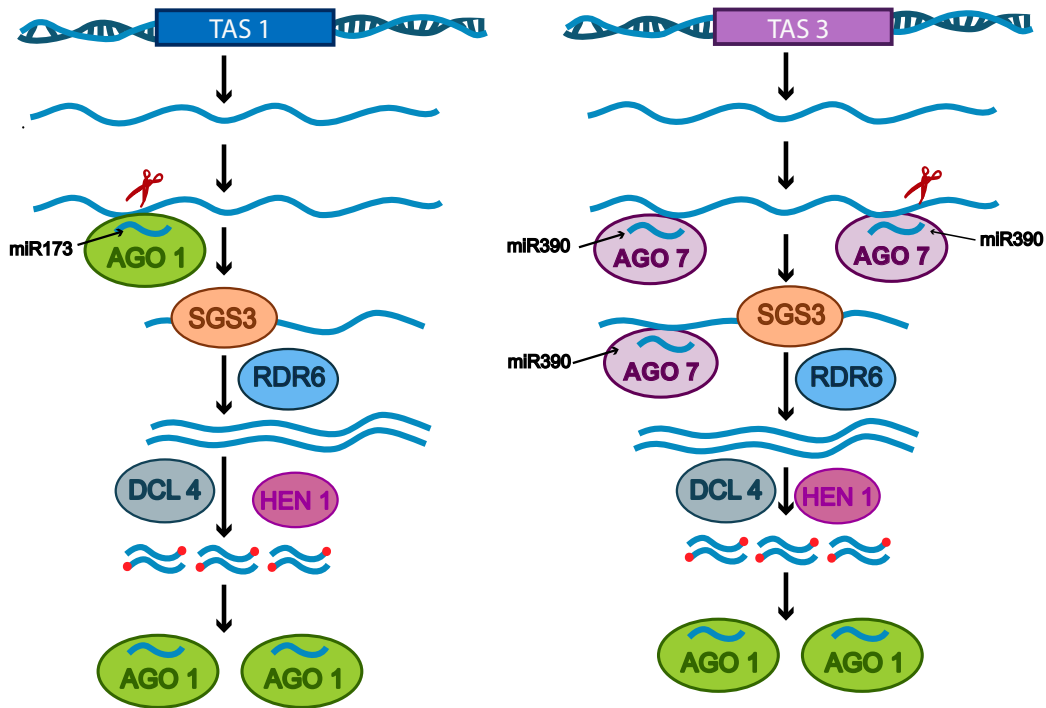
### PhasiRNAs y tasiRNAs

Los phasiRNAs derivan de un mRNA transcrito a dsRNA por RDR6 y procesado por DCL4 generando productos de cortes progresivos cada 21 nt en el dsRNA, dando como resultado arreglos espaciados perfectos de sRNAs (sRNAs en fase). Aunque en casos excepcionales los phasiRNAs pueden ser procesados por DCL5 (anteriormente llamada DCL3b) generando sRNAs de 24 nt de longitud en tejidos reproductivos de algunos pastos (Fei *et al.*, 2013; Arikiti *et al.*, 2014).

Los phasiRNAs son normalmente ejemplificados por la categoría de ta-siRNAs encontrados en *Arabidopsis*. En esta vía, un miRNA complementario a un transcrito maduro (con cap y poliadenilado) proveniente de genes llamados *TAS*, provoca el corte del mismo. Los fragmentos cortados (5' o 3') son unidos a proteínas llamadas SGS3 (por sus siglas en inglés: Suppressor of Gene Silencing 3), para protegerlos de ser degradados. Después, RDR6 genera a partir de los fragmentos un dsRNA, que será cortado en siRNAs de 21 nucleótidos por DCL4 y metilados en su extremo 3' por HEN1. Sin embargo, el nombre de tasiRNAs (*trans-acting siRNAs*) para algunos phasiRNAs deriva de su habilidad de funcionar en cierta medida como miRNAs, manteniendo una relación de dependencia con esta clase de sRNAs. El término “en fase” (phased) indica que los sRNAs son generados en un arreglo secuencial, comenzando a partir de un nucleótido específico, resultado de la escisión inicial de un miRISC (RISC conformado por un miRNA), seguido de los cortes realizados por DCL4. Es decir, “phasiRNAs” se refiere a loci identificados con patrones en fase (*PHAS loci*), mientras que en los “tasiRNAs” se ha demostrado que actúan en trans. Adicionalmente, el nombre de “*TAS*” se asocia solamente a los transcritos no codificantes que no tienen otra función más que producir siRNAs secundarios. (Bonnet *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013; Howell *et al.*, 2014)

Existen dos mecanismos para generar tasiRNAs de 21 nt conocidos como la vía de “un hit” y “dos hits”. En el mecanismo de “un hit”, un único miRNA generalmente de 22 nt dirige el corte de un mRNA blanco, ocasionando la producción de phasiRNAs en el fragmento 3' al sitio de corte (o río abajo del sitio blanco; Figura 14, izquierda). En el modelo de “dos hits”, se requiere el reconocimiento de un mRNA por un par de miRNAs de 21 nt, ocurriendo un corte solamente en el extremo 3' del sitio blanco, ocasionando

la producción de ta-siRNAs en el fragmento 5' (o río arriba del sitio blanco; ver Figura 14, derecha; Axtel *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013; Voinnet, 2009).



**Figura 14.** Biogénesis de ta-siRNAs. (Modificado de Chen, 2009).

En *Arabidopsis* se han identificado cuatro familias de genes *TAS1-4*, que comprenden loci distintos. La familia *TAS1a/b/c* y *TAS2* son blancos de miR173, mientras que la familia *TAS3a/b/c* y *TAS4* son blancos de miR390 y miR828, respectivamente. *TAS3*, es único por muchas razones: 1) Es el único locus bien descrito que genera tasiRNAs mediante el mecanismo de “dos hits” 2) miR390, es el único miRNA reportado que forma el RISC con AGO7 (Figura 14, derecha). Además, un conjunto de tasiRNAs generados a partir de *TAS3a* se encuentran relacionados con la regulación de respuesta a auxinas (llamados tasi-ARFs). Los tasi-ARFs determinan cambios en la fase vegetativa y el desarrollo de la raíz. Esto ocurre mediante la alteración de los transcritos de factores de respuesta a auxinas (ARFs) y por la formación de gradientes de concentración de tasi-ARFs del lado adaxial al abaxial de las hojas, lo que sugiere que podría existir movimiento intercelular de esta clase de sRNAs (Fei *et al.*, 2013).

Hasta hoy, el número identificado de loci *PHAS* varía enormemente entre especies (cerca de 800 en *Oryza rufipogon*, 30 en *Arabidopsis t.*, 114 y 127 en *Medicago truncatula* y *Glycine max*; respectivamente). Adicionalmente se han encontrado nuevos genes *TAS* en otras especies, relacionados en su mayoría a respuesta a auxinas o patógenos (Arikait *et al.*, 2014).

## NAT-siRNAs

Los NAT-siRNA están menos caracterizados, fueron reportados por primera vez en 2005, en estudios de tolerancia al estrés en *Arabidopsis*, al detectar transcritos antisentido, algunos de los cuales correspondían a genes relacionados con regulación ante el estrés (Borsani, 2005).

A diferencia de las otras clases de siRNAs, donde una proteína RDR toma el papel central para la generación de dsRNAs, se ha propuesto que los NAT-siRNAs requieren la hibridación de transcritos independientes que resultan ser complementarios. Los transcritos independientes pueden ser complementarios porque fueron transcritos a partir de las cadenas opuestas de un mismo locus (*cis*-NAT-siRNAs; Figura 15). Alternativamente, los RNAs hibridados pueden provenir de loci diferentes (*trans*-NAT-siRNAs). Sin embargo, sólo los *cis*-NAT-siRNAs han sido identificados en plantas, mientras que los *trans*-NAT-siRNAs continúan siendo sólo una hipótesis. Por otro lado, se ha observado el requerimiento de una o múltiples RDRs para su biogénesis, sugiriendo que estas RDRs podrían amplificar la producción inicial de siRNAs consecuencia de la hibridación de los NAT RNAs o bien, que el precursor de dsRNA realmente no deriva de la hibridación de dos transcritos complementarios (Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014).

El mecanismo general para la biogénesis de *cis*-NAT-siRNAs consiste en la generación del par de transcritos *Cis*-NAT (uno de ellos producido bajo condiciones de estrés); posteriormente, se da la hibridación de transcritos *Cis*-NAT preferentemente en sus extremos 3'. Una vez generado el apareamiento de los transcritos, RDR2/6 generan un dsRNA amplificado en los sitios no apareados para finalmente ser procesados en sRNAs de distintas longitudes por DCL1/2/3 y finalmente, los duplex de sRNAs generados se metilan en sus extremos 3' por HEN1 (Figura 15; Borsani, 2005; Liu *et al.*, 2014; Le Trionnaire & Twell, 2010).

Los pares de genes *Cis*-NAT se encuentran distribuidos en todo el genoma de *Arabidopsis*, se ha estimado que este fenómeno puede ocurrir en alrededor del 9% de sus genes, sobre todo por el solapamiento de los extremos 3' de pares codificantes o no codificantes. En los pocos casos estudiados, un transcrito del par *cis*-NAT mantiene una expresión constitutiva, mientras que el otro es inducido mediante estrés o distintas etapas del desarrollo. Sin embargo, en estudios globales; sólo el 6% y 16% de los pares *cis*-NAT de *Arabidopsis* y arroz se encuentran asociados con cantidades apreciables de acumulación de sRNAs. Aunado a esto, las vías de biogénesis responsables de la producción de *cis*-NAT-siRNAs son extremadamente heterogéneas y requiere de juegos

diferentes de RDRs, DCLs y otros factores de transcripción. Por lo que esta heterogeneidad ha abierto la discusión sobre si esta clasificación describe a una población de sRNAs en concreto (Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014).

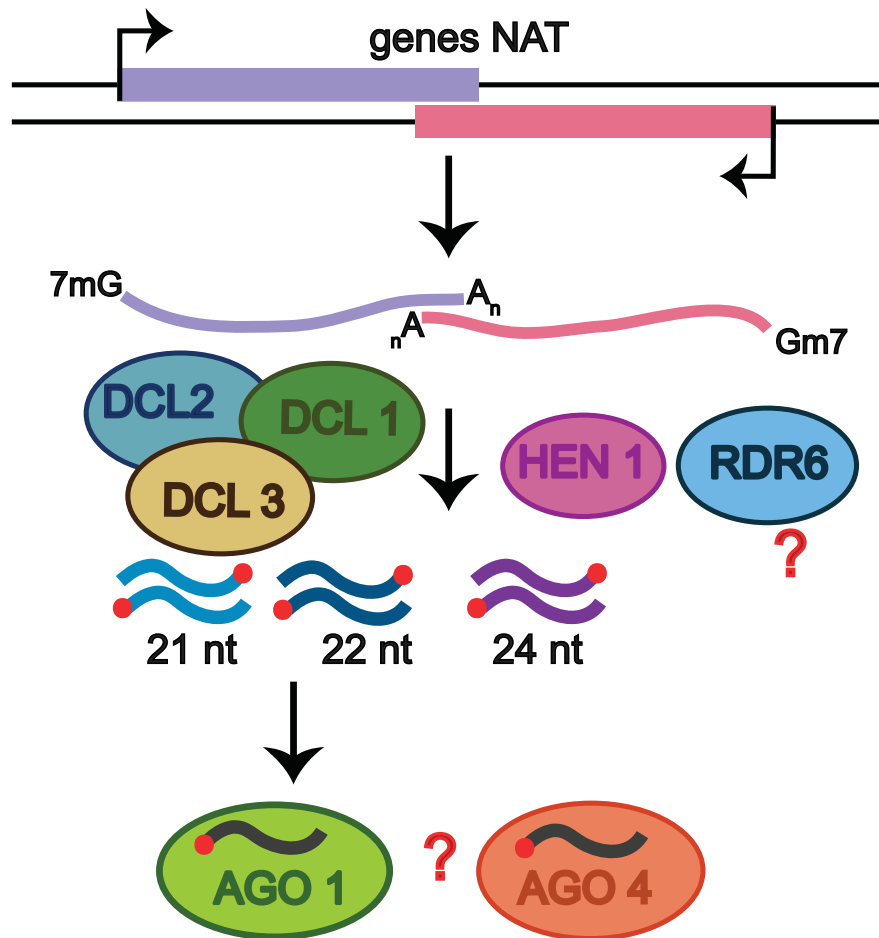


Figura 15. Biogénesis de *cis*-NAT siRNAs. (Modificado de Bologna & Voinnet, 2014).

### hc-siRNAs: La vía de Metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM)

En plantas, hongos y metazoarios se han identificado sRNAs con mecanismos de regulación transcripcional mediante modificaciones epigenéticas. Los sRNAs epigenéticamente activos se clasifican en dos grupos: siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs) y RNAs asociados a PIWI (piRNAs). Sin embargo, los piRNAs no han sido identificados en plantas ni en hongos. En plantas, la mayor vía de regulación epigenética mediada por sRNAs es la metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM; por sus siglas en inglés: RNA-directed DNA methylation; Matzke & Mosher, 2014).

La metilación del DNA es realizada mediante metiltransferasas de DNA. En plantas, la metilación de citosinas puede ocurrir en tres contextos diferentes: 1) Metilación simétrica

GC; 2) Metilación simétrica CHG y 3) Metilación asimétrica CHH (donde “H” puede ser cualquier base, excepto “G”). Los dos tipos de metilación simétrica pueden ser mantenidas mediante el copiado de la información de la hebra parental después de una ronda de replicación del DNA. En contraste, para la metilación asimétrica o CHH, es necesario transferir la marcas *de novo* después de cada ronda de replicación (Böhmdorfer *et al.*, 2014).

La metilación en contexto CG y CHG se mantiene mediante la DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1, también conocida como DMT1) y la CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3), respectivamente. Mientras que la metilación *de novo* o CHH, es catalizada por DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2), mediante la vía RdDM. En *Arabidopsis thaliana*, los niveles de metilación globales observados son de aproximadamente 24, 6.7 y 1.7% para los contextos CG, CHG y CHH, respectivamente. A diferencia de mamíferos, la metilación en plantas ocurre predominantemente en transposones y elementos repetidos de DNA (Law & Jacobsen, 2010).

Los elementos transponibles (transposones) representan entidades genéticas ancestrales, capaces de incrementar su número de copias en un genoma. A diferencia de los virus, los transposones se transmiten verticalmente (de padres a su descendencia). En especies con reproducción sexual, los transposones tienden a ser numerosos y extremadamente diversos; existen múltiples familias con diferentes estructuras y mecanismos de transposición. Compartiendo el hecho de que todos los transposones tienden a tener un alto número de copias relativo a genes convencionales. Dado que los transposones puede movilizarse a través del genoma, pueden causar daños potenciales como interrumpir secuencias de genes codificantes, alterar redes de regulación genética, causar ruptura de cromosomas y rearrreglos cromosómicos. Por estas razones, en todas las células existen mecanismos para contrarrestar o disminuir los eventos de transposición, como la metilación del DNA y modificaciones en las histonas. Parte de esta regulación en plantas, recae en la vía RdDM (Kim & Zilberman, 2014; Malone & Hannon, 2009).

## **RNA Polimerasas en plantas.**

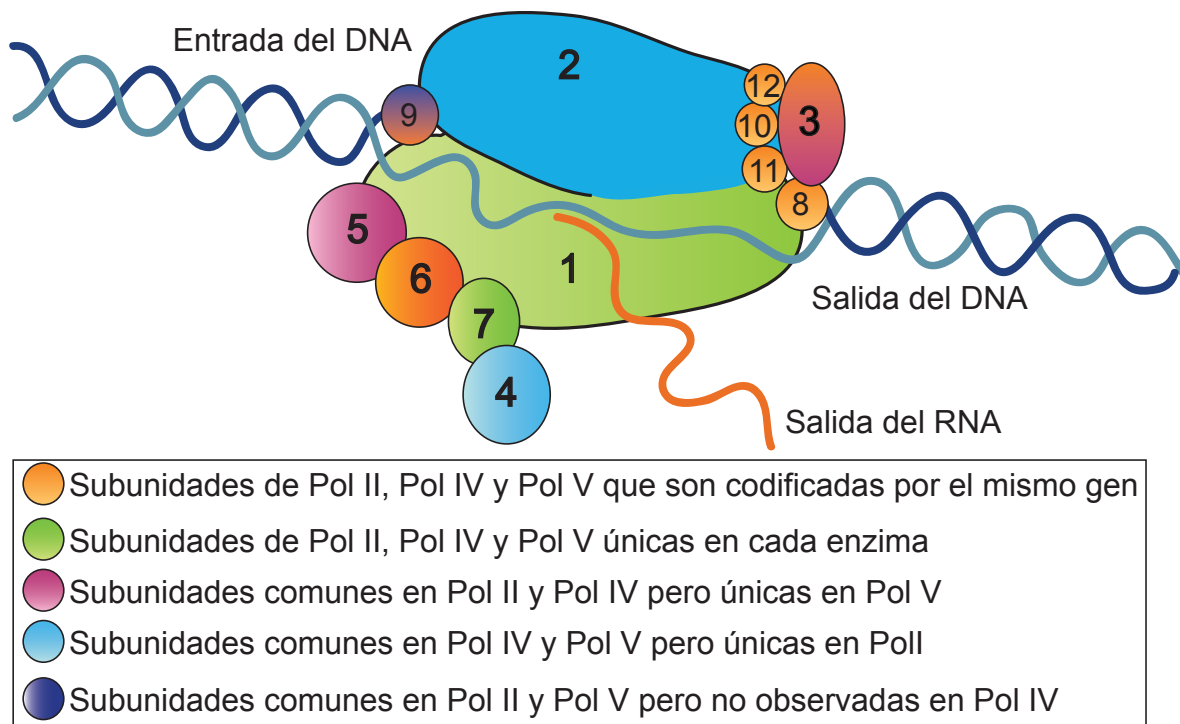
A diferencia de las bacterias o arqueas, cuyos genomas codifican para sólo una RNA polimerasa, los organismos eucariontes necesitan tres RNAs polimerasas, las cuales son esenciales para transcribir su genoma nuclear. La RNA polimerasa I (Pol I o NRPA,

por sus siglas en inglés “Nuclear RNA Polymerase A) transcribe cientos de copias de genes idénticos, cuyos transcritos son procesados en RNAs ribosomales que forman parte del ribosoma ensamblado: 18S, 5.8S y 28S (25S en levadura). La RNA polimerasa II (Pol II o NRPB) transcribe miles de genes que codifican para proteínas y RNAs no codificantes. Mientras que la RNA polimerasa III (Pol III o NRPC) transcribe muchas clases de RNAs de pequeña longitud (menos de 500 nt), como 5S, RNAs de transferencia (tRNAs) y elementos nucleares dispersos cortos (SINEs, por sus siglas en inglés “short interspersed nuclear elements”). Las RNAs polimerasas son complejos proteicos compuestos de múltiples subunidades. Pol I, II y III están conformadas por 12-17 subunidades diferentes. La subunidad mayor y la segunda subunidad mayor interactúan para formar los canales de entrada del DNA y de salida de RNA, además de formar el centro catalítico para la síntesis de RNA. Las subunidades que componen las RNAs polimerasas se nombran utilizando una numeración; por ejemplo, la subunidad mayor y la segunda subunidad mayor se identifican con los números 1 y 2, respectivamente. Por lo que NRPB1, hace referencia a la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Haag & Pikaard, 2011; Pikaard, 2008).

En el año 2000, al analizar el recién secuenciado genoma de *Arabidopsis* como parte del proyecto “The Arabidopsis Genome Initiative”, se encontraron dos genes que codificaban para una cuarta clase de subunidad 1 y dos para un tipo diferente de subunidad 2. Nombrados como NRPD1 y NRPD2 (Subunidad mayor y segunda subunidad mayor de RNA Polimerasa IV); NRPE1 y NRPE2 (Subunidad mayor y segunda subunidad mayor de RNA Polimerasa V). Cinco años más tarde, mediante análisis rigurosos de genética clásica y reversa fueron descritas sus funciones nucleares no indispensables para la viabilidad celular, pero requeridas para el silenciamiento mediado por RNA y la formación de heterocromatina (Haag & Pikaard, 2011; Pikaard, 2008).

Con base en análisis filogenéticos de las subunidades mayores de las RNAs polimerasas, se ha propuesto que NRPD1 surgió mediante un primer evento de duplicación del gen de *NRPB1*, mientras que NRPE1 surgió posteriormente a través de la duplicación del gen de *NRPD1*. Al analizar la composición de las subunidades de cada una se encontró que Pol IV y Pol V en *Arabidopsis* difieren de Pol II en cuatro y cinco subunidades; respectivamente (Figura 16), las otras subunidades de Pol IV y Pol V son codificadas por genes parálogos de las subunidades de Pol II, por lo que se presume que Pol IV y Pol V evolucionaron como formas especializadas de Pol II. En maíz, Pol IV y Pol V difieren de Pol II en seis subunidades, sin embargo entre ellas sólo son diferentes sus subunidades mayores 1 y 2. Al igual que *Arabidopsis*, el genoma de

maíz codifica un gen para NRPD1 y NRPE1. Interesantemente, se encontraron tres genes putativos para NRP (D/E)2 (designados con los subíndices a, b y c). Estudios recientes muestran que NRP(D/E)2<sub>a</sub> son las segundas subunidades de Pol IV y Pol V preferidas para formar los complejos funcionales en maíz; sin embargo Pol IV puede formarse utilizando NRPD2<sub>b</sub> y Pol V puede utilizar alternativamente NRPE2<sub>b</sub> y NRPE2<sub>c</sub>, proponiendo la idea de que el ensamblaje de un complejo en particular utilizando segundas subunidades mayores alternativas, constituyen diferentes subtipos de polimerasas, que pueden estar enriquecidas en diferentes tipos celulares, tejidos y órganos, lo cual es consistente con la observación de que NRPE2<sub>c</sub> se encuentra altamente expresada sólo en polen y panículas. Además, los subtipos de NRPD/E2 encontrados en maíz muestran que Pol IV y Pol V han continuado evolucionando en diferentes linajes de plantas (Haag & Pikaard, 2011; Haag *et al.*, 2014).



**Figura 16. Composición de Pol II, Pol IV y Pol V en *Arabidopsis thaliana*.** La caricatura representa las posiciones relativas de las subunidades de una RNA polimerasa, basadas en la Pol II de levadura y las relaciones entre Pol II, Pol IV y Pol V de *Arabidopsis thaliana*. Las subunidades se identifican con números y con el código de color indicado. Las subunidades 3 y 9 se muestran en dos colores para representar sus formas alternativas (Modificado de Pikaard, 2011).

## Biogénesis de hc-siRNAs mediada por NRPD

En plantas, Pol IV (NRPD) es la responsable de la producción hc-siRNAs. Pol IV, transcribe regiones heterocromáticas y produce transcritos que servirán para la producción de hc-siRNAs. La forma en la que Pol IV es reclutada a sus secuencias blanco no es completamente entendida; sin embargo, existe evidencia de que NRPD

interactúa con “SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1 (SHH1). La proteína SHH1, se une a las marcas H3K9me (metilación de la lisina 9 de la histona 3) y a la lisina 4 no metilada de la histona 3 (H3K4) mediante su dominio de plegamiento “Tudor-like”. La capacidad de SHH1 de unirse a marcas epigenéticas específicas y su interacción con Pol IV hace presumir que SHH1 puede reclutar a Pol IV a regiones específicas en el genoma. Una vez que se ha generado el transcrito, RDR2 se asocia físicamente con Pol IV y procesa el transcrito en un dsRNA. En alguno de estos puntos es necesaria la participación de una proteína remodeladora de la cromatina “CLASSY 1” (CLSY1, también conocida como CHR38), para facilitar el movimiento de Pol IV a lo largo del locus. El dsRNA es procesado en siRNAs de 24 nt por DCL3 y los extremos 3' de los hc-siRNAs son metilados por HEN1. Los hcRNA producidos se unen a AGO4, AGO6 o AGO9 (expresada específicamente en tejidos reproductivos; Figura 17). En conjunto, Pol IV, RDR2, DCL3 y HEN1, son enzimas cruciales para la biogénesis y estabilidad de los hc-siRNAs, brindándole a AGO4 la dirección mediada por sRNAs para buscar los sitios blancos a lo largo del genoma. En ausencia de hc-siRNAs compatibles, AGO4 es inestable; como se ha observado en plantas mutantes de Pol IV (*nrdp1*), *rdr2* y *dcl3*; donde los niveles de expresión de AGO4 se encuentran sustancialmente reducidos (Haag & Pikaard, 2011; Chen, 2009; Matzke & Moshier, 2014; Katiyar-Agarwal & Jin, 2014).

### **Metilación de novo mediada por NRPE**

Una vez que los hc-siRNAs se han asociado con AGO4/6/9, el RISC reconoce RNAs largos no codificantes (lncRNAs) producidos por Pol V. Al igual que Pol IV, las señales necesarias en la cromatina para reclutar a Pol V en las secuencias blanco aun no son completamente conocidas y ninguna secuencia consenso de DNA ha sido identificada. Sin embargo, experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación (ChIP-seq), muestran que Pol V se localiza preferencialmente en regiones altamente repetidas y de transposones; asociadas a hcRNAs de 24 nt y metilación de DNA. El reclutamiento de Pol V a algunos de sus sitios blancos es facilitado por miembros de una familia de metiltransferasas de histonas, SU(VAR)3-9. SUVH2, SUVH9 se unen a DNA metilado a través de su dominio SRA (“SET and RING-associated domain), contribuyendo a conformar una plataforma para la interacción de Pol V con la cromatina que contiene metilación preexistente. Así mismo, la transcripción y asociación de Pol V con la cromatina es facilitada por el complejo DDR, el cual comprende a la proteína remodeladora de la cromatina “DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION” (DRD1); la proteína estructural y de mantenimiento de cromosomas “DEFECTIVE IN



MERISTEM SILENCING 3” (DMS3) y “RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1” (RDM1; Figura 17; Matzke & Mosher, 2014).

