



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

·  
·

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DICER-LIKE  
(DCL) Y ARGONAUTA (AGO) EN  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE MAÍZ.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ALLAN GABRIEL CAMACHO HERNÁNDEZ.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.**

**2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente: Irma Ofelia Bernal Lugo**

**Vocal: Francisco Javier Plasencia de la Parra**

**Secretario: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

**1er. Suplente: Alfonso Rafael Salgado Aguayo**

**2do. Suplente: Oscar Hernández Meléndez**

**LUGARES DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

**Laboratorio 103, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.**

**Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA**

-

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

**SUSTENTANTE**

-

**Allan Gabriel Camacho Hernández**

## Contenido

<b>1</b>	<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Maíz.....</b>	<b>7</b>
3.1.1	Reproducción sexual del maíz.....	8
<b>3.2</b>	<b>Embriogénesis cigótica.....</b>	<b>10</b>
<b>3.3</b>	<b>Embriogénesis somática.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4</b>	<b>RNAs pequeños (sRNAs).....</b>	<b>16</b>
<b>3.5</b>	<b>Proteínas Dicer-like (DCL).....</b>	<b>21</b>
<b>3.6</b>	<b>Proteínas Argonauta (AGO).....</b>	<b>23</b>
3.6.1	Algunas funciones de las proteínas AGO de plantas.....	25
<b>4</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
6.1	Objetivo General.....	31
6.2	Objetivos particulares.....	32
<b>7</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
7.1	Material Biológico.....	32
7.2	Extracción de proteínas.....	32
7.3	Concentración de proteína.....	33
7.4	Cuantificación de proteínas por método Bradford.....	33
7.5	Electroforesis.....	33
7.6	Inmunodetección mediante western blot.....	35
7.7	Purificación de proteínas para isoelectroenfoque.....	36
7.8	Electroforesis de dos dimensiones.....	36
<b>8</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
8.1	Identificación de DCL1 y DCL3 mediante inmuno réplicas tipo western blot.....	38
8.2	Identificación de AGO1 mediante electroforesis 2D e inmuno réplicas tipo western blot.	43
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>12</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>
<b>13</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>56</b>

## Tablas y Figuras

Tabla 1. Principales clases de sRNAs en plantas .....	16
Tabla 2. Pesos moleculares esperados para las proteínas AGO1 en maíz .....	30
Tabla 3. Concentración de proteína en diferentes extractos.....	38
Tabla 4. Concentración obtenida con columnas de enriquecimiento .....	44
Figura 1. Producción mundial de maíz, 2006/07 – 2016/17 .....	8
Figura 2. Modelo de Reproducción sexual de maíz .....	9
Figura 3. Modelo de embriogénesis cigótica en Z. Mays .....	10
Figura 4. Esquema de la inducción, propagación y regeneración en embriogénesis somática de maíz .....	15
Figura 5. Mecanismos de silenciamiento genético por RNAs pequeños .....	18
Figura 6. Biogénesis y degradación de miRNAs .....	20
Figura 7. Modelo estructural de Dicer-like (DCL) .....	23
Figura 8. Modelo estructural de Argonauta (AGO) .....	24
Figura 9. Clasificación filogenética de las proteínas AGO de Arabidopsis thaliana en 3 clados .....	25
Figura 10. Acumulación de AGO1 durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño .....	31
Figura 11. Ejemplo de curva patrón para la cuantificación de proteína .....	38
Figura 12. Muestras utilizadas. Gel SDS (PAGE) 7% .....	39
Figura 13. Inmuno detección Anti-AtDCL1 .....	41
Figura 14. Inmuno detección Anti-AtDCL3 .....	41
Figura 15. Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL1 con las secuencias de AtDCL1 y ZmDCL1 .....	43
Figura 16. Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL3 con las secuencias de AtDCL3 y ZmDCL3 .....	43
Figura 17. Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL1 con las secuencias de AtDCL3 y ZmDCL3 .....	43
Figura 18. Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL3 con las secuencias de AtDCL1 y ZmDCL1 .....	43
Figura 19. Geles SDS (PAGE) 7% con proteína antes y después de la prueba de enriquecimiento .....	45
Figura 20. Inmuno detección Anti-AtAGO1 .....	46
Figura 21. A: Separación electroforética 2D del extracto purificado de plántula de Arabidopsis thaliana. B: Inmuno réplica en gel 2D de Arabidopsis thaliana .....	47
Figura 22. A: Separación electroforética 2D del extracto purificado de Callo embriogénico de maíz de 8 meses. B: Inmuno réplica en gel 2D de Callo embriogénico de maíz de 8 meses .....	47

## **1 AGRADECIMIENTOS.**

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

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)  
IN211215

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

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

Se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) dentro del Proyecto de Ciencia Básica CB-2014/238439 durante la realización de esta tesis.