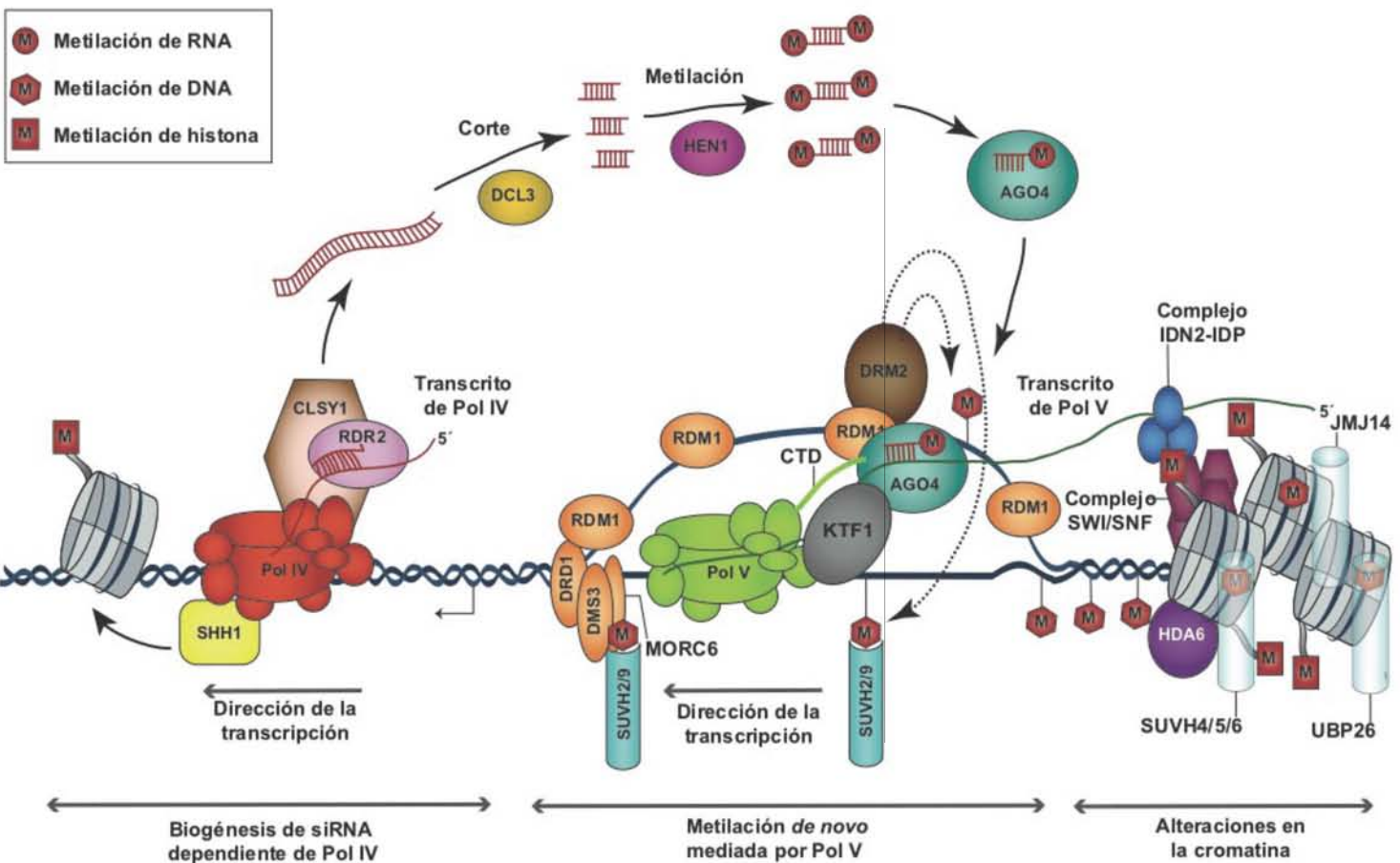
Una vez iniciada la transcripción de sus sitios blancos, Pol V puede reclutar a AGO4 a través de una región en el extremo carboxilo terminal de NRPE1 llamada “AGO hook”, la cual interactúa con “KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF1, también conocido como SPT5L), un factor de elongación putativo que también contienen el motivo AGO hook; pudiendo servir como proteína de andamiaje entre NRPE1 y AGO4. El hcRNA asociado a AGO4 reconoce el transcrito nascente de Pol V mediante complementariedad de bases, mientras que INVOLVED IN DE NOVO 2 (IDN2) forma un complejo con sus proteínas parálogas IDP1 y IDP2 (complejo IDN2-IDP) para poder estabilizar el apareamiento entre el hcRNA y el transcrito de Pol V, además de facilitar la RdDM, mediante la alteración del posicionamiento de los nucleosomas adyacentes por interacciones con los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF. A su vez, RDM1 recluta a DRM2, quien cataliza la metilación de novo en los mismos sitios genómicos donde se inició la transcripción de Pol V (Matzke and Mosher, 2014; Böhmendorfer et al., 2014).

Algunos loci blanco de RdDM requieren de la remoción de marcas epigenéticas de activación (como la acetilación H3K4 y la ubiquitinación H2B) para mantener la metilación del DNA y promover la metilación de H3K9. La proteína desmetilasa de histonas “JUMONJI 14” (JMJ14) y otras dos desmetilasas relacionadas: “LYSINE ESPECIFIC HISTONE DEMETHYLASE 1” (LDL1) y LDL2, participan en el mantenimiento de la metilación de DNA mediada por DRM2, presuntamente mediante la remoción de H3K4me en los loci blancos. Mientras que la desubiquitinación de H2B mediada por “UBIQUITIN-SPECIFIC-PROTEASE 26” (UBP26), es necesaria para el mantenimiento de la metilación en contexto no CG y la H3K9me en ciertos sitios blanco (Matzke & Mosher, 2014).

## **Surgimiento de mecanismos no canónicos de la vía RdDM**

### **A) Metilación del DNA inducida por miRNAs y tasiRNAs.**

Hasta hace poco se creía que los mecanismos de regulación postranscripcional y transcripcional (PTGS y TGS), mediados por RNAs pequeños, eran completamente independientes. Sin embargo, estudios realizados en arroz, muestran que el precursor tallo asa (ssRNA) de algunos miRNAs, puede ser procesado alternativamente produciendo miRNAs de 24 nt conocidos como miRNAs largos (lmiRNAs), los cuales se asocian a AGO4. Algunos de los lmiRNAs asociados a AGO4 pueden guiar la metilación

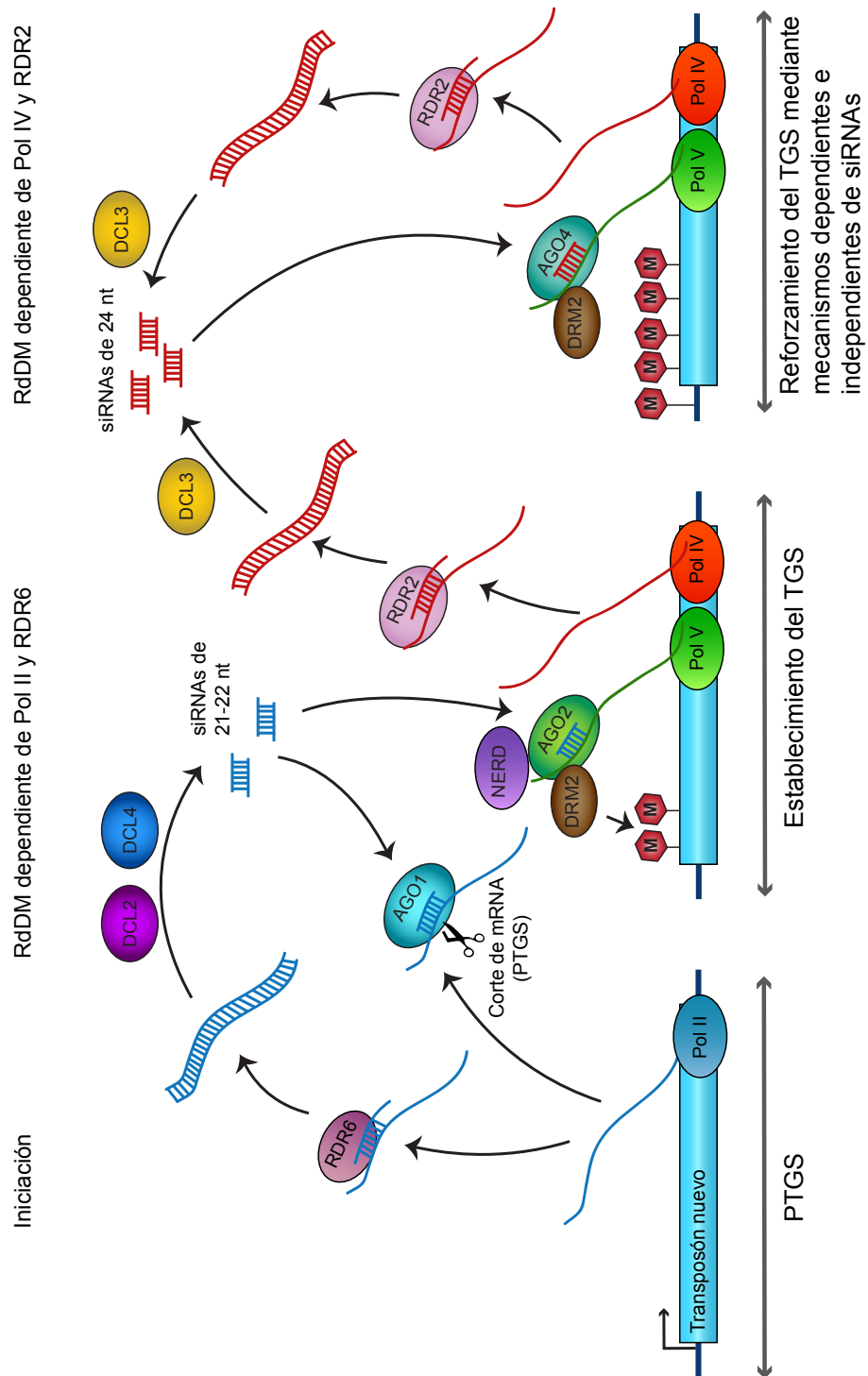


**Figura 17. Via canónica de RddM. Se muestra un modelo transcripcional para RddM.** La biogénesis de hc-siRNAs dependiente de Pol IV (panel izquierdo), Pol IV transcribe un sRNA y es procesado por RDR2 en un dsRNA con la asociación de la proteína remodeladora de la cromatina CLSY. El dsRNA es procesado por DCL3 en hc-siRNAs de 24 nt, los cuales son metilados en sus extremos 3' por HEN1 e incorporados a AGO4. SHH1 se une a la marca H3K9, interactuando con Pol IV puede reclutarla al loci blanco. En la metilación de novo mediada por Pol V (panel central). Pol V transcribe un RNA de andamiaje en el cual se une el RISC conformado por AGO4/hc-siRNA mediante complementariedad de bases. AGO4 es reclutada a través de interacciones con una región en el extremo C-terminal de Pol V y KTF1, "AGO hook". RDM1 une a AGO4 y DRM2, quien cataliza la metilación del DNA de novo. La transcripción por Pol V es facilitada por RDM1, DMS3 y MORC6, quienes ayudan a estabilizar el transcrito naciente. Pol V puede ser reclutada por SUVH2 y SUVH9, quienes pueden unirse a DNA metilado. La posición de los nucleosomas (panel derecho) se ajusta por el Complejo SWI/SNF, interactuando con el complejo IDN2-IDP, el cual se une a los transcritos de andamiaje de Pol V. La deposición de marcas represivas en las histonas (como H3K9me) es facilitada por SUVH4-6, seguido de la remoción de marcas de activación por HDA4, JMJ14 y UBP26. Un mayor orden en la conformación de la cromatina refuerza el estado de silenciamiento, el cual se establece a través de las actividades ATPassa de MORC1 y MORC6 (Modificado de Matzke & Mosher, 2014)

de genes blanco. Mientras que en *Arabidopsis*, algunos precursores de ta-siRNAs pueden ser procesados por DCL1 produciendo ta-siRNAs de 21 nt, los cuales pueden asociarse a AGO4 y AGO6, que pueden actuar en la RdDM de los loci *TAS* correspondientes (Matzke & Mosher, 2014).

### **B) RdDM dependiente de RDR6**

Los transposones “jóvenes” o recién insertados son transcritos provenientes de Pol II, algunos de estos transcritos pueden ser copiados por RDR6 produciendo un dsRNA que puede ser procesado por DCL2/DCL4 en siRNAs de 21-22 nt (ver Figura 18). Posteriormente son cargados dentro de AGO1; el RISC formado puede guiar el corte de los transcritos de estos mismos transposones, creando un ciclo autoregulatorio en la expresión de estas secuencias y su PTGS. Gran parte de estos transposones pertenecen a la familia LTR/ATHILA, los cuales se encuentran en un alto número de copias en regiones pericentroméricas repetidas. Aunado a este mecanismo, los siRNAs producidos por RDR6/DCL2/4 pueden desencadenar metilación de DNA *de novo*, mediante su asociación con AGO2 y el reclutamiento de una proteína de andamiaje NEEDED FOR RDR2-INDEPENDENT DNA METHYLATION (NERD), un transcrito de Pol V y DRM2. Esta metilación inicial puede desencadenar la activación de la vía RdDM canónica, dando origen a hc-siRNAs de 24 nt y así reforzar la metilación y el TGS de transposones. Se cree que la transición de PTGS a TGS ocurre cuando existen elevados niveles de dsRNAs dependientes de Pol II/RDR6 que saturan a DCL2 y DCL4; dejándolos libres de ser procesados por DCL3, la cual producirá hc-siRNAs que activarán la vía RdDM canónica (Matzke & Mosher, 2014; Creasey, 2014).

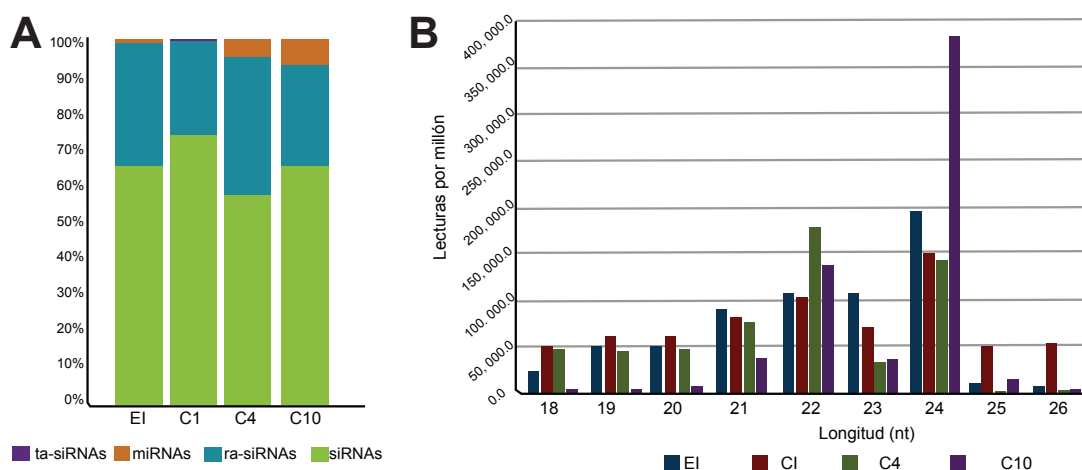


**Figura 18. Vía RdDM no canónica dependiente de Pol II y RDR6.** Esta vía provee una manera de establecer RdDM y, eventualmente, asegura el TGS de Transposones recién adquiridos que originalmente son blanco de PTGS. En el PTGS (panel izquierdo), un transposón recién insertado es inicialmente activo y es transcrito por Pol II. Algunos de esos transcritos son copiados por RDR6, generando un dsRNA que será procesado por DCL2 y DCL4 en siRNAs de 21-22 nt. Los siRNAs generados son cargados en AGO1 y guían el corte del transcrito del nuevo transposón. En una desviación de la vía RdDM canónica (panel central), algunos siRNAs de 21-22 nt pueden establecer niveles bajos de metilación de forma dependiente de Pol V y AGO2, quien interactúa con NERD a través de su motivo AGO hook. La metilación dispersa, recluta a Pol IV quien inicia la vía RdDM canónica que refuerza el TGS (Modificado de Matzke & Moshier, 2014)

## Antecedentes

Durante la embriogénesis somática del maíz las células son sometidas a concentraciones elevadas de fitorreguladores, provocando la reprogramación de su destino celular en un periodo de tiempo corto. Se ha propuesto que uno de los mecanismos regulatorios que podría estar involucrado en la inducción de la embriogénesis somática es el silenciamiento genético por RNA. Se ha estudiado extensivamente el papel de los sRNAs durante el desarrollo, crecimiento y respuestas a condiciones adversas de las plantas. Por ejemplo, muchos blancos de miRNAs son factores transcripcionales; a través de la regulación de la expresión de estos factores, se pueden modular indirectamente varios aspectos del desarrollo como: la especificación de la polaridad, transiciones en el desarrollo, morfogénesis floral entre otros procesos (Ramachandran & Chen, 2008; Katiyar-Agarwal & Jin, 2010).

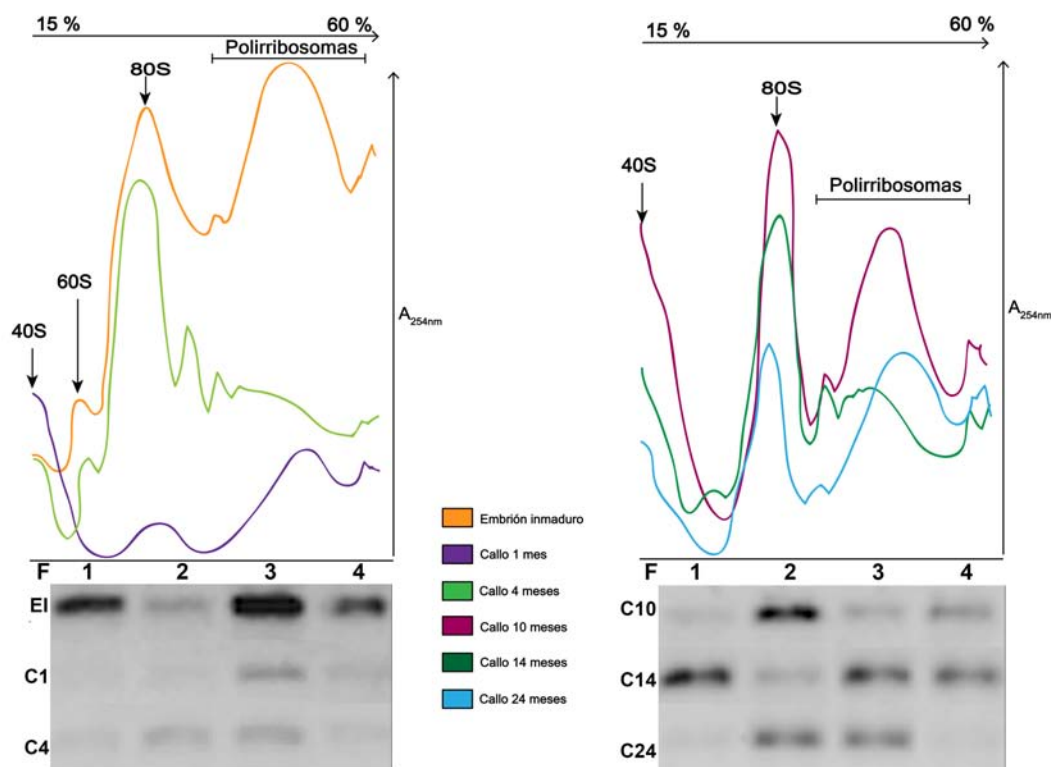
En trabajos previos en el laboratorio, se generaron cuatro bibliotecas de sRNAs: de embriones inmaduros (EI) y callos embriogénicos de maíz secuenciadas en la plataforma Solexa (Alejandri-Ramirez, datos no publicados). Las secuencias obtenidas fueron clasificadas acorde a su tamaño (Figura 19B) así como por tipo de RNA pequeño: miRNAs reportados, hc-siRNAs (ra-siRNAs), ta-siRNAs y RNAs pequeños interferentes no asociados a secuencias repetidas (siRNAs; Figura 19A).



**Figura 19. Distribución de las lecturas generadas en las bibliotecas por tipo de sRNA y tamaño.** A: Proporción de sRNAs por tipo de RNA presentes en las distintas bibliotecas (EI: Embrión inmaduro, C1: callos 1 mes de subcultivo, C4: callos 4 meses subcultivo y C10: Callos de 10 meses de subcultivo) B: Abundancia de sRNAs por longitud de su secuencia en las distintas bibliotecas generadas en Solexa. Normalización mediante cuentas por millón (Alejandri-Ramirez, datos no publicados).

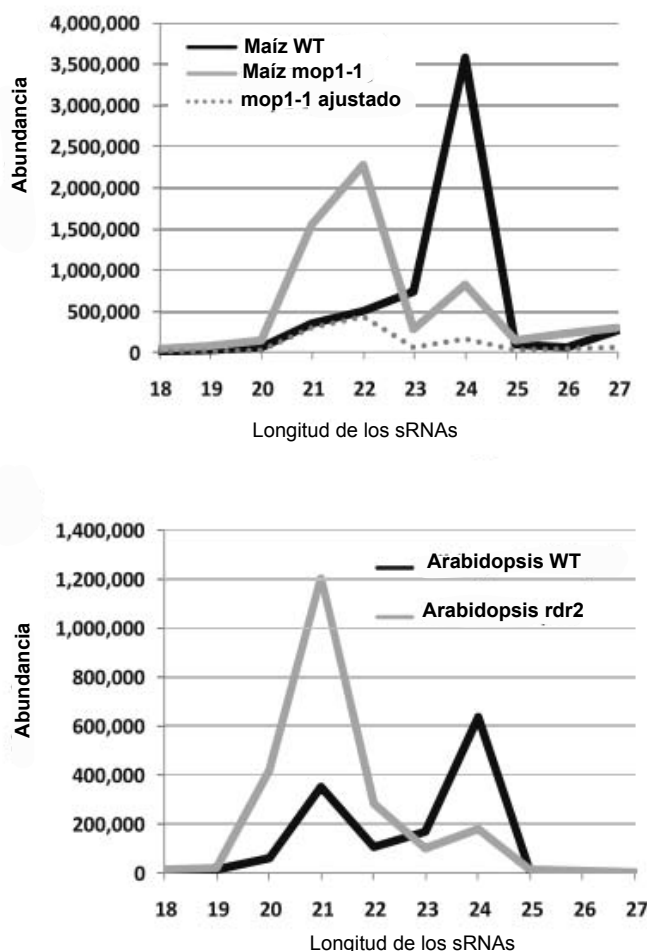
La variación en la composición de las bibliotecas indica algunos cambios importantes en la producción de RNAs, especialmente para la biblioteca de C4, donde se ve una disminución de las lecturas de 24 nucleótidos y un aumento en aquellas correspondientes a los 22 nt. Sin embargo, existe un aumento en las secuencias correspondientes a los ra-siRNAs aun cuando las lecturas de 24 nt disminuyen. Por lo que es probable que algunos de los componentes de la maquinaria se encuentren funcionando de manera diferente (Alejandri- Ramirez, datos no publicados).

Además, mediante RT-PCR se encontró que la distribución del transcrito de una proteína homóloga a AtAGO1 (ZmAGO117) en perfiles polirribosomales de callos embriogénicos de maíz, cambiaba en los diferentes tiempos de subcultivo analizados (Figura 20), indicando que ZmAGO117 se podría estar traduciendo de manera diferencial durante los diferentes tiempos de subcultivo de callos embriogénicos de maíz (Juárez-González, 2014).



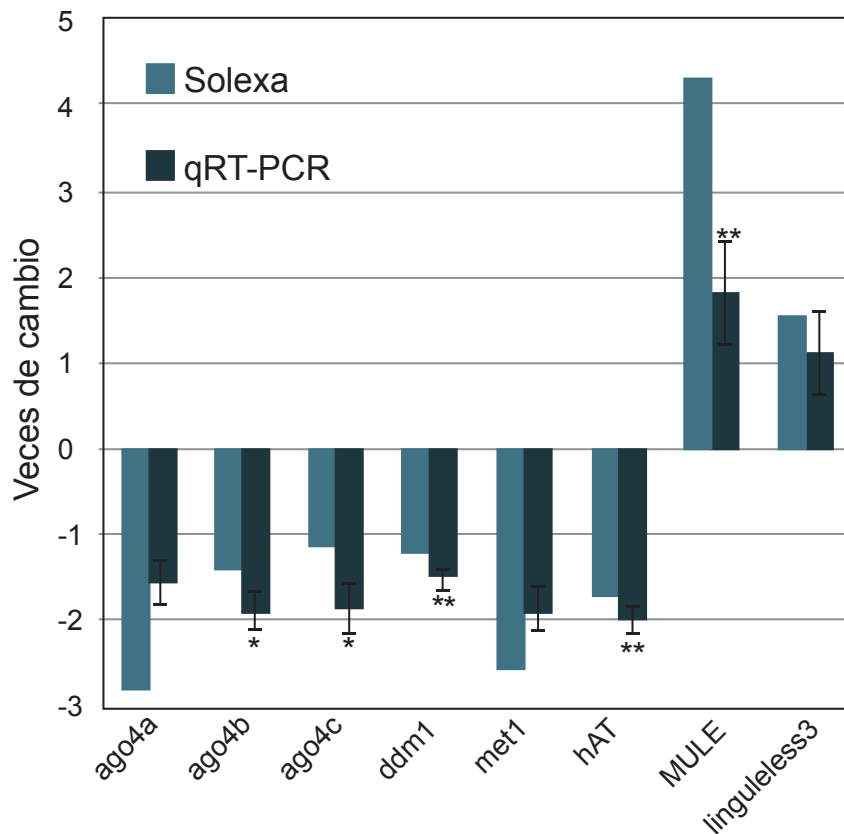
**Figura 20. Perfil polirribosomal de callos embriogénicos de maíz durante diferentes tiempos de subcultivo y distribución de ZmAGO117 en las fracciones polirribosomales.** Las gráficas muestran los perfiles polirribosomales para diferentes tiempos de subcultivo analizados. (Páneles inferiores) Se obtuvieron 4 fracciones correspondientes a las subunidades ribosomales 40S y 60S (F1), al complejo 80S o ribosoma recién ensamblado (F2) y a los complejos polirribosomales ligeros y pesados (F3 y F4, respectivamente) Las fracciones F3 y F4 se consideran como traduccionalmente activas. Se realizó RT-PCR de ZmAGO117 con RNA obtenido a partir de las distintas fracciones polirribosomales y tiempos de subcultivo, observándose cambios en la distribución de los transcritos en los diferentes tiempos. (Tomado de Juárez-González, 2014)

La idea de que un cambio en las poblaciones de sRNAs y particularmente en las longitudes de los sRNAs de las distintas bibliotecas (Figura 19) pueda deberse a cambios en la expresión de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de sRNAs, se evidencia en trabajos como el realizado por Nobuta *et al.*, en 2008. En este trabajo encontraron que en mutantes para la RNA polimerasa dependiente de RNA, RDR2, quien participa en la vía RdDM en *Arabidopsis* y maíz (*rdr2* y *mop1*) las poblaciones de hc-siRNAs de 24 nt disminuían dramáticamente, resultando en el enriquecimiento de lecturas de miRNAs y ta-siRNAs. Sin embargo, en contraste con *rdr2*, la mutante *mop1* de maíz presentaba un aumento en poblaciones de sRNAs de 22 nt que mapean en regiones heterocromáticas (hc-siRNAs de 22 nt; Figura 21), sugiriendo que puede existir algún mecanismo alternativo para la producción de hc-siRNAs.



**Figura 21. Longitudes de sRNAs en las librerías WT de mazorcas inmaduras de maíz e inflorescencias de *Arabidopsis* y *rdr2* o *mop1*.** Arriba: Comparación de la abundancia total de la secuencias de sRNAs de maíz WT contra las encontradas en *mop1*. Abajo: Comparación de la abundancia total de la secuencias de sRNAs de *Arabidopsis* WT contra las encontradas en *rdr2*. (Nobuta *et al.*, 2008)

Por otro lado, Jia *et al.*, en 2009, mediante análisis de RNA-seq en meristemos apicales de maíz B73 y *mop1* 14 días después de la polinización, observaron cambios en la expresión de cerca de 400 genes involucrados en procesos que tienen que ver con modificaciones en la cromatina en la mutante *mop1*, entre los que destacan secuencias supuestamente homólogas a *AtAGO4*, *DRD1* y *MET1* (involucradas en RdDM), en todos los casos la expresión en las mutantes *mop1* se vio disminuida comparada con la obtenida en WT. Además, la pérdida de RDR2 (MOP1) en maíz, resulta en la sobreexpresión de ciertos elementos transponibles (TE), incluyendo los elementos *Huck*, miembros de la familia de retrotransposones Ty3/*Gypsy-like*. Esto indicó que la ausencia de un miembro de la vía RdDM, provoca una desregulación general de otros miembros de la vía, derivando en una mayor expresión de TE (ver Figura 20).



**Figura 22. Validación de ocho genes expresados diferencialmente en *mop1*.** Se eligieron 8 genes relacionados con RdDM para su validación por qRT-PCR (*ago4a* [Chromdb ID: AGO104], *ago4b* [Chromdb ID: AGO105], *ago4c* [Chromdb ID: AGO119], *ddm1* [Chromdb ID: CHR101], *met1* [Chromdb ID: DMT101]), transposones (*hAT* y *MULE*) y un regulador del desarrollo del SAM *liguleless3* (GRMZM2G087741). Los cambios son representados como veces de cambio relativos a la abundancia de transcritos en la planta WT y *mop1* obtenidos en los experimentos de RNAseq y qRT-PCR (Modificado de Jia *et al.*, 2009)



## Hipótesis

La expresión diferencial de sRNAs durante la inducción y subcultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz, es debida a cambios en la expresión de la maquinaria de biogénesis de sRNAs. Por lo que un aumento en la expresión de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de las vías de hc-siRNAs y miRNAs dará como resultado un aumento en las poblaciones de sRNAs asociados a estas vías.

## Objetivo General

Análisis de la expresión de componentes esenciales de las vías de biogénesis de hc-siRNAs y miRNAs durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.

## Objetivos Particulares

- Reconstrucción filogenética y análisis de secuencias proteicas homólogas a proteínas clave en la biogénesis de sRNAs en maíz.
- Inducción y subcultivo de callos embriogénicos de maíz a partir de embriones inmaduros de la variedad VS-535 (Tuxpeño) y el maíz híbrido H-565 (Costeño mejorado).
- Evaluar los niveles de acumulación de transcritos a nivel de RNA total de genes clave para la biogénesis de hc-siRNAs y miRNAs mediante qRT-PCR en callos embriogénicos de maíz durante los diferentes tiempos de subcultivo.
- Evaluar los niveles de proteínas involucradas en la biogénesis de sRNAs mediante inmunorélicas tipo Western.

## Materiales y Métodos

### Análisis filogenéticos y de homología.

Se utilizó un modelo oculto de Markov (HMM, por sus siglas en inglés: Hidden Markov Model) en la búsqueda de las secuencias de aminoácidos para las proteínas DCL, AGO y RDR en el proteoma de maíz. Las secuencias de las familias DCL, AGO y RDR fueron extraídos de Chromodb ([www.chromdb.org](http://www.chromdb.org); Gendler, 2008). Se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con el proteoma de maíz B73 (Maize B73 RefGen\_v3) obtenido de MaizeDGB ([www.maizeGDB.org](http://www.maizeGDB.org)) mediante el programa BLASTP (Altschul, 1990). Finalmente, se utilizó la base de datos Pfam ([pfam.sanger.ac.uk/search](http://pfam.sanger.ac.uk/search)) para confirmar las secuencias predichas como RDR, DCL y AGO en maíz. Para la obtención de las secuencias de RDR, DCL y AGO de arroz (*Oryza sativa J.*) y *Arabidopsis thaliana* también se analizaron las secuencias de las familias en Chromodb. A diferencia de maíz, las secuencias contenían un número de identificación (GI, por sus siglas en inglés: GenInfo Identifier). En el caso de arroz, se compararon con las secuencias reportadas por Kapoor *et al.* (2008) y con la base de datos de GRAMENE ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)). Para *Arabidopsis*, las secuencias obtenidas en Chromodb fueron comparadas con las secuencias reportadas por Quian *et al.* (2011) y con la base de datos TAIR ([www.Arabidopsis.org](http://www.Arabidopsis.org)). En todos los casos se confirmaron las familias RDR, DCL y AGO en Pfam.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple utilizando MUSCLE3.0 ([www.drive5.com/muscle](http://www.drive5.com/muscle); Edgar, 2004) entre cada una de las familias de las 3 especies (familias RDR, DCL y AGO de *Arabidopsis*, arroz y maíz). El análisis filogenético se realizó mediante una inferencia Bayesiana de secuencias de aminoácidos mediante una simulación de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) en MrBayes v 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Las simulaciones se realizaron para  $1 \times 10^6$  generaciones y se descartaron el 25.0 % de los árboles obtenidos. Se utilizó el modelo de sustitución Jones Taylor Thornton y la estimación entre la tasa de variación entre los sitios se realizó acorde a una distribución gamma. Los valores de probabilidad (>50%) indican el soporte de los nodos. Se estableció una nomenclatura de identificación de cada una de las secuencias de aminoácidos en maíz utilizando los resultados obtenidos en las reconstrucciones filogenéticas.

Se obtuvieron los dominios funcionales característicos de cada una de las proteínas DCL, RDR y AGO encontradas en maíz mediante el uso de la base de datos Pfam. En el caso de las proteínas AGO, se tomaron los datos de las secuencias reportadas para

el dominio MID en Frank *et al.* (2012), se realizó un alineamiento múltiple utilizando MUSCLE y se identificaron los dominios MID ortólogos en las AGOs encontradas en maíz.

## Embriogénesis somática de maíz

### Materiales

Todas las soluciones se prepararon usando agua desionizada estéril.

### Composición del medio

Todos los medios se prepararon al momento de usarlos y se almacenaron un máximo de tres semanas a 4°C.

- **N6I (Medio de Iniciación)**

Sales N6 (Chu *et al.*, 1975) y vitaminas del cocktail 20 (Loza-Rubio *et al.*, 2008), 2 mg/L de 2, ácido 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, caseína hidrolizada 200 mg/L, sacarosa 30 g/L y Gelzan<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L; ajustar pH a 5.7, antes de agregar el Gelzan<sup>TM</sup>; se colocó el medio en un recipiente y se cubrió con aluminio, se esterilizó a 120°C por 18 min. Después de esterilizar se dejó enfriar y se colocó en cajas Petri (100X15 mm) en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. Se dejó solidificar el medio y se almacenó a 4°C hasta su uso.

- **N6P (Medio de Proliferación)**

Sales N6 (Chu *et al.*, 1975) y vitaminas del cocktail 20 (Loza-Rubio *et al.*, 2008), 2 mg/L de 2, ácido 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), Kinetina (6-Furfurilaminopurina) 0.1 mg/mL, adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, caseína hidrolizada 200 mg/L, sacarosa 30 g/L y Gelzan<sup>TM</sup>(Sigma-Aldrich) 3.3 g/L; ajustar pH a 5,7 antes de agregar el Gelzan<sup>TM</sup>; se calentó para disolver el Gelzan<sup>TM</sup> y se vació el medio en frascos de aproximadamente 30 ml, se cubrieron los vasos con una tapa de polipropileno y esterilizaron a 120°C por 18 min. Se dejó solidificar el medio y se almacenó a 4°C hasta su uso

## Material biológico

### Embriones inmaduros de maíz.

Se obtuvieron muestras de 2 lotes de embriones de maíz variedad VS-535 (Tuxpeño) y 3 lotes de maíz híbrido H-565 (Costeño mejorado) 14-18 días después de la polinización, tres de los cuales se encontraban en periodos de Proliferación (Lote #1, 4 y 5). La finalidad de usar varios lotes consistió en abarcar periodos muy prolongados de subcultivo (hasta casi dos años) y comparar entre dos tipos de maíz relacionados genéticamente. Nos interesó estudiar si el fondo genético afecta en los resultados o si los cambios en la maquinaria de biogénesis de RNAs pequeños eran un fenómeno conservado durante la embriogénesis somática de maíz.

Se tomaron muestras de Embriones inmaduros, callos embriogénicos de 1, 4, 10, 18 y 22 meses como se muestra en la Tabla III:

Tabla III. Esquema de muestro						
NÚMERO DE LOTE Y TIPO DE MAÍZ	EMBRIÓN INMADURO (EI)	CALLOS DE 1 MES (C1)	CALLOS DE 4 MESES (C4)	CALLOS DE 10 MESES (C10)	CALLOS DE 18 MESES (C18)	CALLOS DE 22 MESES (C22)
1: VS-535				✓	✓	✓
2: VS-535	✓	✓	✓			
3: HS-565	✓	✓	✓			
4: HS-565					✓	✓
5: HS-565				✓		

### Desinfección de maíz para callo embriogénico a partir de embrión inmaduro.

#### Soluciones

- Solución de etanol al 70%
- Solución de cloro al 50% (suplementada con 8 gotas de Microdyn (plata coloidal) y 3 gotas de Tween-20 o Triton X-100 por cada 250 mL de solución.
- Cefotaxima (1g / 4mL)

Nota: Todo el material de laboratorio usado se esterilizó con anticipación.

Previo a la desinfección, se retiraron y desecharon las hojas de los jilotes, se fragmentaron en porciones de 6 a 8 cm dependiendo del tamaño total del jilote

En campana de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70%; se colocaron los fragmentos de jilote en un recipiente y se agregó la solución de etanol al 70% y se agitó suavemente durante 1 min. Se decantó el etanol y se enjuagó con agua desionizada estéril. Posteriormente, se adicionó cloro al 50% y se agitó lentamente durante 15 min. Finalmente, se decantó la solución de cloro y enjuagó 3 veces con abundante agua desionizada estéril.

### **Disección de los embriones e iniciación de los callos embriogénicos**

Con ayuda de un pinza larga, se colocó un fragmento de jilote en un vidrio o caja Petri. Con bisturí, se retiró en hilera una porción del grano (aproximadamente la  $\frac{1}{4}$  parte del total del grano). Se Extrajeron los embriones y se colocaron en una caja Petri, adicionada con agua desionizada estéril y Cefotaxima (lo equivalente a 0.1 U de una jeringa de insulina). Con pinzas, se colocaron 30 embriones en el medio N6I. Al final, se envolvieron las cajas Petri con plástico y se almacenaron a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en cámara de cultivo en oscuridad por 3 semanas. Los cultivos se observaron cada 3 o 4 días; si aparecía alguna contaminación, los embriones no contaminados se rescataron y se colocaron en una nueva caja con medio N6I.

### **Subcultivo y Proliferación en medio N6P**

Transcurridas 3 semanas, los fragmentos de callos embriogénicos crecieron rápidamente de color blanco a amarillo, pequeñas piezas de callos embriogénicos se seleccionaron para ser subcultivados al medio N6P, se colocaron formando cúmulos en el centro del frasco que contiene el medio. Se debió tener mucho cuidado al colocar las tapas de polipropileno para evitar contaminación, además de cubrirlas con plástico y mantener los callos bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas. Se transfirieron los callos cada 2 semanas a un nuevo medio N6P. En cada subcultivo, se descartó cualquier parte de color café (callo oxidado) y se seleccionaron solamente las partes amarillas o blancas de callo sano.

### **Extracción de RNA**

Se Maceraron 0.5 g de muestra congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  en mortero manteniendo la muestra congelada con nitrógeno líquido, en todo momento se mantuvo la muestra congelada hasta formar un polvo fino blanco. Para la extracción de RNA se utilizó el kit comercial Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research) y se purificó utilizando el kit comercial RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA se cuantificó utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos, se utilizó el software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Untergasser, 2007)

Se diseñaron oligonucleótidos para 3 DCLs, 3 RDRs, 7 AGOs y la subunidad mayor de Pol IV y Pol V (NRPD1 y NRPE1, respectivamente) con el genoma de referencia B73 RefGen\_v3 utilizando las secuencias de cDNA. La selección de los transcritos a analizar se realizó centrándonos en dos de las vías de biogénesis y funcionamiento de sRNAs. De manera general, se seleccionaron aquellos transcritos correspondientes a las vías de miRNAs y hc-siRNAs, incluyendo a RDR6.

Debido al interés de caracterizar al grupo de AGO1 de maíz para determinar si cada una de las secuencias son funcionales, se tuvo especial cuidado en el diseño de sus oligonucleótidos. De las 6 secuencias de ZmAGO1 (a-f), se tomó como criterio de exclusión a aquellas que no tuviesen el sitio de unión para miRNA168. Las secuencias ZmAGO1b y ZmAGO1f se descartaron al no presentar el sitio complementario a miR168.

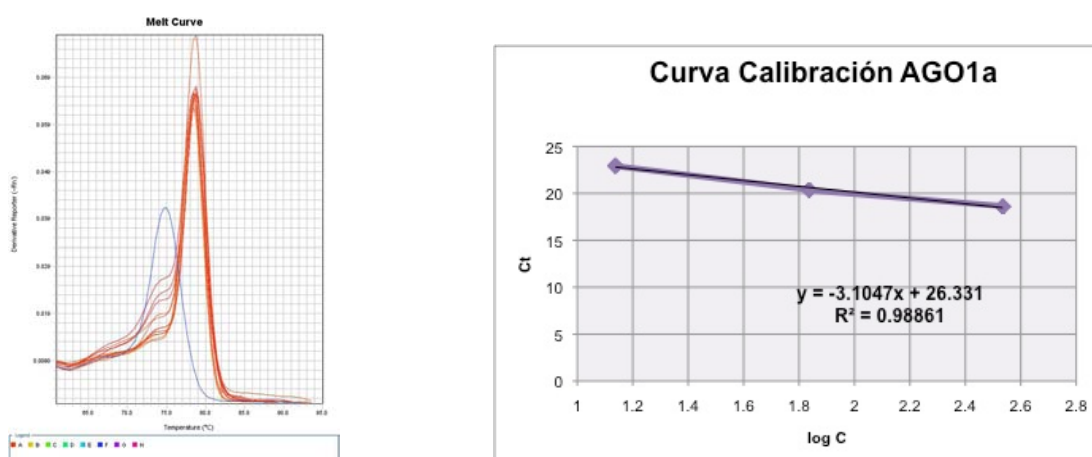
**Tabla IV. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de sRNAs.**

Nombre de la secuencia	Secuencia del Primer Forward	Secuencia del Primer Reverse	Región de amplificación	Tamaño Amplificación (pb)
ZmDCL1	TCGAAATTACCGTGGCAAGC	TGCTGAAAAGCACTGCATGG	Exón	116
ZmDCL3	TGCAAGCAGAGTGGAAACAAC	AGGTGGTGTACTACGTTTTGTG	Exón	97
ZmDCL5	TGAATGCCATCGTGCTTGTG	TCCAAATATAGCTGGCCTCCAC	Exón	70
ZmRDR2	TTGCTGCAGCTGACTTATGC	TCCTTGCATGCATGAAAGCG	Exón	98
ZmRDR6a	ACTTGGTCAACGTGCTGATG	AGCAACGTTACATCTTCGC	Exón	104
ZmRDR6b	TTGCTCAAATGCAGGAAGCC	TCAACATCAGTGCTGCAGTG	Exón	123
ZmAGO1e	TTTTGCTCTTGAGCCTGTGC	AACGTGCCTTTAACGCTCTC	Exón	74
ZmAGO1c	AGCGTGAGAAAGCCATCTTG	AACACGAGCTTCAACGGATG	Exón	116
ZmAGO1d	TGTC AAGACGCATTCCCTTG	AAGCCACAACAGCAGCAATG	Exón	114
ZmAGO1a	TGGTACTGTGAAGACTGTGGTC	TTGCAAGCACGGTAAAGTGG	Exón	82
ZmAGO4a1	TTGTTTAAGCCACGGGAAGC	TCAGGCTTTCTCTCCAGAAC	Exón	116
ZmAGO4b	TTGAGGGCATGTGGTGTTC	ATTGCCGGCTTTCAGCTTTG	Exón	87
ZmAGO4a2	GAGGCTTTGCAGCTTTTGGG	TTCAACACCAGCAGCCAAAG	Exón	89
ZmNRPD1 (Pol IV)	GGTGCTGAAAAGATCGGTGT	CGAGCTGGGGTGAGATAGAG	Exón	166
ZmNRPE1 (Pol V)	TGACTTCTCCAGATGCACA	TCCCCATGCTGAAGAGTTCC	Exón	188

## Curvas de calibración

Se probaron los cebadores en RT-PCR punto final, se observó que la abundancia de algunos transcritos era muy baja en las muestras de embrión inmaduro o callos embriogénicos, mientras que otros mostraban más de una banda de amplificación. Para las evaluaciones de transcrito por RT-PCR cuantitativo, se realizaron las curvas de calibración. Se lograron calibrar 8 de los 15 transcritos propuestos y 18S como gen constitutivo. Los 7 transcritos no calibrados presentaron inespecificidades como diversos picos de amplificación o una abundancia demasiado baja como para ser detectada. Se obtuvo el porcentaje de eficiencia y se procedió a la cuantificación.

En cada uno de los casos se obtuvieron las curvas de desnaturalización como primer parámetro a analizar, aquellas curvas con desnaturalización con un solo pico de amplificación diferente al formando por los dímeros de oligonucleótidos se tomaban como valores reales y se podían utilizar para realizar la curva de calibración, en cada caso se corroboró el resultado mediante RT-PCR tiempo final y un gel de electroforesis (ver Figura 23).



**Figura 23.** Ejemplo de Curva de desnaturalización (izquierda) y Calibración (derecha). Se muestra el resultado obtenido para la amplificación de ZmAGO1a.

Las curvas de calibración se realizaron utilizando embriones inmaduros (EI) de maíz VS-535, H-565 y ejes de 12 h de germinación de maíz Chalqueño. No existió variación en los resultados por lo que en la cuantificación de las muestras se utilizaron EI de maíz VS-535 para todas las muestras. La eficiencia fue corregida puesto que en algunos transcritos el valor obtenido fue mayor o menor al rango de confiabilidad establecido (85 – 115 %). En la Tabla V se resumen los resultados obtenidos de las curvas de calibración, se describe la eficiencia de la amplificación, así como los intervalos de concentración de RNA utilizados para la realización de las curvas.

**Tabla V. Resultados de las Curvas de Calibración.**

	% Eficiencia	Rango (ng RNA)	m	R <sup>2</sup>
ZmNRPD1 (Pol IV)	106.1	423.50 – 16.94	-3.189	0.935
ZmNRPE1 (Pol V)	108.1	142.32 – 2.22	-3.142	0.913
ZmDCL3	105.8	350.70 – 21.91	-3.191	0.956
ZmDCL1	98.2	351.20 – 39.02	-3.366	0.918
ZmRDR2	102.5	351.20 – 39.02	-3.264	0.949
ZmRDR6b	117.3	110.20 – 12.24	-2.966	0.9833
ZmAGO1a	108.8	342.96 – 13.72	-3.104	0.988
ZmAGO4b	105.1	82.46 – 3.29	-3.205	0.992
rRNA 18S	80.1	15.00 – 0.326	-3.912	0.978

Una vez que se cuantificó el RNA total en las muestras, el análisis se realizó separando las muestras por lotes de Inducción, al que corresponden las muestras de embriones inmaduros (EI), callos de 1 mes (C1) y callos de 4 meses (C4) y lotes de Propagación compuesto por las muestras de callos de 10 meses (C10), callos de 18 meses (C18) y callos de 22 meses (C22). Por cada tiempo se tuvo una réplica biológica (una réplica de maíz VS-535 y otra de maíz H-565). Los valores se reportan como expresión relativa, mediante la normalización por 18S y por la muestra de EI en los lotes de inducción y C10 en los lotes de propagación.

La separación de lotes de inducción y de propagación se realizó así dada la extensión en los tiempos de muestreo, no se podía tener en un solo lote todos los muestreos. Por lo que no podemos asegurar que la expresión de los transcritos antes y en los primeros tiempos de la inducción de callos embriogénicos sea la misma en todos los lotes. Y dado que la normalización de los lotes de inducción es con base en la expresión de los embriones inmaduros. Es probable que los embriones utilizados para cada lote no se encontraran en las mismas condiciones debido a que fueron sembrados en diferentes épocas de temporal. Por lo que normalizar un lote de propagación con EI de un lote que fue inducido casi un año después podría dar resultados falsos durante la normalización. La separación de los lotes de propagación para su normalización mediante el primer tiempo de obtención de muestra nos brindó la seguridad de que al menos en esa ventana de tiempo, los cambio observados son relativos a la respuesta de la células iniciales de ese lote.

### **Retrotranscripción y Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR)**

Se utilizó el Kit EXPRESS One-Step SuperScript® qRT-PCR SuperMix y el termociclador Applied Biosystems® 7500.



Se prepararon reacciones de 10  $\mu$ l por triplicado cada una con:

- 0.2  $\mu$ l SuperScript®
- 5.0  $\mu$ l EXPRESS qPCR SuperMix con ROX
- 0.4  $\mu$ l de Oligonucleótidos (Forward y Reverse 10  $\mu$ M c/u),
- 3.4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 1.0  $\mu$ l de templado (RNA, o H<sub>2</sub>O como control negativo) y 2.6  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

El programa para la reacción de PCR fue: 50°C por 5 min para la retrotranscripción, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min, seguido por un análisis final para obtener una curva de desnaturalización de 60-95°C.

Todas las muestras se analizaron utilizando 50.0 ng de RNA por reacción (excepto la cuantificación de 18S que se realizó con 1.0 ng de RNA por reacción). Para cada transcrito, se analizaron todas las muestras en una sola placa, con la curva de calibración utilizando embriones inmaduros de maíz VS-535.

## Extracción de Proteínas

### Buffer de extracción

- 50 mM TRIS-HCl (pH: 7.5)
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 150 mM NaCl
- 10 % Glicerol

\*Agregar antes de usar:

- 5 mM Ditioneitol (DTT)
- 0.1 % IGEPAL® CA-630 (SIGMA-ALDRICH)
- 1.0 % MG132 (SIGMA-ALDRICH)
- 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
- 1 Tableta de Complete, Mini, EDTA-free  
(1 tableta/10 ml buffer)

Se Maceró 1.0 g de muestra congelada a -70°C en mortero manteniendo la muestra congelada con nitrógeno líquido, en todo momento se mantuvo la muestra congelada hasta formar un polvo fino blanco. Se colocó el polvo en tubos de 1.5 ml ( $\approx$  0.3 g por tubo) y se agregaron 0.4 ml de buffer de extracción. Se Mezcló en vortex hasta homogenizar y se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a 4 °C. La muestras se colocaron en hielo y se recuperó el sobrenadante distribuyéndolo en alícuotas de 0.2 ml. Se almacenó inmediatamente a -70°C.

## Cuantificación de proteínas por Método Bradford

### Preparación de estándar.

Se Reconstituyó el estándar liofilizado de albúmina de suero bovino (BSA) en agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>); (1.0 µg/µl).

### Curva estándar

Se Realizaron 5 diluciones de estándar BSA (1.0 µg/µl) en 800 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (2, 5, 8, 12 y 15 µg BSA/µl).

Se agregaron 200 µl de reactivo concentrado de Bradford (BioRad), se mezcló e incubó a temperatura ambiente (TA) por al menos 5 min. Se cuantificó la absorbancia a 595 nm.

### Cuantificación de muestras

Se agregó 1.0 µl de extracto total de proteínas a 799.0 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Se Adicionaron 200 µl de reactivo concentrado de Bradford (BioRad), se mezcló e incubó a temperatura ambiente (TA) por al menos 5 min. Se cuantificó la absorbancia a 595 nm.