Se agradece a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Biol. Jorge Herrera Díaz por el apoyo técnico brindado en la separación de proteínas en geles de dos dimensiones.

## 2 RESUMEN

La embriogénesis somática es un proceso único en plantas. En él, células somáticas diferenciadas pueden formar nuevos embriones, de los cuáles es posible regenerar plantas.

Durante la embriogénesis somática del maíz las células son sometidas a concentraciones elevadas de fitoreguladores, provocando la reprogramación de su destino celular en un periodo de tiempo corto. Se ha propuesto que algunos mecanismos regulatorios involucrados en la inducción de la embriogénesis somática podrían ser mediados por RNAs pequeños (sRNAs). Se ha estudiado extensivamente el papel de los sRNAs durante el desarrollo, crecimiento y respuestas a condiciones adversas de las plantas.

Para la correcta biogénesis y funcionamiento de las vías de regulación por sRNAs en plantas es necesaria la participación de las proteínas Dicer-like (DCL), quienes desempeñan un papel central en el procesamiento de los precursores de sRNAs para generar RNAs de doble cadena (dsRNAs) de 21-24 nt de longitud. Una vez generados los dúplex de sRNAs por las proteínas DCL es necesaria su asociación a una proteína Argonauta (AGO), quien conformará el complejo efector del silenciamiento genético mediado por sRNAs.

El presente trabajo se enfocó en la identificación de distintas proteínas DCL y AGO durante el proceso de embriogénesis somática de maíz. Se estandarizó el enriquecimiento de proteínas de alto peso molecular en los extractos para poder visualizar mejor las bandas detectadas por los anticuerpos: AtAGO1, AtDCL1 y AtDCL3. Se realizaron inmuno réplicas tipo western blot y se visualizó un patrón de bandeo reproducible para dichos anticuerpos. Se encontró que los anticuerpos AtDCL1 y AtDCL3 no eran capaces de identificar a sus ortólogos en maíz, ya que no se observó ninguna banda en el tamaño molecular esperado. El análisis con AtAGO1 indicó que existen varias proteínas de tamaño esperado identificadas con el anticuerpo, por lo que posteriormente se estandarizó la purificación de proteínas para llevar a cabo un correcto isoelectroenfoque y electroforésis en dos dimensiones, con la finalidad de identificar a proteínas AGO1 en embriogénesis somática de maíz mediante inmuno detección con AtAGO1 y posterior espectrometría de masas. Finalmente, se visualizaron señales que podrían corresponder a un ortólogo de AtAGO1 en maíz basándose en el punto isoelectrico y peso molecular.

## 3 INTRODUCCIÓN

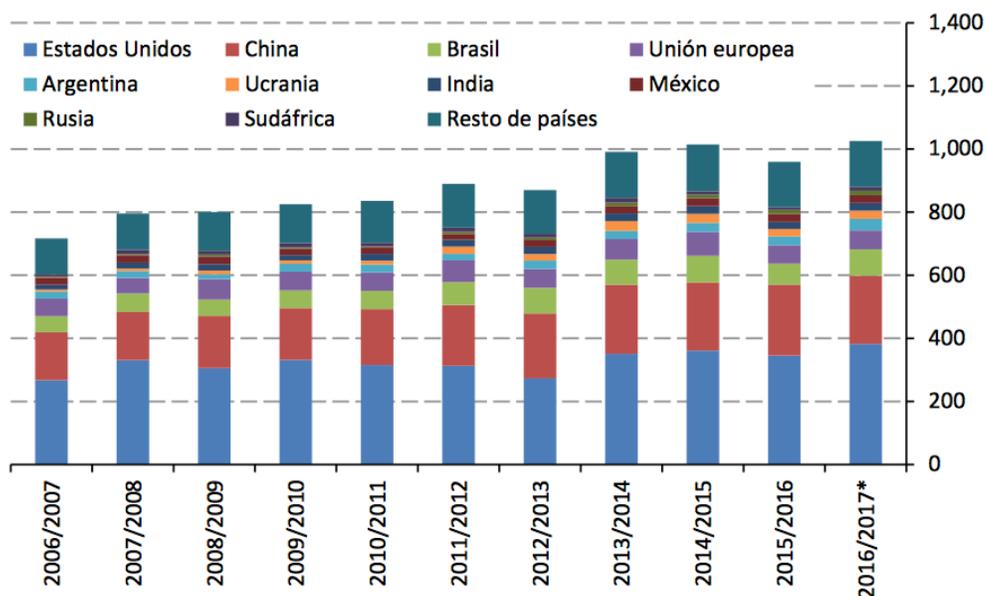
### 3.1 Maíz.