## Electroforesis y Transferencia de Proteínas

### Soluciones

Todas las soluciones se almacenaron a 4.0 °C.

#### Solución I

Por cada 100.0 ml:

- 130.0 g Acrilamida

- 0.8 g Bis-Acrilamida

\*Llevar hasta 100.0 ml con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>; filtrar a través de filtro de 2 µm de diámetro

#### Solución II

Por cada 100.0 ml:

#### Solución III

Por cada 100.0 ml:

- 3.03 g TRIS-HCl (pH: 6.8)

- 0.2 g Sodio dodecil sulfato (SDS)

\*Llevar hasta 100.0 ml con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

#### Buffer de carga proteínas (5X; 20 ml)

- 240 mM Trizma base
- 0.8 % SDS
- 40.0 % glicerol
- 0.08 % azul bromofenol
*Agregar antes de usar:
- 5.0 % β- mercaptoetanol
*Llevar hasta 20 ml con H <sub>2</sub> O

<b>Solución de Tinción geles poliacrilamida</b>
- 50.0 g Sulfato de amonio
- 100.0 ml Etanol (96.0 %)
- 100.0 ml Etanol (96.0 %)
- 0.2 g Azul de Coomassie (CBB G-250)
- 23.5 ml Ácido Ortofosfórico (2.0 %)
*Llevar hasta 1.0 L con H <sub>2</sub> O

### Preparación de Gel de poliacrilamida 7.0 %

<b>Gel de resolución pH:8.8</b>
2.6 ml Solución I
5.5 ml Solución II
2.9 ml H <sub>2</sub> O
50.0 µl Persulfato de amonio (APS; 20%)
5.0 µl Tetrametiletilendiamina (TEMED)

<b>Gel concentrador pH: 6.8</b>
830.0 µl Solución I
2.5 ml Solución III
1.6 ml H <sub>2</sub> O
50.0 µl Persulfato de amonio (APS; 20%)
5.0 µl Tetrametiletilendiamina (TEMED)

<b>Buffer de transferencia (1X)</b>
100.0 ml buffer corrida 10X
100.0 ml Metanol
*Llevar hasta 1.0 L con H <sub>2</sub> O

Para hacer los geles de poliacrilamida al 7%, se mezclaron los componentes del gel de resolución y se vaciaron entre las placas de vidrio. El grosor final del gel fue de 0.75

mm, una vez polimerizado se agregó la solución de gel concentrador. Se cargó en cada pozo lo equivalente a 40 µg de proteína por cada muestra y se separaron con buffer de corrida 1X por ~90 min a 30mA. Se realizó cada gel por duplicado, uno de los cuales fue teñido con la solución de tinción y el otro se utilizó para la transferencia de proteínas.

Las proteínas en los geles se transfirieron a membranas de Fluoruro de Polivinilideno (PDVF; Millipore) (previamente activada en metanol) mediante un sistema humedo (Bio Rad) a 250 mA por 2 h 30 min en buffer de transferencia a 4 °C. Finalmente las membranas se tiñieron con Rojo de Ponceau para monitorear la eficiencia de la transferencia.

## Western Blot

### Buffer TBS 10X

24.0 g Trizma base

88.0 g NaCl

\* Disolver en 900.0 ml de H<sub>2</sub>O

\* Ajustar pH: 7.6 y llevar hasta 1.0 L con H<sub>2</sub>O

### Buffer TBS-TT

15.0 ml TBS 10X

0.15 ml TRITÓN x-100

3.75 ml Tween 20 (10%)

\* Llevar hasta 150 ml con H<sub>2</sub>O

En tubo falcon de 50.0 ml, se prepararon 35.0 ml de solución de bloqueo al 5% (1.75 g de Leche Svelty) en buffer TBS-TT. Se colocó la membrana transferida en el tubo con la solución de bloqueo y se incubó a TA por una hora en agitación. Se desechó la solución de bloqueo y se lavó con buffer TBS-TT. Se disolvieron los anticuerpos primarios en buffer TBS-TT. Para Argonauta 1 anti-AGO1 (Agrisera; 1: 10 000); Argonauta 4 (Agrisera; 1: 1000) y HSP70 (Agrisera; 1:15 000). Se Incubó toda la noche en agitación a 4 °C. Se recuperó el anticuerpo primario y se lavó 3 veces en agitación a TA por 5 minutos con buffer TBS-TT. Se disolvió el Anticuerpo Secundario en buffer TBS-TT (HRP, 1:10 000) y se incubó en agitación por 1h a TA. Se recuperó el anticuerpo secundario y la membrana se enjuagó 3 veces en agitación a TA por 5 min con buffer TBS-TT.

Finalmente, la visualización se realizó utilizando el sustrato Luminata Classico Western HRP (Millipore) y con ayuda del software del ChemiDoc™ (BioRad), mediante un método de canales múltiples y secuencias de imágenes a lo largo de 20 min de exposición.

## Resultados

### Reconstrucción filogenética e identificación de homólogos en maíz para las familias de proteínas Dicer like, RNA polimerasas dependientes de RNA y Argonautas.

Con base a los modelos de secuencias de aminoácidos predichas a partir de transcritos, mapeados en el genoma de maíz para la variedad B73 (Maize B73 RefGen\_v3). Se identificaron 5, 6 y 24 secuencias de las familias DCL, RDR y AGO, respectivamente. En Arroz, se encontraron 8, 5 y 19 secuencias de DCL, RDR y AGO, respectivamente. Mientras que en *Arabidopsis thaliana*, se identificaron 4, 6 y 10 secuencias para la familia DCL, RDR y AGO, respectivamente. Tanto para arroz como para *Arabidopsis*, el número de secuencias proteicas coincide con las reportadas por Kapoor *et al.*, 2008 y Quian *et al.*, 2011. En la Tabla VI, se muestran todas las secuencias con su número de acceso, el identificador de ChromDB (si la secuencia obtuvo el mejor hit al realizar el BLAST del proteoma con las secuencias de ChromDB) y en el caso de maíz, la nomenclatura asignada según la reconstrucción filogenética de cada grupo.

Tabla VI. Secuencias de aminoácidos identificadas para las familias DCL, RDR y AGO en maíz, Arabidopsis y Arroz.						
Maíz			Arabidopsis		Arroz	
Nomenclatura	Id ChromDB.	Número de acceso	Nombre	Número de acceso	Nombre	Número de acceso
<b>DCL</b>						
ZmDCL1	DCL101	GRMZM2G040762_P01	AtDCL1	AT1G01040.2	OsDCL1	Q8LMR2.1
ZmDCL2a	DCL105	GRMZM2G301405_P01	AtDCL2	AT3G03300.1	OsDCL2a	Q10HL3.1
ZmDCL2b	-	GRMZM2G001631_P01	AtDCL3	AT3G43920.2	OsDCL2b	Q69LX2.2
ZmDCL3	DCL104	GRMZM5G814985_P01	AtDCL4	AT5G20320.1	OsDCL3a	Q5N870.1
ZmDCL5	DCL102	GRMZM2G413853_P01			OsDCL5	7XD96.2
					OsDCL4	A7LFZ6.1
					OsDCL_RTL2	Q6ATG6.2
					OsDCL_RTL3	Q69KJ0.1
<b>RDR</b>						

ZmRDR1	RDR104	GRMZM2G481730_P01	AtRDR1	AT1G14790.1	OsRDR_SHL2	Q8LHH9.1
ZmRDR2	RDR101	GRMZM2G042443_P01	AtRDR2	AT4G11130.1	OsRDR2	Q7XM31.1
ZmRDR3	RDR103	GRMZM2G327247_P01	AtRDR3	AT2G19910.1	OsRDR4	Q5QMN4.2
ZmRDR6a	-	GRMZM2G347931_P01	AtRDR4	AT2G19920.1	OsRDR1	Q0DXS3.2
ZmRDR6b	RDR102	GRMZM2G145201_P01	AtRDR5	AT2G19930.1	OsRDR3	Q5QMN5.2
ZmRDR6c	-	GRMZM2G357825_P01	AtRDR6	AT3G49500.1		
<b>AGO</b>						
ZmAGO1a	AGO117	GRMZM2G039455_P01	AtAGO1	AT1G48410.1	OsAGO1a	Q6EU14.1
ZmAGO1b	-	GRMZM2G404121_P01	AtAGO2	AT1G31280.1	OsAGO1b	Q7XSA2.3
ZmAGO1c	AGO113	GRMZM2G441583_P01	AtAGO3	AT1G31290.1	OsAGO1c	Q6K972.1
ZmAGO1d	AGO103	GRMZM2G361518_P01	AtAGO4	AT2G27040.1	OsAGO1d	Q5Z5B2.1
ZmAGO1e	AGO110	AC209206.3_FGP011	AtAGO5	AT2G27880.1	OsAGO2	Q7XTS4.2
ZmAGO1f	AGO106	GRMZM2G162525_P01	AtAGO6	AT2G32940.1	OsAGO3	Q7XTS3.2
ZmAGO2	AGO111	GRMZM2G007791_P01	AtAGO7	AT1G69440.1	OsAGO4a	Q9SDG8.1
ZmAGO3	AGO112	GRMZM2G354867_P01	AtAGO8	AT5G21030.1	OsAGO4b	Q0JF58.1
ZmAGO4a1	AGO105	GRMZM2G589579_P01	AtAGO9	AT5G21150.1	OsAGO14	Q6Z4F1.1
ZmAGO4a2	AGO119	GRMZM2G089743_P02	AtAGO10	AT5G43810.1	OsMEL1	Q851R2.1
ZmAGO4b	AGO104	GRMZM2G141818_P03			OsAGO13	Q852N2.1
ZmAGO5a	AGO108	GRMZM2G461936_P02			OsAGO6	Q6YSJ5.2
ZmAGO5b	AGO125	GRMZM2G059033_P01			OsAGO7	Q75HC2.2
ZmAGO5c	-	GRMZM2G123063_P01			OsPNH1	Q69VD5.1
ZmAGO6a	AGO121	GRMZM2G432075_P01			OsAGO17	Q6H6C3.1
ZmAGO6b	-	GRMZM2G347402_P01			OsAGO12	Q7Y001.2
ZmAGO7	AGO120	GRMZM5G892991_P01			OsAGO11	Q10F39.2
ZmAGO10a	AGO118	AC189879.3_FGP003			OsAGO18	Q69UP6.1
ZmAGO10b	AGO123	GRMZM2G079080_P02			OsAGO15	Q5NBN9.2
ZmAGO10c	AGO101	GRMZM2G079080_P01				
ZmAGO126	AGO126	GRMZM2G457370_P01				
ZmAGO128	-	GRMZM2G105250_P01				
ZmAGO130	-	GRMZM2G344781_P01				
ZmAGO132	-	GRMZM2G124948_P01				

Las secuencias de maíz mostradas en la Tabla VI fueron elegidas mediante varios criterios de exclusión. Primero, todas las secuencias del grupo DCL poseen al menos un Dominio Ribonucleasa III (RNasa III; PF00636), mientras que las secuencias obtenidas para la familia RDR, presentan el dominio RdRP (PF05183), y aquellas secuencias pertenecientes al grupo AGO presentan al menos el dominio PIWI y/o PAZ. Segundo, todas las secuencias poseen identidad (Id) mayor a 60 % con alguna de las secuencias obtenidas de ChromDB, excepto aquellas que no tienen una secuencia de ChromDB asignada, todas estas secuencias presentan Id mayor a 40 % a alguna secuencia de ChromDB. Finalmente, todas las secuencias tienen una longitud mayor al promedio de longitud de todas las secuencias que pertenecen a una de las tres familias de proteínas identificadas en ChromDB. Las secuencias mostradas en la Tabla VI, fueron utilizadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas más probables mediante un árbol consenso y los resultados se muestran en forma de un cladograma (Figura 24, 25 y 27). Se realizó un mapeo de las secuencias a lo largo del genoma de maíz para buscar su ubicación, el cual se resume en la tabla VII.

**Tabla VII. Ubicación cromosómica reportada**

ID Tham	Cromosoma	Posición		ID Tham	Cromosoma	Posición	
		Inicio	Fin			Inicio	Fin
ZmDCL1	1	4,600,841	4,608,248	ZmAGO3	10	141,823,070	141,828,449
ZmDCL2a	5	19,916,753	19,927,967	ZmAGO4a1	8	2,511,463	2,518,808
ZmDCL2b	5	19,939,913	19,945,652	ZmAGO4a2	3	43,646,012	43,657,336
ZmDCL3	3	164,408,916	164,418,189	ZmAGO4b	6	168,642,369	168,650,358
ZmDCL5	1	229,801,762	229,819,069	ZmAGO5a	5	13,611,800	13,618,698
ZmRDR1	5	205,385,818	205,389,710	ZmAGO5b	2	233,385,077	233,392,000
ZmRDR2	2	41,131,324	41,136,928	ZmAGO5c	5	4,001,278	4,009,529
ZmRDR3	2	107,947,589	107,933,315	ZmAGO6a	7	72,000,638	72,008,648
ZmRDR6a	9	106,302,354	106,306,175	ZmAGO6b	7	72,044,775	72,053,779
ZmRDR6b	3	102,532,883	102,536,036	ZmAGO7	1	75,636,094	75,640,439
ZmRDR6c	9	109,055,576	109,093,885	ZmAGO10a	9	87,408,375	87,414,276
ZmAGO1a	2	17,563,301	17,573,156	ZmAGO10b	6	103,286,236	103,293,200
ZmAGO1b	4	148,519,237	148,521,859	ZmAGO10c	6	103,286,236	103,293,200
ZmAGO1c	6	43,253,105	43,261,555	ZmAGO126	1	250,132,189	250,137,737
ZmAGO1d	5	64,791,077	64,796,881	ZmAGO128	2	199,510,528	199,516,085
ZmAGO1e	10	137,506,877	137,513,415	ZmAGO130	6	31,500,674	31,508,279
ZmAGO1f	8	134,439,555	134,444,960	ZmAGO132	2	212,189,102	212,192,131
ZmAGO2	2	9,973,816	9,981,340				

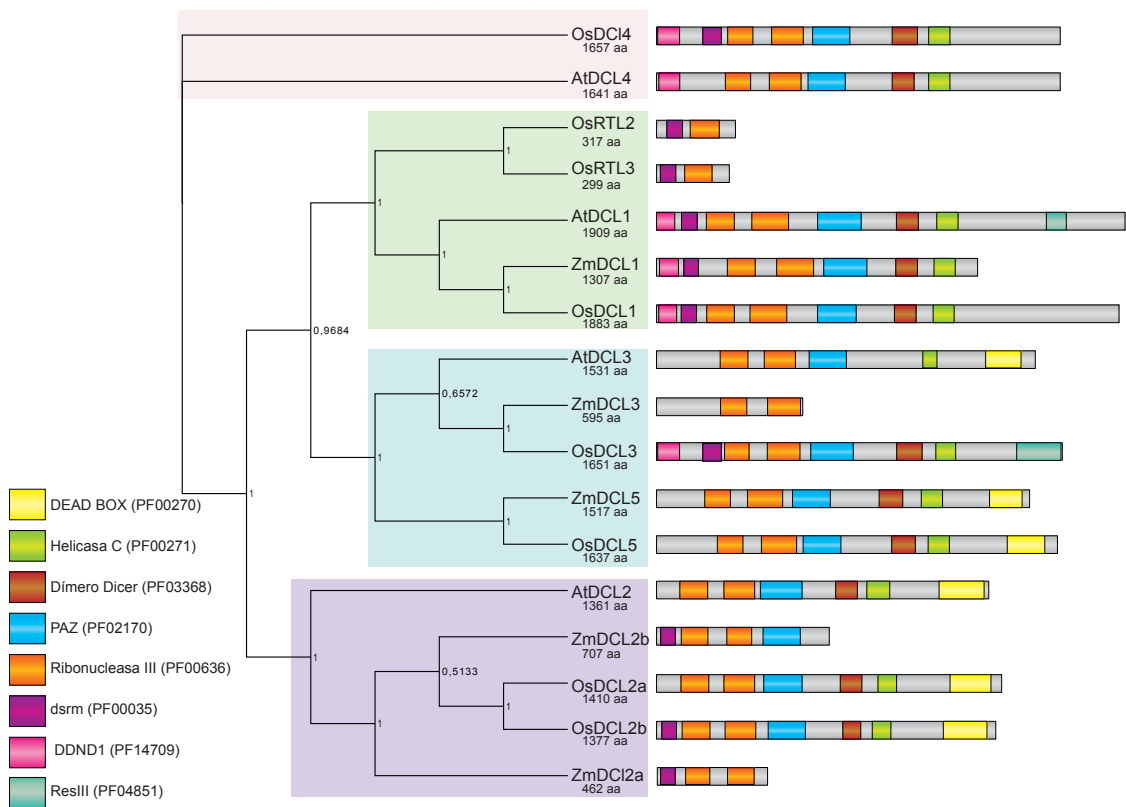
En cuanto a su posición en el genoma ZmDCL1 y 5, se localizan en el Cromosoma 1, mientras que ZmDCL2a/b mapean en el cromosoma 2, con posiciones extremadamente cercanas (ver tabla VII); ZmDCL3, se localiza en el cromosoma 3. La cercanía entre dos secuencias podría deberse a eventos de duplicación en tándem.



## Reconstrucción filogenética de las Proteínas Dicer like.

Para la reconstrucción del árbol consenso de la familia DCL se formaron 3 clados principales. Uno de los clados, agrupa las secuencias DCL4 de arroz y *Arabidopsis* (OsDCL4 y AtDCL4), el segundo clado agrupa las secuencias DCL2 de arroz y *Arabidopsis* (OsDCL2 y AtDCL2a/b), así como dos secuencias de maíz (ZmDCL2a/b).

La estructura del tercer clado resulta más compleja; presentando un primer nodo del cual surgen 2 ramificaciones: La primera comprende un subclado que agrupan las secuencias DCL1 de arroz, *Arabidopsis* (OsDCL1 y AtDCL1); una secuencia de maíz (ZmDCL1) y un grupo externo conformado por dos secuencias de arroz (OsRTL2 y 3). La segunda rama comprende dos subclados, en uno se agrupan las secuencias correspondientes a DCL3 de arroz y *Arabidopsis* (OsDCL3 y atDCL3) y una secuencia de maíz (ZmDCL3), mientras que el segundo subclado está conformado por OsDCL5 y una secuencia de maíz (ZmDCL5; Figura 24).



**Figura 24. Cladograma y dominios para la familia de proteínas Dicer like (DCL) en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*.** Los árboles consenso se realizaron mediante una inferencia Bayesiana de secuencias de aminoácidos mediante una simulación de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) en MrBayes v 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Las simulaciones se realizaron para  $1 \times 10^6$  generaciones y se descartaron el 25.0 % de los árboles obtenidos. Se utilizó el modelo de sustitución Jones Taylor Thornton y la estimación entre la tasa de variación entre los sitios se realizó acorde a una distribución gamma. Los valores de probabilidad (>50%) indican el soporte de los nodos. **(Derecha)** Estructura de las proteínas DCL en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Se muestran los dominios reconocidos por la base de datos Pfam con su número de acceso y la longitud de cada secuencia.

Como se mencionó anteriormente, las 5 secuencias encontradas para la familia DCL en maíz contienen 2 dominios Ribonucleasa 3 (PF00636) en tándem. ZmDCL1 y ZmDCL5, contienen la mayoría de los dominios característicos de una proteína DCL, un dominio para la actividad de helicasa (PF00270), el dominio PAZ (PF02170), un dominio de dimerización (PF02268) y algunos dominios para unión a dsRNAs (PF00270, PF00035 o PF14709). ZmDCL2a y 2b además de los dominios de RNasa III, presentan en su secuencia el dominio dsrm (PF00035) y el dominio PAZ, en el caso de ZmDCL2a. Finalmente la secuencia anotada correspondiente a ZmDCL3 acorde al análisis filogenético, sólo contiene los dominios RNasa III. Sin embargo, ZmDCL3 y ZmDCL2b parecen ser secuencias con anotación incompleta, debido al tamaño de las secuencias y el acomodo de sus dominios (Figura 24). Todas las secuencias analizadas mantienen una estructuración de dominios similar; el orden de los dominios a lo largo de la secuencia se conserva. Sólo OsDCL3 y AtDCL1, presentan el dominio ResIII (PF04851) en su extremo amino terminal.

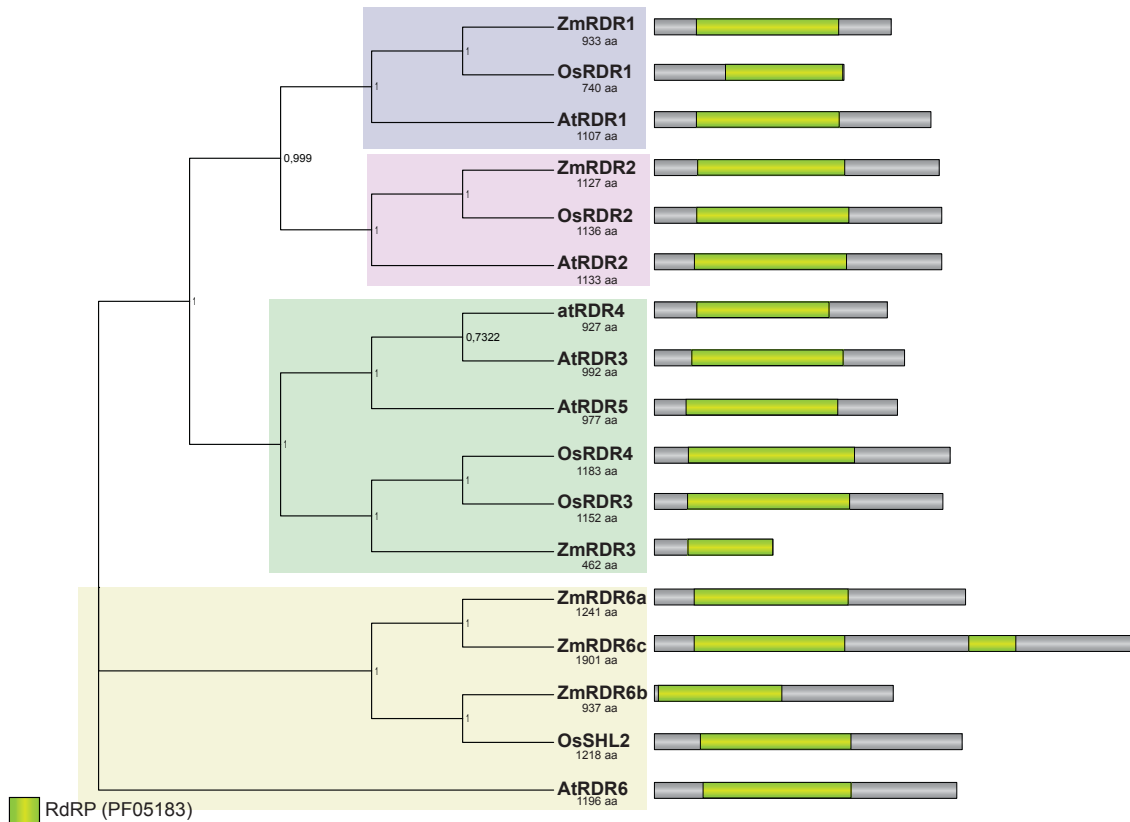
### **Reconstrucción filogenética de las Proteínas RNA polimerasas dependientes de RNA.**

En el árbol consenso obtenido para las secuencias de la familia de proteínas RDR; al igual que DCL, se forman tres clados principales. El primer clado nombrado RDR6, se encuentra conformado por AtRDR6 (Figura 25), una secuencia de arroz (OsSHL2) y tres secuencias de maíz (ZmRDR6a, b y c); formando un subclado con las secuencias de maíz y arroz y separadas por un nodo interno donde se encuentra atRDR6. El segundo clado, nombrado RDR3-5, agrupa las secuencias RDR3 y 4 de arroz y *Arabidopsis*, así como atRDR5 y una secuencia de maíz (ZmRDR3) la cual se encuentra dentro de un subclado conformado por las secuencias de arroz OsRDR3 y 4. Finalmente el tercer clado, forma dos subclados; en uno se agrupan RDR1 de arroz y *Arabidopsis*, así como una secuencia de maíz (ZmRDR1), en el segundo subclado se encuentran RDR2 de arroz y *Arabidopsis* y la secuencia ZmRDR2 de maíz (Figura 25).

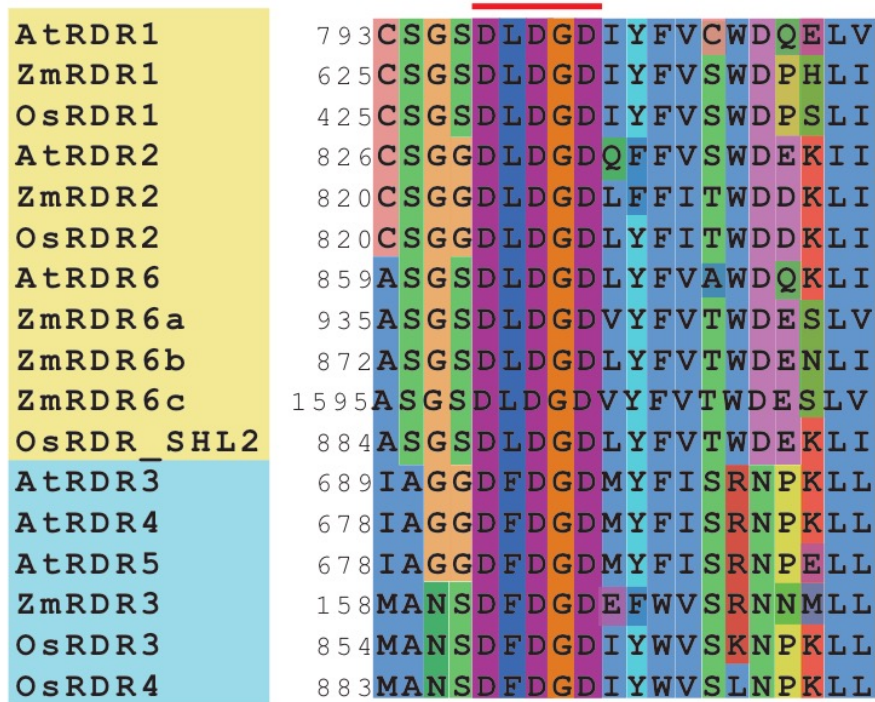
Todas las secuencias, poseen un dominio RdRP (PF05183), sólo RDR6c contiene un segundo dominio RdRP de menor longitud; sin embargo, ambos dominios así como los presentes en todas las secuencias analizadas tienen el motivo catalítico “ en el extremo C-terminal. Las secuencias dentro del clado RDR3-5, presentan el motivo “DFDGD” que contienen las RDRy caracterizadas en *Arabidopsis*; el resto de las secuencias (clado RDR6 y RDR1, 2) presentan el motivo “DLDGD” y agrupan a atRDR1, 2 y 6, que

pertencen al clado RDR $\alpha$  (Figura 26).