El maíz, junto con otras plantas cultivadas, ha sido el sustento principal de varias civilizaciones de Mesoamérica y de sus precursores. Debido a sus cualidades alimenticias para la producción de proteína animal, el consumo humano y el uso industrial, hoy en día es uno de los productos más importantes en los mercados internacionales. Su relevancia económica y social ha superado a la de otros cultivos, como son el arroz y el trigo. Adicionalmente, el cultivo y transformación del maíz es fuente de empleo y alimento para un número importante de personas en el mundo (Ortega *et al.*, 2013; FIRA, 2016).

Se prevé que durante el ciclo comercial 2016/17 se logre el nivel de producción mundial más alto de la historia (Figura 1). Para este periodo se pronostica que se obtendrán 1,025.6 millones de toneladas de maíz. Lo anterior representa un aumento esperado de 6.9 por ciento con respecto a la producción de 2015/16. En particular, se esperan crecimientos considerables en la producción de maíz en Estados Unidos, Brasil, Argentina, Ucrania, entre otros (FIRA, 2016).

Polanco y Flores (2008) mencionan que en México ninguna otra planta cultivada tiene tanta importancia como el maíz. Se siembra en todos los estados, climas y altitudes, pero tiene además importantes valores culturales, simbólicos y espirituales. Por su extraordinaria plasticidad genética, las etnias prehistóricas pudieron adaptarlo a una gran diversidad de condiciones de clima, altitud y latitud, y a partir del siglo XX esta plasticidad genética ha sido estudiada ampliamente (Ortega *et al.*, 2013).

El genoma del maíz se dio a conocer en el año 2009 por Schnable y colaboradores, y aunque no ha sido explorada a profundidad la vasta diversidad que éste posee, es utilizado extensivamente como modelo en estudios básicos de biología y genética.



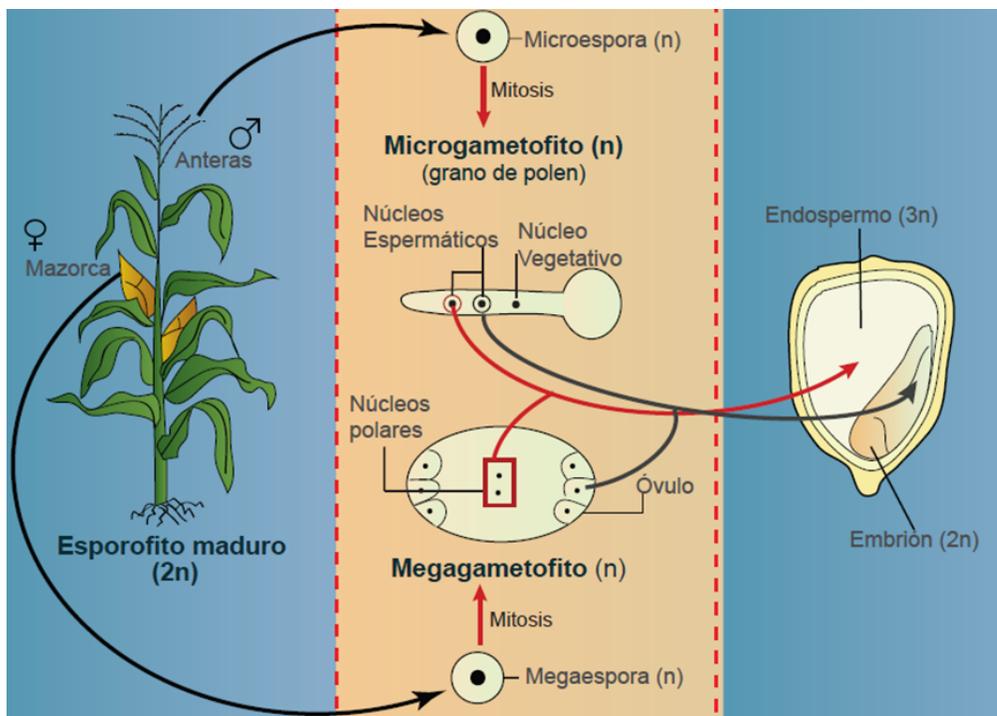
**Figura 1. Producción mundial de maíz, 2006/07 – 2016/17 (millones de toneladas).** \*Estimado. Fuente: USDA.

Todos los tipos cultivados de maíz se clasifican como *Zea mays ssp. mays*. La evidencia botánica, genética y citológica indica que existe un origen común para todos estos tipos de maíz. La mayoría de los investigadores coincide en que este cultivo se desarrolló a partir de una planta anual llamada teocintle (*Zea spp.*); sin embargo, existen otros que se inclinan por que el maíz se originó como un maíz salvaje que ahora está extinto (Cai, 2006). Botánicamente, el maíz pertenece a la familia de las gramíneas o poáceas (Poaceae) y es una planta anual con un sistema extenso de raíces fibroso y con un solo tallo que mide de 1 a 4 m de longitud. El grano se desarrolla en las mazorcas y cada una de éstas contiene de 300 a 1000 granos (Cai, 2006; Paliwal *et al.*, 2001)

### 3.1.1 Reproducción sexual del maíz.

El maíz, como excepción entre todos los cereales importantes, tiene inflorescencias masculinas y femeninas separadas que se forman sobre la misma planta. En la parte superior de la planta se desarrolla la inflorescencia masculina o panoja, con una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales que producen abundantes granos de polen, encargados de fecundar el órgano femenino o mazorca, que se forma más abajo a partir de dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta.

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



**Figura 2. Modelo de Reproducción sexual de maíz.** Se muestran las inflorescencias femeninas (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).

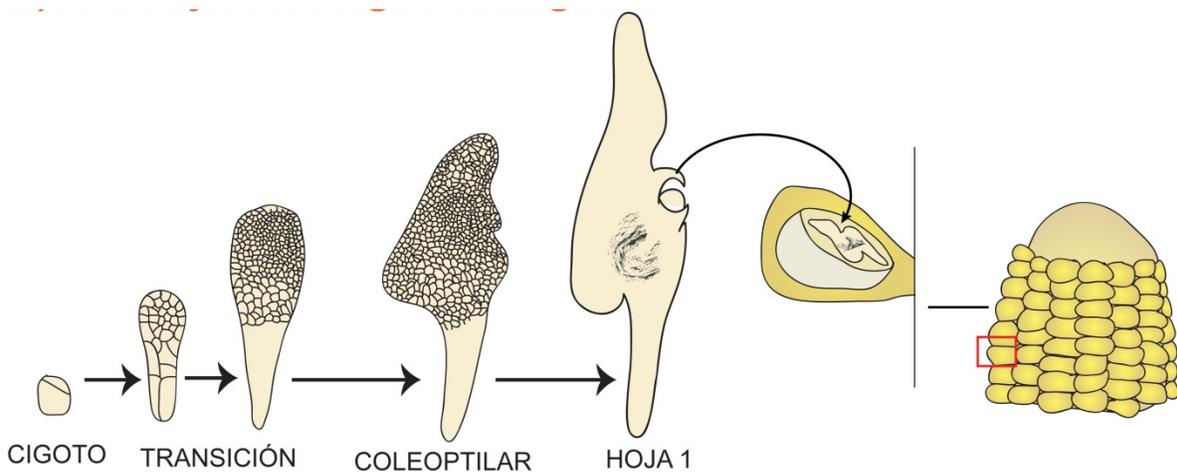
La polinización es la primera de las etapas para la formación de la semilla. La siguiente etapa es el desarrollo del tubo polínico que se extiende hasta el saco embrionario. La tercera etapa es la doble fertilización, que es un proceso de fecundación característico de angiospermas (Figura 2). En la fecundación, participan los dos núcleos espermáticos, uno de ellos se combina con el núcleo del gameto femenino para dar un cigoto diploide y el