En cuanto a la localización de los genes correspondientes a las secuencias analizadas, ZmRDR2 y 3 se localizan en el cromosoma 2, ZmRDR6a y c, se localizan en posiciones muy cercanas en el cromosoma 9. ZmRDR 2 y 6b mapean en los cromosomas 5 y 3, respectivamente.



**Figura 25. Cladograma y dominios para la familia de proteínas RNA Polimerasas dependientes de RNA (RDRs) en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*.** Los árboles consenso se realizaron mediante una inferencia Bayesiana de secuencias de aminoácidos mediante una simulación de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) en MrBayes v 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Las simulaciones se realizaron para  $1 \times 10^6$  generaciones y se descartaron el 25.0 % de los árboles obtenidos. Se utilizó el modelo de sustitución Jones Taylor Thornton y la estimación entre la tasa de variación entre los sitio se realizó acorde a una distribución gamma. Los valores de probabilidad (>50%) Indican el soporte de los nodos. **(Derecha)** Estructura de las proteínas RDRs en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. Se muestran los dominios reconocidos por la base de datos Pfam con su número de acceso y la longitud de cada secuencia.



**Figura 26. Motivo catalítico en secuencias analizadas como miembros de la familia RDR de arroz, maíz y *Arabidopsis*.** Las secuencias AtRDR3, 4 y 5; Os RDR3 y 4; así como ZmRDR3, presentan el motivo "DFDGD". Las secuencias restantes presenta el motivo "DLGDIYFV". Alineamiento realizado mediante muscle (MUSCLE3.0). Visualización mediante seaview (versión 4.4.2).

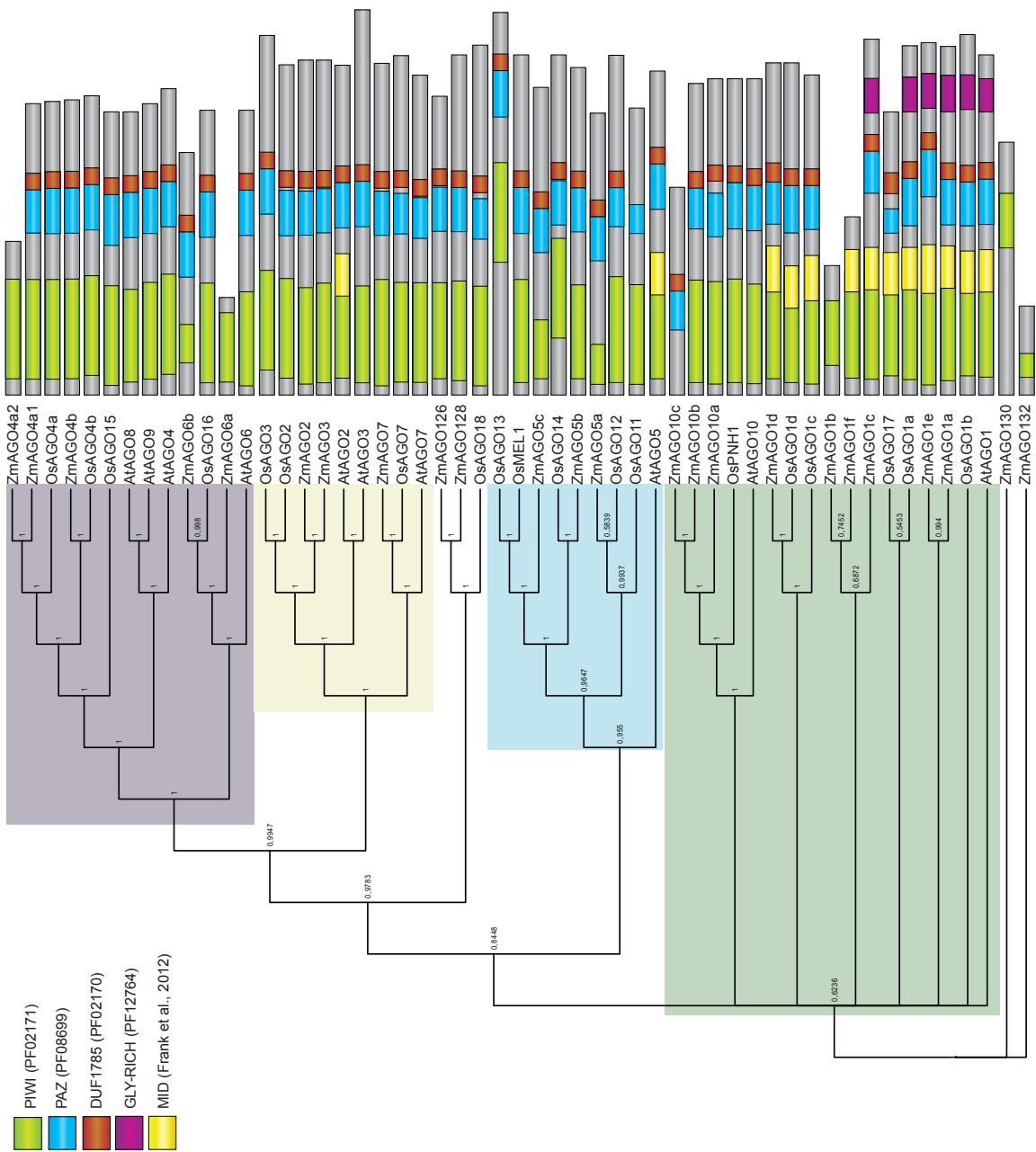
## Reconstrucción filogenética de las Proteínas Argonautas

La resolución del árbol consenso para las proteínas Argonautas en las tres especies analizadas es más compleja; al existir múltiples secuencias homólogas para algunas de las AGOs reportadas en *Arabidopsis*. De manera general se identificaron 10 secuencias de *Arabidopsis*, 19 y 24 secuencias de arroz y maíz; respectivamente. Se forman 4 clados principales. El clado AGO4/6/8/9, en el que se encuentran AtAGO4, 6, 8 y 9; OsAGO4a, b, 15 y 16; y tres secuencias de maíz nombradas ZmAGO4a1, a2 y b. El clado AGO2/3/7, conformado por AGO2, 3 y 7 *Arabidopsis* y arroz, así como por 3 secuencias de maíz (Figura 27). Dentro del clado AGO5 encontramos AtAGO5, 5 secuencias de arroz (OsAGO11, 12, 13, 14 y OsMEL1) y tres secuencias de maíz; mientras que el clado AGO1/10, se encuentra conformado por AtAGO1 y 10; OsAGO1a, 1b, 1c, 1d, 17 y OsPNH1; y 9 secuencias de maíz.

La asignación de nombre de las secuencias en maíz se realizó mediante las relaciones de ortología dentro de la reconstrucción filogenética. Dentro del clado AGO4/6/8/9, dos secuencias de maíz (ZmAGO4a1 y a2) parecen ser ortólogas de OsAGO4a, mientras

que ZmAGO4b se agrupa con OsAGO4b; las 5 secuencias forman un subclado (subclado AGO4) separadas de el resto de las secuencias agrupadas en este clado. ZmAGO6a y 6b, se agrupan dentro un subclado con AtAGO6 y OsAGO16, donde

**Figura 27. Cladograma y dominios para la familia de proteínas Argonautas (AGOs) en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*.** Los árboles consenso se realizaron mediante una inferencia Bayesiana de secuencias de aminoácidos mediante una simulación de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) en MrBayes v 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Las simulaciones se realizaron para  $1 \times 10^6$  generaciones y se descartaron el 25.0 % de los árboles obtenidos. Se utilizó el modelo de sustitución Jones Taylor Thornton y la estimación entre la tasa de variación entre los sitio se realizó acorde a una distribución gamma. Los valores de probabilidad (>50%) Indican el soporte de los nodos. **(Derecha)** Estructura de las proteínas AGOs en *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Se muestran los dominios reconocidos por la base de datos Pfam con su número de acceso y la longitud de cada secuencia.



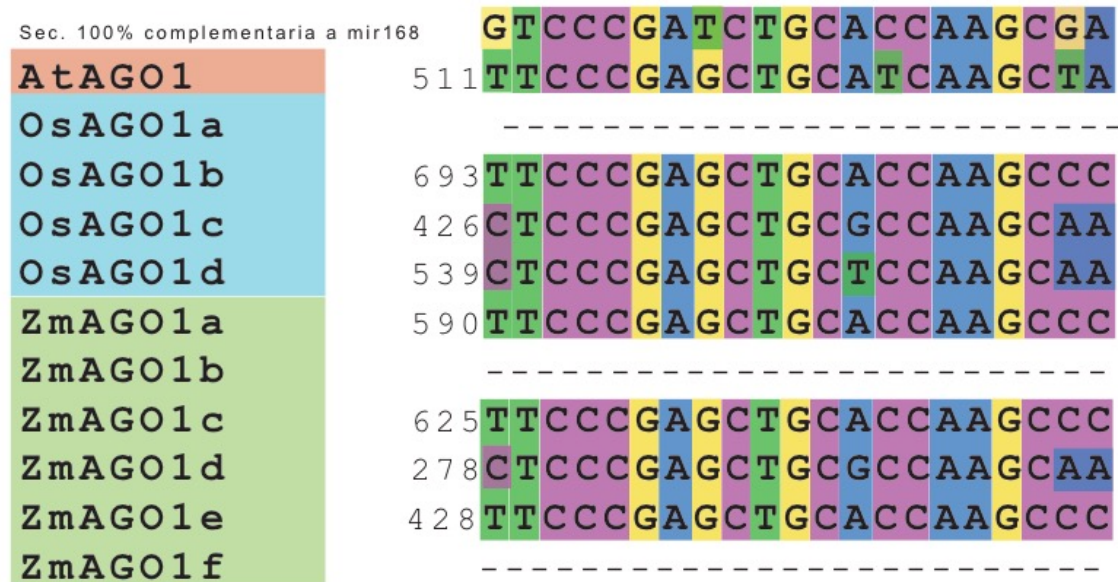
ZmAGO6b se encuentra más cercana filogenéticamente con OsAGO16. Finalmente, el clado AGO4/6/8/9, forma un tercer subclado conformado por AtAGO4, 8 y 9, y un grupo externo formado por OsAGO15. No se encontró una relación de ortología para ninguna secuencia de maíz con AtAGO8 y 9, todas las secuencias encontradas parecen ser más cercanas a AtAGO4 y AtAGO6 (Figura 27).

Casi todas las secuencias dentro del clado AGO4/6/8/9, presentan los motivos característicos de las proteínas AGOs; solamente ZmAGO4a2 y ZmAGO6a carecen de los dominios PAZ y DUF1785, presentando el dominio PIWI pero una longitud de secuencia muy por debajo de todos los miembros del clado (Figura 27).

En el clado AGO1/10, se agrupan la mayoría de las secuencias, conformando un subclado (subclado AGO10); donde se encuentran ZmAGO10a, 10b y 10c, todas ellas ortólogas a AtAGO10. ZmAGO10b y 10c, se originan de un mismo gen ubicado en el cromosoma 6, sin embargo el procesamiento del transcrito da como resultado dos productos proteicos distintos mediante variaciones durante el splicing de los intrones. Interesantemente, ZmAGO10c es la única secuencia analizada que carece del dominio PIWI. El resto de las secuencias del subclado AGO10 muestran todos los dominios funcionales correspondientes a una proteína AGO. El subclado AGO1 agrupa a ZmAGO1a, 1b, 1c, 1d, 1e y 1f en algunos casos, las relaciones de ortología son claras (ZmAGO1d y OsAGO1d; Figura 27), no obstante maíz presenta el mayor número de secuencias dentro de este subclado. Con el fin de determinar cuáles secuencias clasificadas como AGO1 presentaban mayor identidad con AtAGO1, se realizó un alineamiento de todas las secuencias del grupo AGO1 de maíz y *Arabidopsis*. Se encontró que la mayor similitud con AtAGO1 la presenta la secuencia ZmAGO1a, con una identidad del 79.45% (e-value=0). De las 6 secuencias de maíz, ZmAGO1b y ZmAGO1f parecen ser secuencias incompletas y poseen sólo el dominio PIWI, mientras que ZmAGO1a, 1c y 1e, presentan los dominios PIWI, PAZ y DUF1785 y un dominio rico en glicina (GLY-RICH; Figura 27). Asimismo, todas las secuencias dentro del subclado AGO1 (excepto ZmAGO1b) presentan el dominio MID caracterizado en AtAGO1.

Dado que el transcrito de AtAGO1 se encuentra regulado por miR168, mediante un alineamiento múltiple, se buscó el sitio complementario a miR168 en la secuencia nucleotídica de los transcritos dentro del subclado AGO1. Se encontró que 2 secuencias de maíz (ZmAGO1b y 1f) y OsAGO1a no contienen el sitio dentro de su secuencia, mientras que el resto de las secuencias parecen tener el sitio. El apareamiento entre los transcritos analizados y miR168 (zma-miR168a-5p;3 MIMAT0001726), tendría algunos

desapareamientos en las regiones terminales del sitio, así como en el nucleótido número 8, donde todas las secuencias presentan una Guanina (G) no complementaria con la adenina presente en miR168 (Figura 28).



**Figura 28. Secuencia del sitio de unión de miR168 en los transcritos del subclado AGO1.** Se muestra la secuencia con complementariedad perfecta con miR168 (arriba); y la presencia o ausencia de la secuencia en cada transcrito analizado. Alineamiento realizado mediante MUSCLE (MUSCLE3.0). Visualización mediante seaview (versión 4.4.2),

Por otro lado, dentro del subclado AGO5, se encuentran agrupadas ZmAGO5a, 5b y 5c; todas las secuencias dentro de este grupo presentan los dominios funcionales. *ZmAGO5a* y *5c* se encuentran en posiciones cercanas en el cromosoma 5, mientras que *ZmAGO5b* está en el cromosoma 2. El clado AGO2/3/7, contiene una secuencias de maíz ortólogas a AtAGO2, 3 y 7 (*ZmAGO2*, 3 y 7, respectivamente); tres secuencias de maíz presentan mayor identidad con sus ortólogos de arroz que con los presentes en *Arabidopsis*. Todo el clado muestra una gran homogeneidad en la presencia y posicionamiento de los dominios funcionales dentro de la secuencia.

Cabe hacer notar, que el acomodo de los dominios en todas las secuencias analizadas es el mismo, comenzando en el extremo amino terminal se encuentra el dominio GLY-RICH (en el caso de los miembros del subclado AGO1), después se encuentra el dominio DUF1785 seguido de inmediato del dominio PAZ; en el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio PIWI, para el caso del subclado AGO1, se muestra el dominio MID, obtenido mediante un alineamiento múltiple de las secuencias y ubicando el fragmento de secuencia reportado en los datos de la cristalografía de rayos X del dominio MID de AtAGO1 por Frank *et al.*, 2012.

Finalmente, mediante un alineamiento de las secuencias del subclado AGO1, se buscaron aminoácidos que al ser mutados en atAGO1, resultan en defectos en la actividad y/o plegamiento de la proteína, reportados previamente por Poulsen *et al.*, 2013.

Se analizó un segmento de aminoácidos a lo largo de todas las secuencias, los resultados muestran que ZmAGO1b y 1f no presentan algunos de los sitios y en el alineamiento se ven reflejados como gaps. ZmAGO1e presenta el único cambio de aminoácido en todas las secuencias analizadas en el sitio P840, donde la prolina es sustituida por isoleucina. Se analizaron 3 aminoácidos en sitios fuera de los dominios, L573, P527 y G579 se encuentran en la secuencia entre el dominio MID y PAZ, nombrada como región conectiva 2 (L2), la cual parece ser importante para el correcto plegamiento de los dominios adyacentes (Tabla VIII).

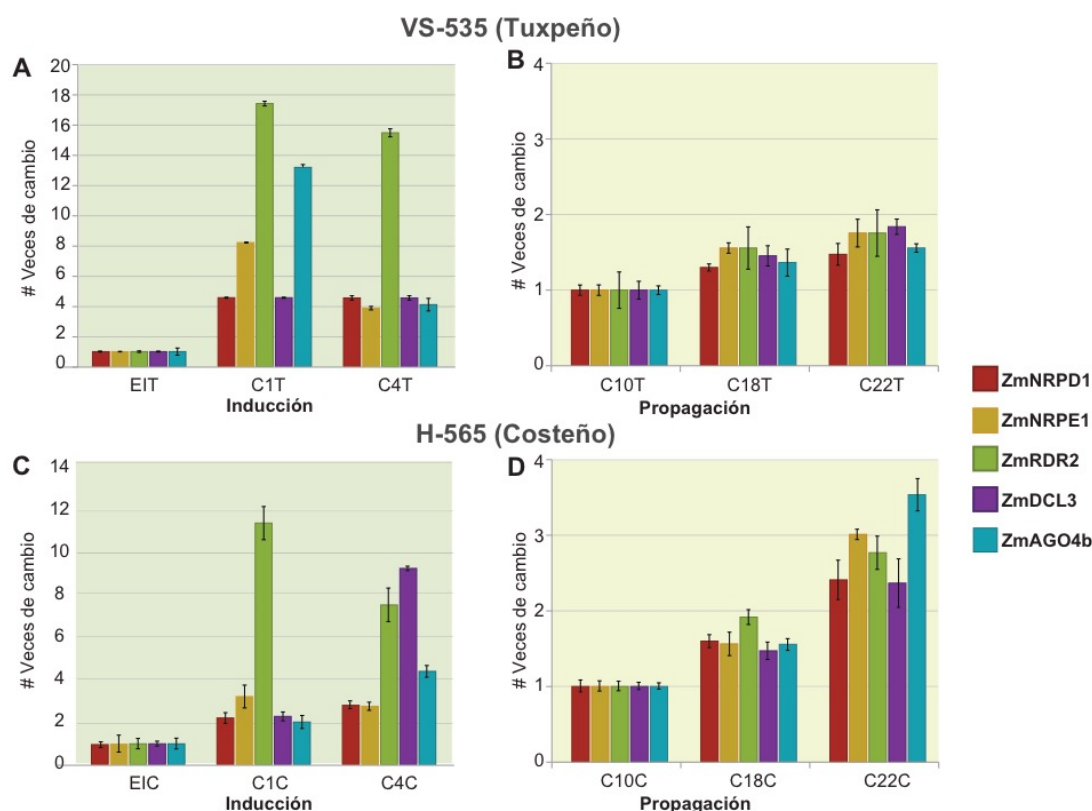
	H765	P493	L573	G760	P840	A994	G735	G186	G793	P481	P527	G579	G601	G692
AtAGO1	H765	P493	L573	G760	P840	A994	G735	G186	G793	P481	P527	G579	G601	G692
ZmAGO1a	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
ZmAGO1b	-	-	-	-	P	A	G	-	G	-	P	G	G	G
ZmAGO1c	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
ZmAGO1d	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
ZmAGO1e	H	P	L	G	I	A	G	G	G	P	P	G	G	G
ZmAGO1f	H	-	L	G	P	A	G	-	G	-	P	G	G	G
OsAGO1a	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
OsaGO1b	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
OsAGO1c	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
OsAGO1d	H	P	L	G	P	A	G	G	G	P	P	G	G	G
Dominio	Piwi	PAZ	L2	Piwi	Piwi	Piwi	MID	N coil	Piwi	PAZ	L2	L2	MID	MID
Cambio de aa podría afectar:	1	2	3	4	5	3	3	6	3	2	6	3	7	8
1: Actividad de corte Strong (Kidner & Martienssen, 2004) 2: Plegamiento Dominio PAZ (Sorin <i>et al.</i> , 2005) 3: Interface entre dominio MID-PIWI ( Fagard <i>et al.</i> , 2000) 4: Plegamiento del dominio Piwi (Morel <i>et al.</i> , 2002) 5: Posible bolsillo de Trp (Morel <i>et al.</i> , 2002) 6: Estructura del extremo N-terminal (Poulsen <i>et al.</i> , 2013) 7: Interfase entre el dominio MID-L2 (Poulsen <i>et al.</i> , 2013) 8: Unión de extremo 5' de RNA (Poulsen <i>et al.</i> , 2013)														

**Tabla VIII Consevación de aminoácidos importantes identificados en atAGO1 en el subclado AGO1.** Se muestran 14 aminoácidos importantes identificados mediante genética reversa en atAGO1 y su conservación en las distintas secuencias AGO1 encontradas en arroz y maíz. Arriba, se muestra el aminoácido y la posición en atAGO1. Debajo de las secuencias, se muestra el dominio al cual pertenece el aminoácido y con números del 1-8, se identifica la actividad que puede ser afectada al haber una mutación puntual en el sitio. Al lado del código de funciones entre paréntesis, se observa la referencia donde se identificó y caracterizó la mutación. Alineamiento realizado mediante MUSCLE (MUSCLE3.0) visualización mediante seaview. Las referencias fueron tomadas de Poulsen *et al.*, 2013.



## Evaluación de niveles de acumulación de transcritos mediante RT-qPCR.

### Expresión de los componentes de la maquinaria de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.



**Figura 29. Expresión de la maquinaria de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.** Expresión relativa de genes relacionados con RdDM mediante qRT-PCR durante la inducción (A y C) y propagación (B y D) de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño (A y B) y Costeño (C y D). Los valores de expresión representan el promedio de 3 réplicas técnicas y se muestra la desviación estándar entre las réplicas. Asimismo, los valores de expresión fueron normalizados por 18S y Embrión Inmaduro (EI) en los lotes de inducción; mientras que por 18S y callos de 10 meses (C10) en los lotes de propagación. Se analizaron muestras de EI, callos de 1 mes (C1); 4 meses (C4); 10 meses (C10); 18 meses (C18) y 22 meses (C22).

El primer paso en la vía de biogénesis de hc-siRNAs es la transcripción de DNA de regiones repetidas normalmente heterocromáticas por la NRPD1. La expresión de *NRPD1* parece aumentar una vez que se lleva a cabo la inducción de callos embriogénicos (C1) y su expresión se mantiene al menos hasta los cuatro meses de subcultivo (C4) en las dos replicas biológicas, no obstante la magnitud del aumento en la expresión es mayor en la variedad Tuxpeño (lotes de inducción; Figura 29-A y 29-C). Durante la propagación de callos embriogénicos de maíz, *NRPD1* aumenta ligeramente

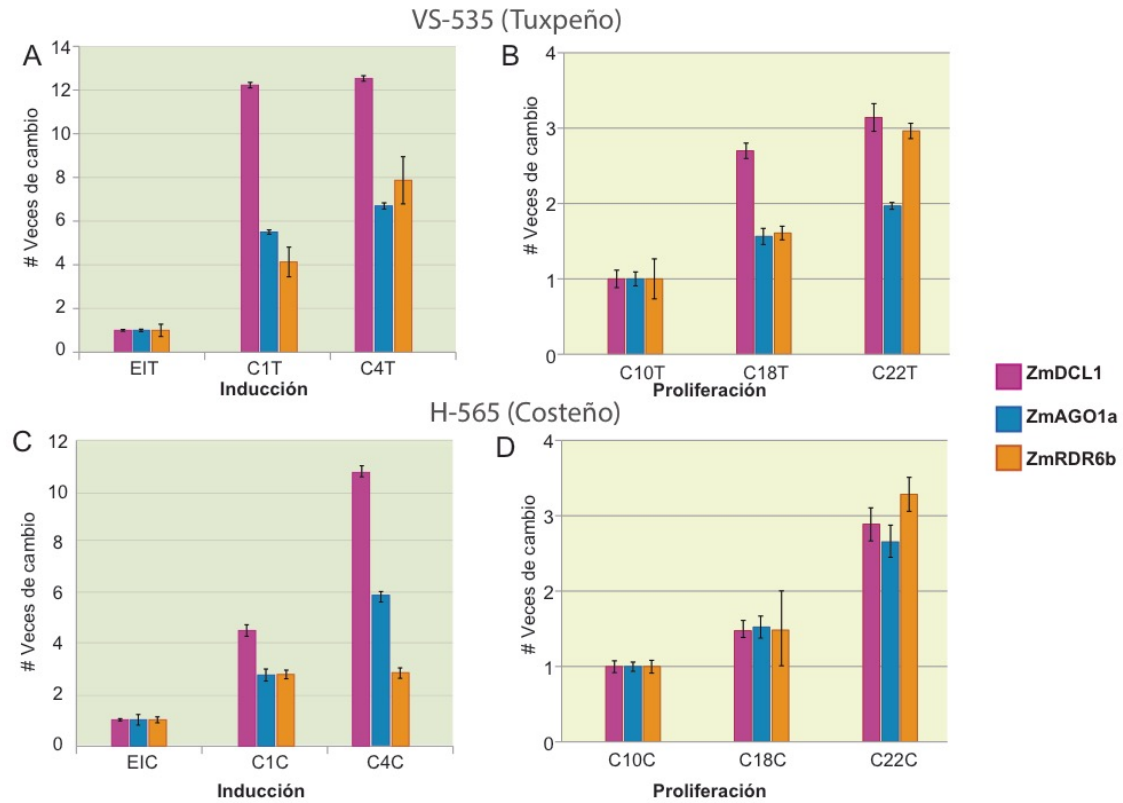
conforme aumenta el tiempo de propagación en la variedad Tuxpeño. En el lote de propagación del maíz híbrido Costeño se observa el mismo patrón de expresión, no obstante, la magnitud del aumento en la expresión en C18 y C22 es mayor comparada con el lote de propagación de Tuxpeño (Figura 29-B y 29-D). El patrón de expresión de *NRPE1* y *ZmRDR2* es el mismo, durante la inducción hay un aumento mientras que en C4 los niveles de transcritos disminuyen sin llegar al nivel basal observado en EI (Figura 29-A y 29-C). Durante la propagación ambos transcritos aumentan en C18 y C22. No obstante, las veces de cambio son menores comparadas con los cambios observados durante la inducción.

*ZmRDR2*, presenta los mayores cambios durante la inducción, la magnitud del aumento de expresión es de 17 y 15 veces de cambio (en C1 y C4, respectivamente) comparado con la expresión en EI del lote de maíz Tuxpeño, y de 11 y 7 veces de cambio (en C1 y C4, respectivamente) en el lote de Costeño. Representando el cambio más dramático de toda la maquinaria de RdDM. A su vez, los cambios en la expresión son menores en el lote de inducción de maíz Costeño comparado con el lote de inducción de Tuxpeño y en los lotes de propagación la relación es inversa (los cambios son mayores en Costeño comparado con Tuxpeño).

Existe reproducibilidad entre las réplicas biológicas (genotipo Tuxpeño y Costeño) para la mayor parte de los transcritos. Solamente *ZmDCL3* y *ZmAGO4b* en los lotes de inducción presentan patrones de expresión contrarios en C4 (Figura 29-C). *ZmAGO4b* aumenta considerablemente en C1 (13 veces de cambio, comparado con EI) para disminuir su expresión en C4 de maíz Tuxpeño; en tanto que el lote de inducción de Costeño *ZmAGO4b* presenta un aumento gradual en C1 y C4. La expresión de *ZmDCL3* y *ZmAGO4b* en los lotes de propagación es reproducible, pero las veces de cambio son mayores en el genotipo Costeño: *ZmDCL3* y *ZmAGO4b* aumentan progresivamente a partir de los 10 meses de subcultivo.

De manera general, existe un aumento gradual en la expresión de la maquinaria relacionada con la vía RdDM durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz. El mayor aumento en la expresión se obtuvo en los lotes de inducción, los cambios en la expresión en los lotes de propagación son de una magnitud no mayor a 3 veces de cambio, mientras que en los lotes de inducción pueden alcanzar hasta 18 veces. Así mismo, el aumento en la expresión es mayor en el lote de maíz Tuxpeño comparado con Costeño durante la inducción, mientras que en la propagación, los mayores cambios se observan en el lote de maíz Costeño.

## Expresión de los componentes de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de miRNAs durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.



**Figura 30. Expresión de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de miRNAs durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.** Expresión relativa de genes relacionados con la vía de regulación mediada por miRNAs mediante qRT-PCR durante la inducción (A y C) y propagación (B y D) de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño (A y B) y Costeño (C y D). Los valores de expresión representan el promedio de 3 réplicas técnicas y se muestra la desviación estándar entre las réplicas. Asimismo, los valores de expresión fueron normalizados por 18S y Embrión Inmaduro (EI) en los lotes de inducción; mientras que por 18S y callos de 10 meses (C10) en los lotes de propagación. Se analizaron muestras de EI, callos de 1 mes (C1); 4 meses (C4); 10 meses (C10); 18 meses (C18) y 22 meses (C22).

Se analizó la expresión de dos genes de la vía de regulación por miRNAs: *ZmDCL1* y *ZmAGO1a*. Así como uno de los tres transcritos pertenecientes a los genes del subclado RDR6, *ZmRDR6b*. Se incluyó un parálogo de *atRDR6*, dada su participación en diversas vías de regulación mediadas por sRNAs y se eligió a *ZmRDR6b*, al ser el único transcrito en el que se obtuvo una curva de calibración dentro del rango aceptable. En los tres transcritos (*ZmDCL1*, *ZmAGO1a* y *ZmRDR6b*) se observa un aumento progresivo de su expresión durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz. En los lotes de inducción *ZmDCL1* representa los cambios más dramáticos (12 veces de cambio en C1 y C4 de maíz Tuxpeño; Figura 30-A). Sin embargo, el patrón de

cambio entre el lote de inducción de maíz Tuxpeño y Costeño difiere: en Costeño, *ZmDCL1* aumenta 4 veces en C1 y en C4 se observa un segundo aumento (hasta 10 veces; Figura 30-C); mientras que en el lote de inducción de Tuxpeño, se observa un aumento de 12 veces en C1 y se mantiene en C4. El patrón de expresión de *ZmDCL1* durante la proliferación en las réplicas biológicas es reproducible, y en ambos genotipos, los cambios en la expresión son menores si se comparan con los cambios observados durante la inducción.

De los 4 genes candidatos dentro del subclado AGO1 (*ZmAGO1a/c/d/e*), sólo se logró obtener una curva de calibración para el transcrito de *ZmAGO1a*. Debido a la obtención de más de un pico de amplificación en las curvas de calibración. La expresión de *ZmAGO1a* es reproducible en ambas réplicas biológicas y, tanto en la inducción como en la proliferación de callos embriogénicos de maíz, existe un aumento gradual de la expresión de *ZmAGO1a*, teniendo los mayores niveles de expresión en C4 y C22 (Figura 30-B e 30-D). Al igual que en todos los transcritos analizados, las veces de cambio son mayores en los lotes de inducción que en los de propagación. Y durante la inducción, los cambios son mayores en el lote de maíz Tuxpeño comparado con el lote de maíz Costeño.

Finalmente, la expresión de *ZmRDR6b* durante la inducción de callos embriogénicos de maíz difieren entre las réplicas biológicas: En ambos lotes, se observa un aumento en la expresión en C1. No obstante en C4 de callos de maíz Tuxpeño, *ZmRDR6b* aumenta su expresión hasta 8 veces mientras que en el lote de Costeño se mantiene igual que en C1 (3 veces de cambio en C1 y C4; Figura 30-C). Durante la propagación, ambas réplicas biológicas muestran el mismo patrón de expresión: *ZmRDR6b* aumenta a partir de los 10 meses y hasta los 22 meses de subcultivo. Cabe hacer notar que la cuantificación menos precisa de todos los transcritos analizados en todos los tiempos de subcultivo, corresponde a *ZmRDR6b* en callos de 18 meses de maíz Costeño (Figura 30-D), presentando un valor de desviación estándar mucho más grande.

En general, la maquinaria analizada relacionada con miRNAs aumenta su expresión durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz, teniendo los mayores cambios durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. Durante la propagación, las veces de cambio en ambos genotipos son muy parecidas y menores que durante la inducción de callos embriogénicos de maíz.

## Niveles de proteínas involucradas en la biogénesis de sRNAs.

Se realizó el análisis semicuantitativo de los niveles de acumulación de proteínas Argonautas mediante una inmunoréplica tipo Western. Dado que no existen anticuerpos específicos para las proteínas de maíz, se utilizaron 2 anticuerpos para 2 proteínas argonautas de *Arabidopsis*; anti-atAGO1, anti-atAGO4. Se evaluaron los niveles de HSP70 para normalizar el cargado de proteína (anti-HSP70).

Se utilizaron extractos totales de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de crecimiento en cajas petri (bajo condiciones día largo) como control y extractos de proteína total de ejes de maíz Chalqueño de 12 h de germinación como un estado de diferenciación alternativo al modelo estudiado. Por el mismo método se obtuvieron los extractos de embriones inmaduros y callos embriogénicos de 1, 4, 10, 18 y 22 meses de subcultivo (se utilizaron 40 µg de extracto total de cada muestra).

Al inicio de los ensayos, se tuvieron problemas relacionados con la degradación de las proteínas. Las proteínas Argonautas resultaron ser muy inestables ya que fácilmente se degradan. Por lo que al buffer de extracción se le adicionó un potente inhibidor de proteosoma (MG-132). Una vez realizada la extracción de proteínas utilizando este inhibidor, fue posible detectar la banda de AGO reportada para *Arabidopsis*. Sin embargo, aun con el inhibidor se pueden observar bandas en el carril del control de menor tamaño al esperado, sugiriendo la presencia de fragmentos de degradación de AGO1 o de alguna inespecificidad debida al anticuerpo (Figura 31).

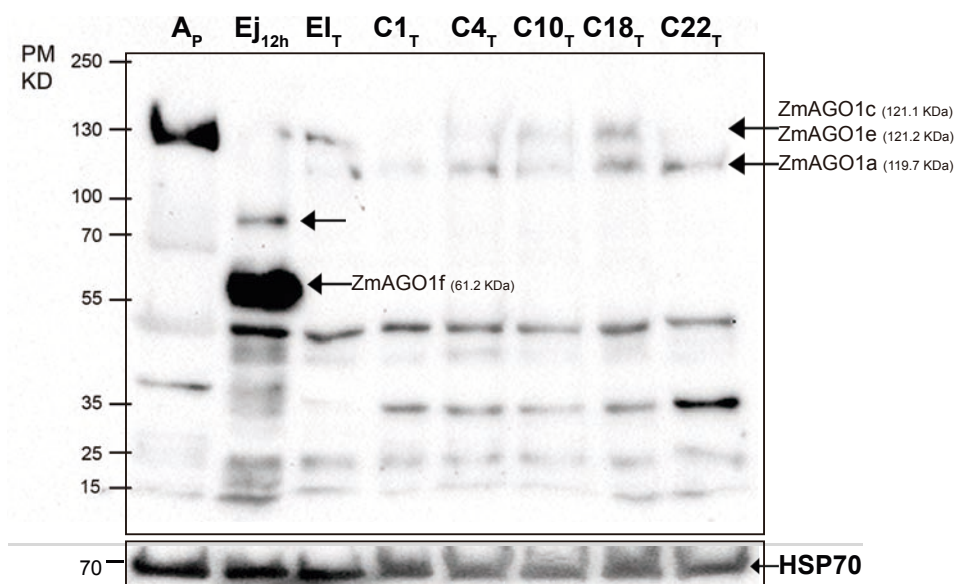
**Tabla IX. Pesos moleculares esperados para las proteínas AGO1 de maíz.** Se muestra el identificador (id) utilizado para cada proteína, la longitud de las secuencias y el peso molecular aproximado en KD. El peso molecular se calculó utilizando el software ExPASy Compute PI/Mw (Gasteiger *et al.*, 2005)

Id	Proteína	No. AA	Peso molecular (KDa)
a	ZmAGO1a	1078	119.7
b	ZmAGO1b	397	44.3
c	ZmAGO1c	1102	121.1
d	ZmAGO1d	941	103.8
e	ZmAGO1e	1092	121.2
f	ZmAGO1f	554	61.9

En el Western blot correspondiente a las muestras de maíz Tuxpeño, se detectaron una serie de bandas, de las cuales algunas corresponden a los pesos moleculares esperados para las proteínas AGO1 de maíz (ZmAGO1a-f; Tabla IX).

Desafortunadamente no se puede tener la seguridad de cual banda corresponde a una ZmAGO1 específica, por lo que se eligieron dos bandas como presuntas ZmAGO1. Justo por debajo de 130 KD se encontró una banda que podría corresponder a ZmAGO1c o ZmAGO1e (Figura 31), banda que se presenta con variaciones en la intensidad en los diferentes carriles. La segunda banda candidata se encontró por encima de los 100 KDa y la cual podría corresponder a ZmAGO1a, también se observan variaciones en la intensidad de esa banda en los diferentes tejidos y tiempos de subcultivo analizados.

De manera interesante, se encontró una banda que podría corresponder a ZmAGO1f, por debajo de 70 KD y por encima de los 55KD en el carril correspondiente a ejes de 12 h de germinación y dicha banda no se encuentra presente en ningun otro tejido. Así mismo en este mismo tejido se observa una banda por encima de los 70KD, sin embargo su

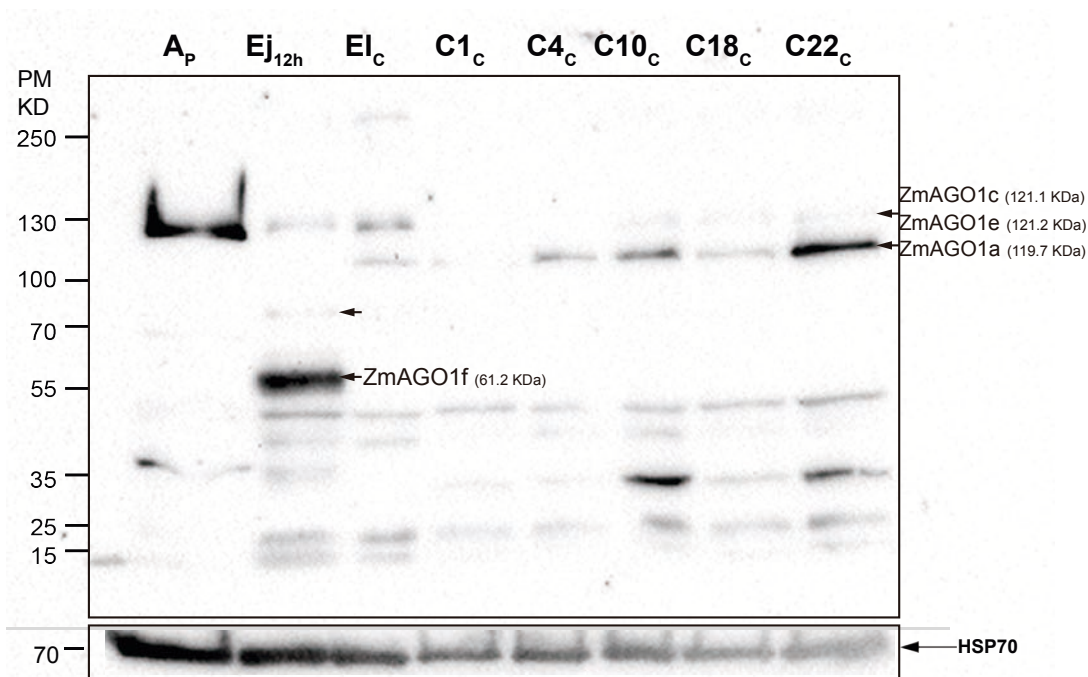


**Figura 31. Acumulación de AGO1 durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.** Western Blot utilizando 40 µg de proteína (A<sub>p</sub>: Plántulas de *Arabidopsis* 15 días; E<sub>J</sub><sub>12h</sub>: Ejes de maíz con 12 h de germinación; E<sub>I</sub>: Embrión inmaduro; Callos embriogénicos de 1 (C1), 4 (C4), 10 (C10), 18 (C18) y 22 (C22) meses de subcultivo. El subíndice "T" indica que las muestras corresponden a maíz variedad Tuxpeño (VS-535). Las proteínas fueron separadas por un gel SDS-PAGE al 7% y transferidos a membranas de PVDF. Las Membranas fueron bloqueadas 1 h con 5% de leche baja en grasa en buffer TBS-TT. El ensayo fue realizado por duplicado utilizando anti-AGO1 (1:10, 000) en buffer TBS-TT. Sin embargo sólo se muestra una réplica técnica. Se utilizó anti-HSP70 como control constitutivo.

tamaño no corresponde al predicho para las ZmAGO1 de maíz. Las bandas observadas por debajo de 55 KDa se consideraron como productos de degradación, puesto que lo patrones de bandeo son iguales a los obtenidos cuando no se utilizó MG-132 y también se encuentran presentes en el carril de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. No obstante, no se pueden descartar que se trate de inespecificidad del anticuerpo, ya que los no

habían sido probados en maíz. Los resultados mostrados aquí resultan de gran importancia puesto que sugieren un método para la identificación de proteínas argonautas en maíz. Aunque con la presencia de las otras bandas es difícil establecer conclusiones.

En cuanto a las muestras de maíz Costeño, se detectaron los mismos patrones de de bandas detectadas con el anticuerpo para AtAGO1 en el maíz Tuxpeño (sin embargo, la intensidad de las bandas es diferente; Figura 32), se tomaron las mismas bandas candidatas (ZmAGO1c, ZmAGO1e y ZmAGO1a).



**Figura 32. Acumulación de AGO1 durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz Costeño.** Western Blot utilizando 40 µg de proteína (A<sub>p</sub>: Plántulas de Arabidopsis 15 días; E<sub>j</sub><sub>12h</sub>: Ejes de maíz con 12 h de germinación; E<sub>i</sub>: Embrión inmaduro; Callos embriogénicos de 1 (C1), 4 (C4), 10 (C10), 18 (C18) y 22 (C22) meses de subcultivo. El subíndice "C" indica que las muestras corresponden a maíz híbrido Costeño (H-565). Las proteínas fueron separadas por un gel SDS-PAGE al 7% y transferidos a membranas de PVDF. Las Membranas fueron bloqueadas 1 h con 5% de leche baja en grasa en buffer TBS-TT. El ensayo fue realizado por duplicado utilizando anti-AGO1 (1:10, 000) en buffer TBS-TT. Sin embargo sólo se muestra una réplica técnica. Se utilizó anti-HSP70 como control constitutivo.

Para facilitar el análisis de estos resultados, se realizaron densitometrías de las dos bandas candidatas en todos los tejidos de maíz analizados. Los valores de intensidad se normalizaron mediante la sustracción del fondo, el área de cada banda y la intensidad de la banda obtenida para HSP70 como control constitutivo. Se realizaron análisis por separado de los lotes de inducción y proliferación, normalizando por el valor obtenido en Embriones inmaduros (lotes de inducción) y callos de 10 meses (lotes de propagación) y de esta manera analizar las veces de cambio.

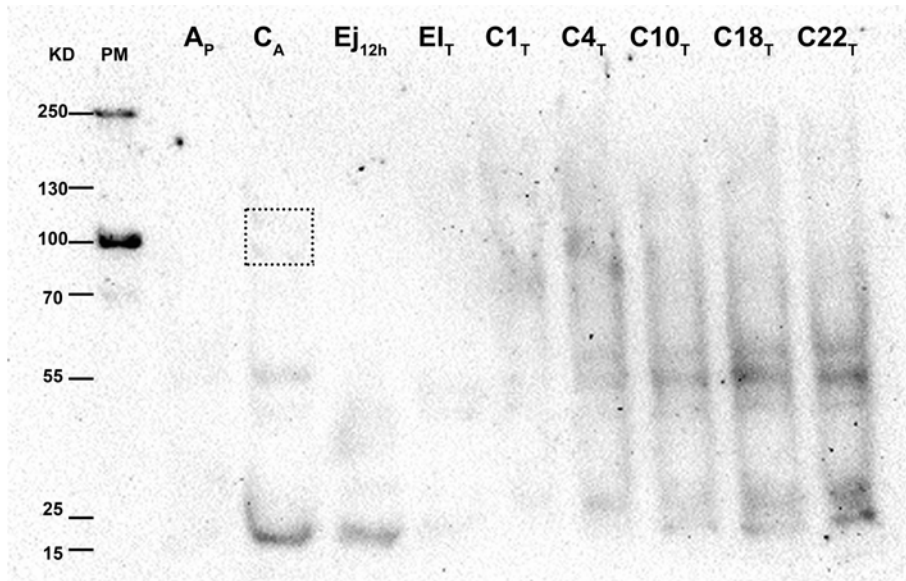
Resultaban particularmente interesantes las bandas con pesos mayores a 100 KDa puesto que en los análisis de los dominios funcionales de las secuencias de maíz, se predijo que 4 secuencias del clado AGO1 (ZmAGO1a, ZmAGO1c, ZmAGO1d y ZmAGO1e) contaban con todos los dominios y podrían ser funcionales. La banda correspondiente presuntamente a ZmAGO1c y/o ZmAGO1e se encuentra ausente en C1 y C4 meses después de la inducción de los embriones inmaduros para ambos genotipos de maíz. En cuanto a la banda que podría corresponder a ZmAGO1a, los patrones entre ambos lotes de inducción son diferentes, en el lote de maíz Tuxpeño se observa en C1 con un ligero aumento; en el lote de maíz Costeño está ausente en C1. Sin embargo en ambos lotes existe un aumento considerable en C4. Para los lotes de propagación se tienen resultados contradictorios entre lotes. En el maíz Tuxpeño, hay un aumento en los niveles de ambas proteínas en C18 seguido de una disminución en C22; mientras que en el maíz Costeño hay una disminución en C18 y un ligero aumento en C22. Solamente en C22 del lote de Tuxpeño, la banda correspondiente a ZmAGO1c/e se encuentra ausente.

De manera general podemos observar que existen cambios en la acumulación de proteínas identificadas por anti-AtAGO1 que corresponden al tamaño predicho para las ZmAGO1a, c y e. Estos cambios son mayores en los lotes de maíz Tuxpeño. Sin embargo, los patrones entre réplicas biológicas no se conservan en su totalidad. Es muy difícil relacionar el valor obtenido en estos análisis con los obtenidos en la expresión de ZmAGO1a. Ya que los niveles de proteína AGO1 se encuentran regulados por miR168, por lo que resultaría poco probable encontrar niveles equivalente de proteína y transcrito. No obstante, aunque los datos no resulten concluyentes, abren un nuevo panorama en cuanto a la investigación de los niveles de acumulación de estas proteínas durante la embriogénesis somática. Pudiendo llevar a cabo en un futuro, la identificación de estas bandas mediante espectrometría de masas y así poder tener mayor seguridad de que se trate de proteínas Argonautas.

Finalmente, para el análisis con anti-atAGO4 se utilizaron los mismos extractos totales y controles mencionados anteriormente. En los primeros ensayos, se encontró que el anticuerpo reconocía tres de las bandas del marcador de peso molecular (250 y 100 y 70 KDa), aunado a una serie de bandas por debajo de los 55 KDa. Sin embargo, el mismo fabricante y otros grupos de investigación reportan esta inespecificidad del anticuerpo en geles en los que se detectaron proteínas en *A. thaliana* (Havecker *et al.*, 2010). No obstante, en ninguna de las muestras analizadas nos fue posible detectar una banda en el peso molecular aproximado (103 KDa para *A. thaliana*). Hasta ese punto nos centramos en identificar AGO4 en *A. thaliana*, utilizando callos embriogénicos de



Arabidopsis como un segundo control. Se aumentó la cantidad de extracto total de cada muestra a separar en el gel de poliacrilamida-SDS (60 µg de extracto total de proteína de cada muestra). Así mismo, se utilizó una mayor concentración del anticuerpo (1:5000). Se realizó la inmunoréplica y se tuvieron varios problemas. Primero, nuevamente no se visualizaron o detectaron con claridad las bandas con el anticuerpo, considerando esto se tomó en cuenta el reporte del fabricante para la detección de la proteína en suspensiones celulares. Se utilizaron 80 µg de extracto total de suspensiones celulares de *A. thaliana*. Sin embargo, la concentración de los extractos de proteínas obtenidos en este trabajo no permitían cargar una cantidad mayor a 60 µg por pozo. Segundo, al visualizar el western blot, se encuentra un barrido a lo largo de todos los carriles que podría ser consecuencia de cargar demasiada muestra en el gel (Figura 33) y aun con los cambios en el protocolo y los diferentes tejidos analizados no fue posible evaluar los niveles de proteínas de la familia AGO4 de maíz en el modelo estudiado. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los tejidos utilizados para detectar la proteína AGO4 en *A. thaliana* no fueran los adecuados, ya que no se probaron tejidos reproductivos donde se ha detectado AtAGO4 (Havecker *et al.*, 2010). No obstante, se considera necesaria la obtención de anticuerpos para proteínas argonautas de maíz.



**Figura 33. Acumulación de AGO4 durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño (izquierda) y Costeño (derecha).** 60 µg de proteína. Se utilizaron A<sub>P</sub>: Plántulas Arabidopsis 15 días; Callos embriogénicos Arabidopsis (C<sub>A</sub>); EJ<sub>12h</sub>: Ejes de maíz con 12h de germinación; EI: Embrión inmaduro; callos embriogénicos de 1 (C1), 4 (C4), 10 (C10), 18 (C18) y 22 (C22) meses de subcultivo. Las muestras fueron separadas por un gel SDS-PAGE al 7% y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas 1 h con 5% de leche baja en grasa en buffer TBS-TT. El ensayo fue realizado por duplicado utilizando anti-AGO4 (1:1000) en buffer TBS-TT. Sin embargo sólo se muestra una réplica.

## Discusión

La regeneración de plantas a partir de células o tejidos se puede considerar como el objetivo central de la biotecnología vegetal, brindando un sentido agronómico a otras facetas de la biología celular o molecular. Disponer de una herramienta que permita regenerar plantas es imprescindible para la clonación y el saneamiento de plantas. Puesto que permite la propagación a partir de una pequeña cantidad de tejido. Adicionalmente a su papel central en la micropropagación, la embriogénesis somática también se ha revelado como la mejor vía de regeneración en crioconservación y transformación de plantas (Celestino *et al.*, 2005). El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen la embriogénesis somática resulta de vital importancia puesto que brindan información acerca de procesos básicos en todos los organismos, como la embriogénesis. La caracterización de elementos reguladores durante el proceso de desdiferenciación celular ocurrido durante la embriogénesis somática ha tomado importancia durante los últimos años y los mecanismos regulatorios novedosos como los sRNAs se han visto implicados durante la inducción de embriones somáticos de diversas especies (Lin *et al.*, 2013; Xiyan *et al.*, 2013). Este trabajo se centró en la identificación de elementos indispensables para el funcionamiento de las vías de regulación mediadas por sRNAs durante la embriogénesis somática de maíz.

Las familias de proteínas DCL, RDR y AGO, son indispensables para el procesamiento y funcionamiento de sRNAs. Por ello, resulta imprescindible la identificación de secuencias homólogas a las ya caracterizadas en *Arabidopsis thaliana* como primer acercamiento para conocer el funcionamiento de las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs en maíz. Aunado a esto, reportes en especies más relacionadas con maíz como el arroz han mostrado una mayor diversificación de las vías, encontrando un número mayor de secuencias pertenecientes a estos grupos que las que se conocen en *Arabidopsis*. Los pastos como el arroz y el maíz, han mostrado una mayor tasa de duplicación génica (Langham *et al.*, 2004; Gaut, 2001), por lo que no resulta sorprendente encontrar muchas más secuencias en el genoma de maíz. Durante los últimos 10 años, diversos Institutos de investigación han colaborado en el ambicioso proyecto de secuenciación y ensamblaje del genoma de maíz para conformar una base de datos con toda la información sobre el genoma de maíz, MaizeGDB (por sus siglas en inglés Maize Genetics and genomics Data Base). Sin embargo, el maíz posee un genoma bastante complejo, por lo que 10 años después de iniciado el proyecto, el genoma de maíz se continúa actualizando teniendo una cobertura de aproximadamente el 93.5% del genoma (Schaeffer *et al.*, 2011). Aunado a esto, los modelos de productos proteicos

propuestos en esta base de datos han sido contruidos con base en evidencia experimental transcriptómica de diversas fuentes, por lo que las secuencias de aminoácidos analizadas en este trabajo podrían cambiar en las nuevas versiones del genoma y según las nuevas tecnologías brinden mayor sensibilidad para detectar transcritos de genes poco abundantes y de esta manera obtener mejores modelos proteicos. Por ello, se recomienda actualizar los análisis realizados a la par de las nuevas anotaciones en el genoma.

Por otro lado, se conocen distintos mecanismos de regulación genética mediada por sRNAs. Sin embargo, en el presente trabajo nos centramos en el análisis de algunos componentes de la vía RdDM y miRNAs. Dados los antecedentes, las poblaciones de sRNAs con mayores cambios observados durante la embriogénesis somática de maíz son los hc-siRNAs y miRNAs.

La resolución de los árboles consenso para las familias de proteínas DCL, RDR y AGO con base en la anotación más reciente de los modelos de productos de genes de maíz (B73 RefGen\_v3), muestra que existen secuencias ortólogas de maíz para para casi todas las secuencias reportadas en *Arabidopsis thaliana* y *O. sativa*. Se observó una mayor identidad con las proteínas de *O. sativa*, lo cual puede explicarse por la cercanía evolutiva de los taxones de *O. sativa* y *Z. mays*. Sin embargo, para el clado DCL4 no se encontró una secuencia ortóloga en maíz, lo cual puede deberse a los criterios de exclusión utilizados para la elección de las secuencias, ya que en la búsqueda se encontró una secuencia (GRMZM2G160473\_P01) con un 100% de identidad a la secuencia DCL103 de ChromDB, la cual representa un posible ortólogo para atDCL4. No obstante, en el análisis de dominios funcionales la secuencia GRMZM2G160473\_P01 no presenta ningún dominio RNasa III indispensable para la actividad de corte de las proteínas DCL. Asimismo, posee una longitud menor al promedio de los modelos DCL reportados en ChromDB, por lo que no se incluyó.

Dentro del clado AGO4/6/8/9 las relaciones de ortología resultan más complejas. De las 4 secuencias de maíz dentro del clado, sólo ZmAGO4b ha sido parcialmente caracterizada. Estudios sobre la esporogénesis en maíz han reportado el papel de ZmAGO4b durante el desarrollo de los gametofitos, donde parece ser que participa en la producción de las esporas femeninas y masculinas durante la meiosis. En dichos estudios mutantes deficientes de *ZmAGO4b* muestran defectos en la condensación de la cromatina, desalineamiento de los cromosomas durante la metafase; fallas en la formación del huso mitótico, hipometilación en contexto no CG en regiones repetidas centroméricas y una no reducción de gametos que resultan en clonas exactas de la

planta madre (Singh *et al.*, 2011). Todos estos efectos en la formación de gametos ponen en evidencia el papel de ZmAGO4b en la organización de los centrómeros durante la meiosis. Existen ejemplos de AGOs con funciones específicas durante la esporogénesis en arroz y *Arabidopsis*. *MEL1* en arroz fue la primera AGO en plantas relacionada con fenómenos de esporogénesis. Mutantes nulas de *mel1* muestran defectos en el desarrollo premeiótico y meiótico. Por otra parte, *AGO9* en *Arabidopsis thaliana* se relaciona con la especificación e identidad de la célula madre de la megaspora (MMC) y el silenciamiento de transposones en los gametos femeninos (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010). Las relaciones filogenéticas muestran a ZmAGO4b es más cercana a OsAGO4b que a AtAGO9; sin embargo, AtAGO9 y ZmAGO4b parecen tener funciones relacionadas actuando de manera similar en la metilación en contexto no-CG en el óvulo. No obstante, se ha planteado que la vía de silenciamiento que involucra a ZmAGO4b pueda diferir a la vía RdDM canónica, debido a diferencias en la expresión de TE en ausencia de AtAGO9 o ZmAGO4b (Singh *et al.*, 2011). La expresión de ZmAGO4b durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz resulta muy interesante. Al menos para la réplica de maíz Tuxpeño, *ZmAGO4b* y *NRPE1* mantienen patrones de expresión similares. Se plantea que ZmAGO4b al formar el RISC con un hc-siRNA, reconocerá el transcrito que genera NRPE1 y al mismo tiempo se reclutará a la maquinaria de metilación del DNA. Por lo que, no es sorprendente que ambos genes se encuentren expresados en la misma proporción. Este patrón se observa claramente en casi todos los lotes analizados, donde un aumento o disminución en la expresión de *ZmNRPE1* viene acompañado de un patrón similar en la expresión de *ZmRDR2* y *ZmAGO4b*. Solamente en el lote de inducción de maíz costeño no existe una correspondencia en la expresión de estos tres transcritos en C4. Esto concuerda con estudios en *Arabidopsis thaliana*, en los que se ha observado que la disminución de la expresión de *AtNRPE1* provoca un decaimiento en la expresión de *AtRDR2*, *AtAGO4* y otros miembros de la vía RdDM (Haag & Pikard, 2011).

Desafortunadamente, no se logró la identificación de las proteínas AGO4 con el anticuerpo utilizado. Es probable que los tejidos de *Arabidopsis thaliana* utilizados no sean los indicados. Una vez realizadas las inmunoréplicas para la identificación de alguna AGO4 en maíz y al no lograr identificar ninguna de las tres proteínas predichas dentro del clado AGO4 de maíz, analizamos la secuencia de estas tres proteínas e identificamos que las 3 proteínas dentro del subclado AGO4 de maíz, carecen de la secuencia de aminoácidos que reconoce el anticuerpo anti-AGO4 de *Arabidopsis thaliana* (ELKKRNPENGEFE; Havecker *et al.*, 2010); eso explicaría por que no se detecta ninguna señal en los tejidos de maíz. Por lo que para siguientes experimentos

se recomienda analizar los epítopes que reconocería un anticuerpo específico y así establecer si es recomendable realizar un protocolo experimental. Aunado a esto, la identificación de los niveles de proteína AGO4 en maíz no sería suficiente para explicar la expresión de las poblaciones de sRNAs durante la embriogénesis somática, puesto que AGO4, AGO6 y AGO9 se involucran en la vía RdDM canónica; si embargo AGO1 y 2 pueden involucrarse en las vías no canónicas. Y por los resultados obtenidos durante la secuenciación masiva en donde la abundancia de poblaciones de sRNAs de cierta longitud cambiaba durante los primeros meses de la inducción de callos embriogénicos, es probable que varias proteínas argonautas estén conformando el RISC con sRNAs específicos. Por lo que es necesaria la realización de un análisis global que involucre la identificación de todos los miembros de las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs. De esta manera se puede establecer un mejor panorama sobre el funcionamiento de las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs en maíz y, particularmente durante los eventos de desdiferenciación y cambios en la expresión genética que involucra la embriogénesis somática de maíz.

La presencia de ZmAGO4a1/a2 y ZmAGO6a/b dentro del mismo clado, hace suponer una diversificación funcional tejido específico. Tal como se ha caracterizado para *AtAGO4*, *AtAGO6* y *AtAGO9*. Estudios recientes muestran que *AtAGO4* y *AtAGO6* son mutuamente dependientes, pero no son redundantes. Ambas se relacionan con la vía RdDM; sin embargo, sus patrones de expresión y co-localización con distintos miembros de la vía difieren. Mientras que *AtAGO6* se encuentra altamente expresada en tejidos meristemáticos y tejidos enriquecidos con células en división celular. *AtAGO4* se expresa de manera más ubicua incluyendo tejidos como hojas, donde *AtAGO6* no se expresa. Además, *AtAGO4* se co-localiza con Pol V en la zona perinucleolar donde Pol II y *AGO6* están ausentes. En cambio en el nucleoplasma, *AtAGO4* co-localiza con Pol II mientras que *AGO6* co-localiza preferencialmente con Pol V. Estos patrones de expresión sugieren que ambas AGOs, mantienen actividades relacionadas con RdDM independientes (separadas espacio-temporalmente). Se ha propuesto que *AtAGO6* podría representar una vía RdDM ancestral, donde después del surgimiento de Pol IV y Pol V en plantas, se diversificó funcionalmente en la vía canónica (Duan *et al.*, 2015; McCue *et al.*, 2015). La identificación de ZmAGO6b como un posible ortólogo funcional de *AtAGO6* resulta importante puesto que los tejidos donde se ha analizado su expresión son tejidos meristemáticos, los cuales son de vital importancia para la inducción de cultivos embriogénicos de callos de maíz. En este trabajo sólo fue analizada la expresión de *ZmAGO4b* por lo que los patrones de expresión de *ZmAGO6b* durante la embriogénesis somática de maíz son desconocidos. El análisis de la

expresión de todas las argonautas en maíz durante la desdiferenciación de células somáticas para la obtención de callos embriogénicos, podría ayudar en la caracterización del funcionamiento de las vías durante estas etapas de desarrollo, donde grandes cambios a nivel de expresión genética ocurren de manera dinámica.

De manera interesante, se encontró un ortólogo para OsDCL5 en maíz. OsDCL5 (anteriormente nombrada como OsDCL3b), se ha relacionado específicamente con la producción de phasiRNAs de 24 nt en tejidos reproductivos como las panículas y etapas tempranas del desarrollo de la semilla (Fei, *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2012). Aunque no está claro el papel de esta clase particular de phasiRNAs de 24 nt, su producción podría significar un enlace entre el PTGS y TGS. Importantemente, la presencia de un ortólogo de OsDCL5 en maíz, podría sugerir que es un mecanismo particular al menos en algunos pastos, cuyos genomas en tejidos reproductivos presentan una desregulación general, particularmente una hipometilación (Köhler & Lafon-Placette, 2015; Kawashima & Berger, 2014; Law & Jacobsen, 2010). La utilización de un mecanismo alternativo para el silenciamiento genético a nivel transcripcional, podría brindar mayor estabilidad en el genoma mediante la producción de phasiRNAs.

Para la familia RDR, la resolución del árbol consenso permitió agrupar los miembros de las RDR $\alpha$  y RDR $\gamma$ . Los clados obtenidos son consistentes con lo reportado por Zong *et al.*, (2009). Donde las RDR $\alpha$  y RDR $\gamma$  en eucariontes se han diversificado independientemente. Además, todas las secuencias analizadas poseen el motivo "DXDGD" en el dominio catalítico RdRP, característica distintiva de las RDRs eucariontes, por lo que es probable que todas las secuencias analizadas puedan realizar las actividades catalíticas de una RDR. Más aun, la diferencia de un aminoácido en el motivo catalítico (DFDGD y DLDGD para RDR $\alpha$  y RDR $\gamma$ , respectivamente) refuerza el resultado de las relaciones de ortología entre las secuencias de maíz, arroz y *Arabidopsis thaliana*. Aun cuando no se tenga claro el impacto de la sustitución de fenilalanina por una leucina en la actividad catalítica de las RDRs, es probable que pueda tener implicaciones funcionales, las cuales podrían verse reflejadas en el hecho de que sólo los miembros del clado RDR $\alpha$  han sido relacionadas directamente en algún mecanismo de regulación genética (Zong *et al.*, 2009). Sólo ZmRDR3 se agrupa en el clado de las RDR $\gamma$ , sugiriendo que esta secuencia en particular, podría no estar involucrada en las vías de procesamiento de sRNAs, además de que presenta una longitud mucho menor al resto de las secuencias analizadas y su dominio RdRP parece estar trunco. Para el subclado RDR6, resulta interesante identificar tres secuencias en maíz ZmRDR6a, b y c; ya que AtRDR6 se encuentra involucrada en múltiples vías de silenciamiento por sRNAs, manteniendo un papel dinámico en la producción de la

mayoría de los precursores de sRNAs. Sin embargo, *ZmRDR6a* y *ZmRDR6c* podrían ser resultado de una duplicación génica, dada su cercana localización en el mismo cromosoma (cromosoma 9). Por lo que resultaría muy interesante establecer los patrones de expresión de los tres genes *ZmRDR6* puesto que, en el presente trabajo sólo fue analizada la expresión de *ZmRDR6b* y se sabe que muchos de los miembros de las familias proteicas analizadas mantienen una expresión tejido específico en etapas particulares del desarrollo, por lo que podría ser que *ZmRDR6a*, *b* y *c* tengan papeles redundantes y se expresen de manera particular o bien que alguna de las tres secuencias sea una duplicación no funcional, aumentando el nivel de complejidad de las vías de silenciamiento canónicas caracterizadas en *Arabidopsis thaliana*. RDR2 y RDR6 son los únicos miembros de la familia asociados a la producción de sRNAs. *ZmRDR2* ha sido estudiado extensamente en maíz por su papel en la actividad paramutagénica de loci específicos. La paramutación consiste en la interacción entre dos alelos específicos, provocando alteraciones heredables en uno de los alelos con una alta frecuencia (Dorewiler *et al.*, 2000). El papel de *ZmRDR2* (también conocida como MOP1, “Mediador de la Paramutación 1”) durante la paramutación aun no es completamente entendido. No obstante, la paramutación en algunos loci no se efectúa en ausencia de MOP1, estableciendo la noción de que el gen *Mop1* es necesario para el establecimiento y mantenimiento de la paramutación en múltiples loci (Kaepler, 2009). Además, la ausencia de MOP1 causa una reducción dramática de siRNAs de 24nt así como disminución en el tamaño de la planta, mazorcas y un retraso en la floración (Barber *et al.*, 2012; Hollick & Springer, 2009; Wang *et al.*, 2009). En conjunto todos los reportes experimentales acerca de MOP1 (*ZmRDR2*), nos brindan un panorama sobre la importancia de esta enzima, no sólo en la biogénesis de sRNAs, sino en fenómenos característicos del maíz como lo es la paramutación. La identificación de la secuencia *ZmRDR2* dentro del clado de las RDR2 de arroz y *Arabidopsis*; supone la ortología de la secuencia con *AtRDR2*, por lo que la disminución en poblaciones de hc-siRNAs en ausencia de *ZmRDR2*, evidencia su papel durante la biogénesis de los mismos.

Además de *ZmRDR2*, *ZmNRPD1* y *ZmDCL3* son proteínas indispensables para la producción de hc-siRNAs. Por lo que el aumento en la expresión de los transcritos de estos genes en C1 supondría un aumento en las poblaciones de hc-siRNAs de 24 nt. Al comparar los resultados de la expresión de estas enzimas con los datos obtenidos en la secuenciación masiva de sRNAs en callos embriogénicos de diferentes tiempos de subcultivo se observa, que en general, las lecturas de 24 nt son las más abundantes en C1 de maíz Tuxpeño; sin embargo, las lecturas que mapean en secuencias repetidas o

TEs son menores que las presentes en EI (antes de la inducción de callos embriogénicos). A primera vista, estos datos podrían parecer contradictorios. Una explicación podría ser que el aumento en la expresión de las enzimas de biogénesis de hc-siRNAs pudiera tener como resultado un aumento en la producción de siRNAs de 24nt. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los transcritos generados por NRPD1 pueden no ser en su totalidad TEs, sino secuencias codificantes generadas alternativamente por NRPB1, de las cuales también es posible generar siRNAs que regulen mediante las vías RdDM no canónicas (Duan *et al.*, 2015; Matzke & Moshier, 2014). La implicación de los cambios en la regulación de la vía RdDM en C1 podría ser el reflejo de la pérdida de marcas epigenéticas en el genoma para adquirir el nuevo programa celular en las primeras semanas de la inducción, en el que una vez establecidos los patrones necesarios para la proliferación de callos embriogénicos inducidos por las señales ejercidas a través de los fitorreguladores, es necesario mantenerlos, lo cual se podría lograr en parte con un aumento en la expresión de las enzimas de la vía RdDM, como se observa en la muestra de C1. Dicho esto, resulta evidente que si se desea mantener el estado de dediferenciación y respuesta rápida ante el estrés que enfrentan los callos embriogénicos en sus primeros meses, no sólo es importante el silenciamiento de TE o la correcta condensación de regiones heterocromáticas para evitar errores durante la división y proliferación celular, que caracteriza a los callos embriogénicos establecidos, sino también, es necesario el control de la expresión de genes. Por lo que resulta extremadamente interesante el que los niveles de *ZmRDR2* disminuyen a los 4 meses de subcultivo, mientras que exista un aumento en la expresión de *ZmRDR6b* a este mismo tiempo de subcultivo. Al correlacionar estos datos con los de la secuenciación masiva, encontramos que a los cuatro meses de subcultivo, las lecturas de hc-siRNAs aumentan, sin embargo la mayoría de estas lecturas es de 22 nt, a diferencia de la biblioteca de C1, donde el tamaño más abundante era de 24 nt, (tamaño canónico de los hc-siRNAs). Para el aumento de hc-siRNAs en C4, resultaría necesario una mayor presencia de la maquinaria de biogénesis. Pero al mismo tiempo, podría estar llevándose a cabo la vía RdDM no canónica, involucrando a *ZmRDR6b* por lo que el aumento de su expresión en C4 podría estar relacionado con la mayor producción de lecturas de 22 nt. Lo cual resulta importante ya que se ha reportado que la activación de la vía RdDM no canónica puede darse por el aumento en la expresión de elementos transponibles recién insertados (Matzke & Moshier, 2014). Por lo que se plantea que durante la inducción de callos embriogénicos de maíz y particularmente durante los primeros meses de subcultivo de callos embriogénicos de maíz, existe un aumento en los eventos de transposición al existir una desregularización en la condensación de la cromatina, para



la adquisición de un nuevo programa de expresión genética que permita la desdiferenciación celular. Y en este sentido, es necesaria la activación de la vía RdDM no canónica para regular la expresión de TE que darán como resultado sRNAs con una longitud de 22 nt que mapean en TE.

Otro aspecto a considerar son las veces de cambio en la expresión de *ZmRDR2*, estas son mucho mayores a las de las otras enzimas, esto podría deberse a que es necesaria la amplificación de la producción de hc-siRNAs durante la inducción de callos embriogénicos. En tanto que la *NRPD1* transcribe una región, podría haber mayor abundancia de *ZmRDR2* para poder generar múltiples dsRNAs que serán cortados por *DCL3*. De ser así, *ZmRDR2* podría resultar un punto clave para el correcto funcionamiento de la vía, ya que garantizaría suficiente sustrato (dsRNAs) para la producción de hc-siRNAs.

En cuanto a la vía de miRNAs y tasiRNAs. En general, las relaciones de ortología entre los miembros del clado AGO1/10 son complejas y se conforman por numerosas secuencias de maíz. En cuanto al gen *GRMZM2G079080* del cual se generan *ZmAGO10b* y *c* podría ser posible que los dos productos proteicos sean en realidad el mismo. El análisis de dominios muestra que de generarse *ZmAGO10c* mediante el splicing alternativo del transcrito de *GRMZM2G079080*, la proteína carecería del dominio PIWI, característica indispensable e intrínseca de una proteína argonauta. Sin embargo, al no poseer evidencia experimental de la expresión de ambos transcritos, no podemos descartar que sean productos independientes que puedan tener patrones de expresión distintos, o bien si *ZmAGO10c* pueda resultar en una proteína AGO funcional.

Dentro del subclado AGO1, las variaciones entre las secuencias son las más grandes, sin embargo, la mayoría de los miembros conservan el acomodo de los dominios. *ZmAGO1a*, *ZmAGO1c* y *ZmAGO1e*, poseen el dominio rico en Glicina (PF12764), el cual ha sido propuesto como posible sitio de reclutamiento de proteínas ricas en glicina. Las cuales pueden ser parte de los complejos de inicio de la traducción y por un mecanismo aun desconocido se puede inhibir la traducción del mensajero blanco (Wilson & Doudna, 2013). Basándonos en la estructura de sus dominios, podría ser que *ZmAGO1a/c/e* regule a sus mRNAs blancos mediante la inhibición traduccional. Mientras que *ZmAGO1b* y *f*, podrían no ser proteínas funcionales ya que sólo son pequeños fragmentos en el estado de anotación actual, por lo que a futuro es importante analizar la expresión de cada una de las secuencias encontradas dentro del subclado AGO1. Con la información recabada en este trabajo, se puede decir que en maíz existen 4 genes cuyos transcritos tienen todas las características necesarias para traducirse y

conformar una proteína tipo AGO1 funcional y, 3 de esas secuencias podrían disminuir la expresión de mensajeros blancos mediante la inhibición de la traducción formando un mi-RISC.

En este trabajo sólo fue analizada la expresión de *ZmAGO1a*. El análisis de los patrones de expresión de *ZmAGO1a* durante la embriogénesis somática de maíz se realizó como parte de la caracterización de la vía de miRNAs, incluyendo el análisis de la expresión de *ZmDCL1*. Al igual que en la vía RdDM, se observa un aumento en la expresión de ambas enzimas durante la inducción de embriones de maíz. Durante la secuenciación masiva se encontró que en el primer mes de la inducción, los niveles globales de miRNAs disminuían comparados con las lecturas encontradas en embriones inmaduros, aumentando considerablemente a los 4 y 10 meses de subcultivo. Los patrones de expresión encontrados en *ZmDCL1* y *ZmAGO1a* presentan un aumento al mes de la inducción, el precedente para el aumento en la producción de miRNAs a los 4 meses de subcultivo, tiempo en el que la maquinaria de biogénesis continua aumentando al igual que los miRNAs (al menos hasta los 10 meses). En cuanto a *ZmDCL1*, se observa que las veces de cambio en ambas réplicas son mayores que las de *ZmAGO1a*. Lo cual podría deberse a la necesidad de tener a disposición suficientes enzimas que corten los precursores de miRNAs. Se debe recordar que en el caso de los miRNAs, DCL1 genera dos cortes sucesivos para generar pre-miRNAs y, posteriormente, dúplex de miRNAs. Además, no se conoce si ambos cortes son generados por la misma enzima, por lo que es evidente que el procesamiento por DCL1 requiere de más tiempo comparado con los otros miembros de la familia, si resultaría lógico una mayor expresión de *ZmDCL1* comparada con *ZmDCL3*. Por otro lado, se puede observar que el patrón de expresión entre *ZmDCL1* y *ZmAGO1a* es extremadamente parecido. En la réplica de maíz Tuxpeño, el aumento en la expresión de ambas enzimas es mayor que en la réplica del maíz Costeño. Se podría pensar en un acoplamiento en la expresión de ambas. Sin embargo, se debe recordar que sólo se está analizando uno de los 6 transcritos ortólogos a AtAGO1 y que en la vía de miRNAs, se han implicado otros miembros de la familia argonauta (AGO10, por ejemplo). Por lo que, se deben realizar más estudios para analizar la expresión de todas las AGO1 identificadas en maíz. Hasta este punto sólo podemos asegurar que *ZmAGO1a*, quien presenta la mayor identidad a AtAGO1 se expresa de manera diferencial en los tiempos de inducción de callos embriogénicos de maíz.

Con el fin de correlacionar la expresión de al menos uno de los transcritos de *ZmAGO1* con la presencia de proteína AGO1 en maíz, se analizaron los niveles de proteína AGO1 en los distintos tiempos de subcultivo. La presencia de AGO1 de maíz no resulta

concluyente. Como se mencionó, no existen anticuerpos específicos para maíz. Sin embargo, se obtuvieron patrones de bandas interesantes en las muestras analizadas. Las presuntas bandas correspondientes a ZmAGOc/e y ZmAGO1a, se repiten en los diferentes tiempos de subcultivo y su presencia varía entre las muestras. Por lo que, es altamente probable que se estén identificando proteínas argonautas en maíz. No obstante, es necesario la identificación de estas bandas por técnicas más especializadas para asegurar su presencia en maíz. La opción más factible resultaría su identificación mediante espectrometría de masas. Si resultase que las bandas candidatas son proteínas argonautas; no sólo se habrán identificado parálogos de atAGO1 en maíz a nivel proteico (algo completamente novedoso); sino además, se habrá logrado estandarizar un protocolo de extracción de proteínas Argonautas en maíz, puesto que la inestabilidad de estas proteínas hace complicada su extracción. Por otro lado, resultan interesantes los cambios en la presencia de las dos bandas candidatas durante la inducción y propagación de callos embriogénicos. Indicando que los niveles de proteínas de esas posibles AGO1 cambian a lo largo de la embriogénesis somática haciendo probable que la presencia de las distintas ZmAGO1 sea diferencial en los diferentes tiempos de subcultivo, indicando una posible especialización de los miembros del subclado AGO1 de maíz.

Dado que para atAGO1 se ha reportado la regulación de su transcrito por miR168, resultaba importante establecer si todas las secuencias dentro del subclado AGO1 conservaban el sitio de reconocimiento para miR168; AtAGO1 se asocia a miRNAs para ejercer la regulación de sus mRNAs blancos y, a su vez los niveles de transcrito de *AGO1* son regulados por miR168a/b mediante el corte endonucleolítico de su mensajero (Vaucheret, 2009). La relación entre la regulación mediada por el RISC formado por AtAGO1 y la represión de la expresión de *AGO1*, proveen una retroalimentación de la vía de regulación mediada por miRNAs, donde los niveles de expresión de *AGO1* serán autorregulados. De las 6 secuencias de maíz dentro del subclado AGO1, sólo ZmAGO1b y f no poseen el sitio de reconocimiento para miR168 (zmMIR168a). Existiendo variaciones en los nucleótidos correspondientes al sitio, ZmAGO1d y OsAGO1d presentan la misma composición nucleotídica, lo cual se ve reflejado en las relaciones filogenéticas presentes en el cladograma. Estos resultados indican que los transcritos de *ZmAGO1a-d* pueden ser regulados por miR168. Finalmente, dado que AtAGO1 es la proteína argonauta mejor caracterizada en plantas, existen numerosas plantas mutantes, que interrumpen distintas funciones de esta proteína. Así, se ha logrado analizar aminoácidos importantes para el correcto funcionamiento de la proteína. Al analizar los aminoácidos más importantes reportados para el clado AGO1

se encontró una alta conservación de todos ellos. Sólo ZmAGO1b y ZmAGO1f carecen de algunos. Por lo que con base en todos los análisis realizados, se podría decir que los productos de estas dos secuencias no son funcionales.

Aunque el impacto de los cambios en la maquinaria de regulación mediada por sRNAs durante la inducción de callos embriogénicos de maíz no puede ser establecido con la información obtenida, el presente trabajo sienta un precedente, ya que el aumento generalizado de toda la maquinaria de la vía RdDM parece indicar que una vez que los embriones inmaduros se someten al estrés producido por la manipulación y la inducción mediante el tratamiento con el 2, 4,-D; es necesario el aumento en la producción de hc-siRNAs. Esto ocurre para disminuir la expresión de elementos transponibles que pudiesen estar activos después de la reprogramación generalizada que sufren las células. Ya que, para realizar la reprogramación deberían existir cambios en el estado de la cromatina, pudiendo encontrarse más laxa y por ende más activa, logrando así la desdiferenciación celular mediante la expresión y/o represión del genoma.

Además, se evidencia que no sólo existen cambios de expresión durante la inducción, sino que durante la propagación continúa habiendo fluctuaciones en la expresión de los 8 transcritos analizados en los diferentes tiempos de propagación (C10, C18, y C22). Existiendo un aumento en la expresión a medida que se siguen propagando los callos, independientemente si se trata de maíz Tuxpeño o Costeño. Sin embargo, las veces de cambio son mucho menores a las observadas durante la inducción y no resulta tan evidente si estos ligeros cambios son significativos.

De manera general, se puede decir que durante la propagación de callos embriogénicos de maíz, la expresión de al menos 8 enzimas clave para la biogénesis y funcionamiento de sRNAs es por mucho más estable que durante la inducción. Lo cual coincide con lo observado en cultivo de tejidos. Al menos, a partir de los 10 meses de subcultivo, parece haberse establecido el programa celular necesario para la propagación de callos embriogénicos. Desafortunadamente, no se cuenta con datos acerca de la expresión de las distintas clases de sRNAs más allá de los 10 meses de subcultivo, los cuales reforzarían esta información. Tampoco se tienen datos sobre la transición y/o eventos que pudiesen darse entre los 4 y 10 meses de subcultivo. Por lo que se tomó al primer tiempo de propagación (C10) para normalizar los tiempos subsecuentes. Debido a esto, se pierde información acerca del aumento o disminución en la expresión de estas enzimas comparadas con un tejido antes de la embriogénesis somática. Sin embargo, cronológicamente resulta muy difícil mantener y analizar un mismo lote durante casi dos años. Por lo que la información obtenida resulta de gran ayuda para entender y fortalecer

lo que anteriormente se ha propuesto acerca de la embriogénesis somática, sobretodo en la parte de regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Se ha observado que la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos subcultivados por dos años ocurre más rápido que la observada en plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos jóvenes (6 meses de subcultivo; Chávez *et al.*, 2015). Esto puede deberse a que la expresión genética en cultivos prolongados es más estable y los fenotipos celulares son más homogéneos. Mientras que la regeneración a partir de callos jóvenes, aun no se ha establecido el programa genético de los callos embriogénicos y someterlos a una nueva reprogramación celular podría tomar más tiempo para el desarrollo de la planta.

Otro aspecto interesante resulta de la observación de las diferencias entre el maíz genotipo Tuxpeño (VS-535) y Costeño (H-565), donde las veces de cambio en Costeño son menores a las observadas en maíz Tuxpeño. Experimentos en *Arabidopsis* enfocados en dilucidar el papel del control epigenético en la heterosis (vigor híbrido) de líneas híbridas seleccionadas generalmente por sus características importantes para la agricultura (biomasa, tolerancia al estrés y mejor crecimiento), muestran que existe una disminución en las poblaciones de sRNAs de 24 nt en híbridos de plantas C24 y *Ler*, produciendo alteraciones en los patrones de metilación en contexto CHH, dotando a la planta variaciones alélicas que pueden influenciar la actividad de muchos genes regulatorios y metabólicos (Groszmann *et al.*, 2011). Esto podría explicar por qué en casi todos los casos (excepto para *ZmDCL3*), se observan valores mayores de veces de cambio en la expresión de estos transcritos en la réplica de maíz variedad Tuxpeño. Dado que Costeño (H-565) es un triple híbrido con fondo genético de raza Tuxpeño utilizado en los programas de mejoramiento de maíz para la obtención de tortilla. Si la maquinaria de la vía RdDM se encuentra disminuida en este híbrido, es probable que también las poblaciones de hc-siRNAs. Aunado a esto, hemos observado que los embriones de maíz Costeño tienen un menor desempeño durante la inducción de callos embriogénicos comparado con los embriones de maíz Tuxpeño, teniendo mayor cantidad de tejido muerto y menor proliferación celular. Esto podría ser causado en parte por la menor expresión de la maquinaria de sRNAs. Sin embargo, se tendrían que realizar más estudios enfocados en las diferencias genéticas entre la variedad VS-535 y el híbrido H-565.

Los resultados obtenidos nos brindan un panorama en el que las enzimas de las vías de regulación mediadas por sRNAs aumentan durante la embriogénesis somática. No obstante, resulta complicado establecer un orden de eventos con estos datos por varias razones: 1) Existen muchas más enzimas involucradas en las vías y no se cuenta con

información acerca de sus patrones de expresión en maíz. 2) En maíz existen varios genes parálogos a los encontrados en *Arabidopsis thaliana*, por lo que no se tiene la seguridad de que los genes estudiados sean los únicos encargados en la regulación de una vía en particular y 3) La expresión de las enzimas y poblaciones específicas de sRNAs parece depender del genotipo y lote de maíz. Por lo que las comparaciones entre las poblaciones de sRNAs en diferentes tiempos de subcultivo de maíz Tuxpeño obtenidas mediante secuenciación de bibliotecas de sRNAs, puede no corresponder a las poblaciones de sRNAs en maíz Costeño o incluso en los lotes donde se realizó el análisis de la expresión. Sin embargo, la información obtenida resulta muy valiosa al sentar el antecedente de que existen cambios en la expresión de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de sRNAs durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz, independientemente del genotipo utilizado.

## Conclusiones

Las familias de proteínas Dicer like (DCL), RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR) y Argonautas (AGO) se han diversificado en las distintas especies de plantas, presentando un mayor número de miembros en las especies de gramíneas analizadas. Particularmente, en maíz se identificaron 5 secuencias de aminoácidos de la familia DCL, 6 secuencias pertenecientes a la familia RDR y 24 secuencias de la familia AGO

La mayoría de las secuencias de las familias DCL, RDR y AGO podrían ser proteínas funcionales, ya que presentan los dominios funcionales necesarios para su actividad enzimática.

Durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz, la expresión de genes clave en las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs aumenta. Lo cual correlaciona con los cambios observados en poblaciones específicas de sRNAs; la magnitud del aumento es mayor durante la inducción.

El mayor aumento de la maquinaria se observó en la expresión de ZmRDR2 y ZmRDR6b, cuyos patrones de expresión podrían indicar un cambio en la actividad de las vías RdDM canónica y no canónica.

Los patrones de expresión de enzimas clave en las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs se mantienen entre los distintos genotipos de maíz estudiados (VS-535 y H-565). Sin embargo, la magnitud de los cambios son menores en el maíz H-565.

El anticuerpo que detecta AtAGO1 identificó dos bandas que por su tamaño podrían corresponder a los homólogos AGO1a y AGO1c o e. La cantidad de proteína de cada una varía a lo largo de los diferentes tiempos de subcultivo analizados (al menos de manera semicuantitativa). Lo cual podría significar que no sólo la expresión de los genes analizados varía durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.

## Perspectivas

Identificación de las proteínas presentes en las bandas candidatas a ser ZmAGO1 mediante espectrometría de masas.

Realizar análisis globales de la expresión de todos los miembros involucrados en las vías de silenciamiento de sRNAs durante periodos tempranos de la inducción de callos embriogénicos mediante RNA-seq. Así como la realización de nuevas bibliotecas de sRNAs en los mismos muestreos para establecer la relación entre la expresión de sRNAs y las enzimas involucradas en su biogénesis y funcionamiento.

Establecer la edad ideal de embriones inmaduros para la inducción de callos embriogénicos utilizando embriones inmaduros de diferentes etapas. Establecer una relación entre los niveles de expresión de componentes claves en las vías de sRNAs y la edad ideal en donde se producen los mayores cambios en los miembros de las vías analizados previamente mediante RT-PCR.

Analizar la fisiología de los embriones inmaduros antes y después de la inducción de embriogénesis somática mediante microscopía electrónica para establecer los patrones de dediferenciación durante la inducción de callos embriogénicos de maíz.



## Referencias

- Ahlquist P. 2002 RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. 296(5571):1270-3.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Arikiti S, Xia R, Kakrana A, Huang K, Zhai J, Yan Z, Valdés-López O, Prince S, Musket TA, Nguyen HT, Stacey G, Meyers BC. 2014. An Atlas of Soybean Small RNAs Identifies Phased siRNAs from Hundreds of Coding Genes. *Plant Cell*. 26(12):4584-601.
- Axtell MJ. 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol*. 64:137-59.
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP. 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*. 127(3):565-77.
- Barber WT, Zhang W, Win H, Varala KK, Dorweiler JE, Hudson ME, Moose SP. 2012. Repeat associated small RNAs vary among parents and following hybridization in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(26):10444-9.
- Becraft PW. 2007. Aleurone Cell Development. *Plant Cell Monogr*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Böhmdorfer G, Rowley MJ, Kuciński J, Zhu Y, Amies I, Wierzbicki AT. 2014. RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA. *Plant J*. 79(2):181-91
- Bologna NG, Voinnet O. 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol*. 65:473-503
- Bonnet E, Van de Peer Y, Rouzé P. 2006 The small RNA world of plants. *New Phytologist* 171: 451-468.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123(7): 1279-9
- Bouasker S, Simard MJ. 2009. Structural biology: Tracing Argonaute binding. *Nature*. 461(7265):743-4.

- Cai H. 2006. Maize. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Calo S, Nicolás FE, Vila A, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. 2012. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol.* 83(2):379-94.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología Forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For*, 14 (3): 345-357.
- Chávez-Hernández EC, Alejandri-Ramírez ND, Juárez-González VT, Dinkova TD. 2015. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front Plant Sci.* 6:555.
- Che P, Love TM, Frame BR, Wang K, Carriquiry AL, Howell SH. 2006. Gene expresión patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol Biol* 62 (1-2):1-14.
- Chen Xuemei. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. 2009. *Annu Rev Cell Dev Biol* Vol.25: 21-44
- Chu Chih-Ching, Wang Ching-Chu, Sun Ching-San, Hsu Chen, Yin Kwang-Chu, Chu Chih-Yin, Bi Feng-Yun. 1975. Establishment Of An Efficient Medium For Anther Culture Of Rice Through Comparative Experiments On The Nitrogen Sources. *Journal Science China Mathematics.* 18: 659-668
- Creasey KM, Zhai J, Borges F, Van Ex F, Regulski M, Meyers BC, Martienssen RA. 2014. miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature.* 508(7496):411-5.
- Curtis H, N Barnes S, Schnek A. 2008 *Biología.* 7ª Ed. Editorial Médica Panamericana. 890 p.
- Czech B, Hannon GJ. 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet.* 12(1):19-31.
- Davies PJ. 2010. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action.* 3rd Ed. Springer Science. Ithaca NY. 1-3 p.

- Depuydt S, Hardtke CS. 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol.* 10;21(9):R365-73.
- Dorweiler JE, Carey CC, Kubo KM, Hollick JB, Kermicle JL, Chandler VL. 2000. Mediator of paramutation1 is required for establishment and maintenance of paramutation at multiple maize loci. *Plant Cell.* 12(11):2101-18.
- Duan CG, Zhang H, Tang K, Zhu X, Qian W, Hou YJ, Wang B, Lang Z, Zhao Y, Wang X, Wang P, Zhou J, Liang G, Liu N, Wang C, Zhu JK. 2015. Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J.* 34(5):581-92.
- Durbak A, Yao H, McSteen P. 2012. Hormone signaling in plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 15(1):92-6.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797
- Emons AM, Kieft H. 1995. Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays L.*). Somatic Embryogenesis and Syntetic Seeds II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 2:Unit 2.9.
- Fabian MR, Sonenberg N. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol.* 19(6):586-93.
- Frank F, Hauver J, Sonenberg N, Nagar B. 2012. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.* 31(17):3588-95.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC. 2013. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell.* 25(7):2400-15.
- Garrocho-Villegas V, Jesús-Olivera MT, Sánchez Quintanar E. 2012. Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration Plant Cell Culture Protocols, *Methods in Molecular Biology.* Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- Galinha C, Bilsborough G, Tsiantis M. 2009. Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Semin Cell Dev Biol.* 20(9):1149-56.

- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch. 2005. The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607
- Gaut BS. 2001. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. *Genome Res.* 11(1):55-66.
- Gendler K, Paulsen T, Napoli C. 2008. ChromDB: The Chromatin Database. *Nucleic Acids Res* 36: 298-302
- Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 10(2):94-108.
- Gómez-Montiel NO, Cantú-Almaguer MA, Sierra-Macías M, Hernández-Galeno CA, Vázquez-Carrillo MG, Espinosa-Calderón A, González-Camarillo M. 2013. H-565: Nueva alternativa de maíz para el trópico bajo de México. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Iguala. Iguala de la Independencia, Guerrero. Folleto Técnico 19,
- Gómez-Montiel NO, Cantú-Almaguer MA, Sierra-Macías M, Hernández-Galeno CA, Vázquez-Carrillo MG, Espinosa-Calderón A, González-Camarillo M. 2013. Hybrid corn H-565, a new version of H-507 for the tropical lowlands of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(5): 819-824
- Groszmann M, Greaves IK, Albertyn ZI, Scofield GN, Peacock WJ, Dennis ES. 2011. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 2617–2622.
- Haag JR, Pikaard CS. 2011. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(8):483-92.
- Haag JR, Brower-Toland B, Krieger EK, Sidorenko L, Nicora CD, Norbeck AD, Irsigler A, LaRue H, Brzeski J, McGinnis K, Ivashuta S, Pasa-Tolic L, Chandler VL, Pikaard CS. Functional diversification of maize RNA polymerase IV and V subtypes via alternative catalytic subunits. *Cell Rep.* 9(1):378-90.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC. 2010. The RNA-directed DNA methylation *Arabidopsis* Argonautes functionally diverge based on expression and interaction with target loci. *Plant Cell.* 22(2): 321-34.

- Herrera J, Alizaga R, Guevara E, Jimenez V. 2006. Germinación y crecimiento de la Planta. 1ª Ed. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Howell MD, Fahlgren N, Chapman EJ, Cumbie JS, Sullivan CM, Givan SA, Kasschau KD, Carrington JC. 2007. Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell*. 19(3):926-42.
- Hollick JB, Springer NM. 2009. Epigenetic phenomena and epigenomics in maize. *Epigenomics*. Springer Media BV. Netherlands.
- Jackson D. 2009. Vegetative Shoot Meristems. *Handbook of Maize: Its Biology*. Springer, New York, NY. USA.
- Jakubeková MP, Obert BA. 2011. Somatic Embryogenesis and Plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.) *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 1(4):478-487.
- Jia Y, Lisch DR, Ohtsu K, Scanlon MJ, Nettleton D, Schnable PS. 2009. Loss of RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) function causes widespread and unexpected changes in the expression of transposons, genes, and 24-nt small RNAs. *PLoS Genet*. 5(11):e1000737
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. 8:275-282
- Juárez-González VT. 2014. Regulación traduccional de mRNAs blanco de miRNAs durante la embriogénesis somática de maíz. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kaepler S. 2009. Chromatin, DNA methylation, RNAi and epigenetic regulation. *Handbook of Maize: Genetics and Genomics*. Springer, New York, NY. USA.
- Kapoor M, Arora R, Lama T, Nijhawan A, Khurana JP, Tyagi AK, Kapoor S. 2008. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expresión analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics*: 9:451
- Katiyar-Agarwal S, Jin H. 2010. Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 225–246.

- Kaufmann K, Pajoro A, Angenent GC. 2010. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nat Rev. Genet.* 11(12): 830-42.
- Kawashima T, Berger F. 2014. Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nat Rev Genet.* 15(9):613-24.
- Kenneth KN, Jamie JA, Craig EC. 2008. Structure-Function Relationships Among RNA-Dependent RNA Polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 320:137–156.
- Kim MY, Zilberman D. 2014. DNA methylation as a system of plant genomic immunity. *Trends Plant Sci.* 19(5):320-6.
- Köhler C, Lafon-Placette C. 2015. Evolution and function of epigenetic processes in the endosperm. *Front Plant Sci.* 6:130.
- Langham RJ, Walsh J, Dunn M, Ko C, Goff SA, Freeling M. 2004. Genomic duplication, fractionation and the origin of regulatory novelty. *Genetics.* 166(2):935-45.
- Law JA, Jacobsen SE. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 11(3):204-20.
- Le Trionnaire G, Twell D. 2010. Small RNAs in angiosperm gametophytes: from epigenetics to gamete development. *Genes Dev.* 24(11):1081-5.
- Lin Y, Lai Z. 2013. Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan Lour.*). *PLoS One.* 8(4):e60337.
- Liu Q, Feng Y, Zhu Z. 2009. Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomics.* 9(3):277-86.
- Liu Q, Paroo Z. 2010. Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu Rev Biochem.* 79:295-319.
- Liu Y, Kuhlman B. 2006. RosettaDesign server for protein design. *Nucleic Acids Research* 34: W235–W238.
- Liu YX, Wang M, Wang XJ. 2014. Endogenous small RNA clusters in plants. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 12(2):64-71.
- Lee T, Li P, Meyers BC. 2012. *The Biology and Dynamics of Plant Small RNAs.* Plant Genome Diversity. Springer-Verlag. Wien, Austria.

- Malone CD, Gregory J. H. 2009. Small RNAs as Guardians of the Genome. *Cell* 136(4): 656–668.
- Mallory AC, Vaucheret H. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet.* 38:S31-6.
- Machakova I, Zazimalova E, George E. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; auxins, their Analogues and Inhibitors. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd ed. Springer. (1): 174- 204.
- Márquez-Sánchez F. 2008. De las variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) A los híbridos transgénicos. I: recolección de germoplasma y variedades mejoradas. Centro Regional Universitario de Occidente, Dirección de Centros Regionales Universitarios, Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Mateos JL, Bologna JL, Palatnik JF. 2011. Biogenesis of Plant microRNAs, Non Coding RNAs in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Matzke MA, Mosher RA. 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet.* 15(6):394-408.
- Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS. 1995. Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers. 155-203 pp.
- McCue AD, Panda K, Nuthikattu S, Choudury SG, Thomas EN, Slotkin RK. 2015. ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J.* 34(1):20-35.
- Nardmann, Judith and Werr, Wolfgang 2009. Patterning of the Maize Embryo and the Perspective of Evolutionary Developmental Biology. *Handbook of Maize: Its Biology* Springer New York.
- Nobuta K, Lu C, Shrivastava R, Pillay M, De Paoli E, Accerbi M, Arteaga-Vazquez M, Sidorenko L, Jeong DH, Yen Y, Green PJ, Chandler VL, Meyers BC. 2008. Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the mop1-1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:14958–14963
- OGTR. 2008. The Biology of *Zea mays* L. ssp *mays* (maize or corn). Office of the Gene Technology Regulator. Canberra, Australia.

- Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Aufran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP. 2010. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature*. 464(7288):628-32.
- Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR, Violic AD. 2001. El maíz en los Trópicos. Mejoramiento y producción. Grupo de Cultivos Alimentarios Extensivos. Servicio de Cultivos y Pastos. Dirección de Producción y Protección Vegetal de la FAO. Roma, Italia.
- Pikaard CS, Haag JR, Ream T, Wierzbicki AT. 2008. Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci*. 13(7):390-7.
- Pessino SC, Ortiz JPA. 2010. Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires.
- Pillot M, Baroux C, Vazquez MA, Aufran D, Leblanc O, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Grimanelli D. 2010. Embryo and endosperm inherit distinct chromatin and transcriptional states from the female gametes in Arabidopsis. *Plant Cell* 22(2):307-20.
- Poulsen C, Vaucheret H, Brodersen P. 2013. Lessons on RNA silencing mechanisms in plants from eukaryotic argonaute structures. *Plant Cell* 25: 22–37
- Qian Y, Cheng Y, Cheng X, Jiang H, Zhu S, Cheng B. 2011. Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Rep*. 30(7):1347-63
- Qin H, Chen F, Huan X, Machida S, Song J, Yuan YA. 2010. Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA*. 16(3):474-81.
- Ramachandran V, Chen X. 2008. Small RNA metabolism in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 13(7), 368–374.
- Ramesh S, Admane N, Husain S. 2013. Small RNAs landscape (sRNAome) of Soybean [*Glycine max* (L.)]: Biogenesis, vital functions and potential applications. *Plant Knowledge Journal* 2(1):24-37.
- Ramírez L. Mejora de plantas Alógamas. 2006. Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. Campus Arrosadía. Pamplona, España. 1-33.
- Rodríguez-Sanz H, Manzanera JA, Soli MT, Gómez-Garay A, Pintos B, Risueño MC. 2012. Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and



- immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. *MC Plant Biology*. 14(224): 1471-2229.
- Roef L, Van Onckelen H. 2010. Cytokinin Regulation of the Cell Division Cycle. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. 3rd Ed. Springer Science. Ithaca NY. 241-245 p.
- Ronchi, VN, Giorgetti L. 1995 . *The Cell's Commitment to Somatic Embryogenesis. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sadava D. 2009. *Vida: La ciencia de la biología*. 8ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 638-639, 797.
- Saito K, Miyoshi K, Siomi C, Siomi H. 2010. The Key Features of RNA Silencing. *RNA Technologies and Their Applications, RNA Technologies*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 2-23.
- Sánchez JJ, Goodman MM, Stuber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Econ Bot*. 54(1):43–59.
- Sánchez GJJ. 2011. *Diversidad del maíz y el teocintle*. Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Conabio. México.
- Santner A, Estelle M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*. 459(7250):1071-8
- Schaeffer ML, Harper LC, Gardiner JM, Andorf CM, Campbell DA, Cannon EK, Sen TZ, Lawrence CJ. 2011. MaizeGDB: curation and outreach go hand-in-hand. *Database* 2011:bar022.
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A. 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci*. 7(11):487-91.
- Seo JK, Wu J, Lii Y, Li Y, Jin H. 2013. Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*. 26(6):617-25.
- Shan X, Yan J, Xie D. 2012. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Curr Opin Plant Biol*. 15(1):84-91.

- Singh M, Goel S, Meeley RB, Dantec C, Parrinello H, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D. 2011. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *Plant Cell*. 23(2):443-58.
- Song X, Li P, Zhai J, Zhou M, Ma L, Liu B, Jeong DH, Nakano M, Cao S, Liu C, Chu C, Wang XJ, Green PJ, Meyers BC, Cao X. 2012. Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis. *Plant J*. 69(3):462-74.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 305(5689):1434-7.
- Springer NM. 2013. Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics*. 29(4): 247-247.
- Starr C, Taggart R. 2009. *Biología, La unidad y diversidad de la vida* 12ed. Editorial Thomson. México.
- Sun L, Wu Y, Su S, Liu H, Yang G, Li S, Shan X, Yuan Y. 2012. Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays L.*) inbred line H99. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:271–286
- Sun G. 2012. MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol Biol* 80:17-36.
- Taíz L, Zeiger E. 2010. *Gene Expression and Signal Transduction. Plant Physiology*. 5ta Ed. University of California, Santa Cruz. USA.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(11):847-59.
- Thompson BE, Basham C, Hammond R, Ding Q, Kakrana A, Lee TF, Simon SA, Meeley R, Meyers BC, Hake S. 2014. The dicer-like1 Homolog fuzzy tassel Is Required for the Regulation of Meristem Determinacy in the Inflorescence and Vegetative Growth in Maize. *Plant Cell*. 26(12):4702-17.
- Twyman RM. 2003. *Control of Gene Expression, Posttranscriptional Regulation. GROWTH AND DEVELOPMENT*. Elsevier Ltd.

- Vaucheret H. 2009. AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One*. 30;4(7)
- Vielle-Calzada JP, Padilla J. 2009. The Mexican landraces: description, classification and diversity. In *Handbook of Maize: Its Biology*. Springer New York.
- Voinnet O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*. 136(4):669-87.
- Vollbrecht E, Schmidt RJ. 2009. Development of the Inflorescences. In *Handbook of Maize: Its Biology*. Springer New York.
- Von Arnold S. 2008. Somatic Embryogenesis. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ra ed. Springer Netherlands. (1): 335-354.
- Walbot V, Evans MM. 2003. Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nat Rev Genet*. 4(5):369-79
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T, Patel DJ. 2009. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*. 461(7265):754-61.
- Wang X, Elling AA, Li X, Li N, Peng Z, He G, Sun H, Qi Y, Liu XS, Deng XW. 2009. Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell*. 21(4):1053-69.
- Weiberg A, Wang M, Bellinger M, Jin H. 2014. Small RNAs: a new paradigm in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 52:495-516.
- Wilson RC, Doudna JA. 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*. 42:217-39.
- Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X. 2013. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J Exp Bot*. 64(6):1521-36.
- Zong J, Yao X, Yin J, Zhang D, Ma H. 2009. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*. 447(1):29-39.