segundo núcleo se fusiona con los núcleos polares del megagametofito para formar un núcleo triploide ( $3n$ ), que se dividirá para formar un tejido triploide llamado endospermo, que servirá como nutrimento para el embrión durante su desarrollo hasta semilla madura (Becraft, 2007; Paliwal *et al.*, 2001).

### 3.2 Embriogénesis cigótica.

La embriogénesis cigótica es una etapa de desarrollo que inicia a partir de la fertilización y formación del cigoto (que es unicelular), y continúa durante etapas coordinadas para formar un embrión maduro (estructura multicelular), que estará preservado dentro de la semilla (Yang & Zhang, 2010). Esta etapa es muy importante porque en ella se forman los meristemas y primordios que dan lugar a los órganos vegetativos que se diferenciarán en la planta madura (Goldberg *et al.*, 1994).

En el maíz se han caracterizado diversas fases de desarrollo durante la embriogénesis cigótica (Figura 3).



**Figura 3. Modelo de embriogénesis cigótica en *Z. Mays*.** Diferentes etapas caracterizadas en maíz (Modificado de Nardmann & Werr, 2009).

La primera fase es llamada etapa proembrionaria, donde las primeras divisiones celulares del cigoto (que es diploide) son asimétricas y dan origen a una célula apical que se desarrollará en el embrión, y una célula basal que formará al suspensor. La siguiente etapa es la de transición, donde el embrión y el suspensor se alargan mediante más divisiones celulares. Las células originadas a partir de la célula apical son pequeñas y ricas en

citoplasma, mientras que las células del suspensor son largas y vacuolizadas. Después, comienza a ser aparente el meristemo apical en secciones de los embriones en etapa coleoptilar, así como una pequeña protuberancia que es donde emerge la punta del coleoptilo. Al final de la etapa coleoptilar, el escutelo se alarga apical, basal y lateralmente. Las etapas tardías de la embriogénesis se nombran acorde al número de hojas, que van desde la 1 hasta la 6. La última fase de la embriogénesis es la maduración, donde productos como lípidos acumulados en el escutelo aumentan y conforman una parte significativa del embrión, mientras que el suspensor es degradado mediante apoptosis (Nardmann & Werr, 2009).

### 3.3 Embriogénesis somática.

Alternativamente a la embriogénesis cigótica, una planta puede ser derivada de una o un grupo de células somáticas. Este proceso de regeneración es conocido como embriogénesis somática. En términos generales, la embriogénesis somática es un proceso de desarrollo por el cual células somáticas diferenciadas, bajo las condiciones de inducción adecuadas, generan células embriogénicas indiferenciadas (Yang & Zhang, 2010). Cuando una especie vegetal es cultivada sobre un medio sintético, los explantes de los cuales se parte para iniciar el cultivo *in vitro* se van a desdiferenciar para proliferar en forma de células con la capacidad de generar embriones somáticos, a este cúmulo de células indiferenciadas se les denomina callos embriogénicos (Bai *et al.*, 2000).

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

tejidos de embriogénesis somática pueden ser utilizados como sistemas modelo para examinar los mecanismos que regulan la expresión de genes y otros eventos moleculares (Zimmerman, 1993).

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

Una de las limitaciones que se ha visto en este proceso es que la capacidad de producir callos embriogénicos parece ser dependiente del genotipo y tejido. Estas disparidades entre la capacidad embriogénica podrían reflejar las diferencias entre el funcionamiento de elementos clave en las vías embriogénicas (Merkle et al., 1995). En el maíz, el tipo de explante y el fondo genético de la variedad son determinantes en el establecimiento de cultivos embriogénicos. Los embriones inmaduros, cosechados en un periodo entre 12 y 18 días después de la polinización, son los mejores explantes para el establecimiento de cultivos embriogénicos, debido a que los callos que se obtienen de estos tejidos muestran una alta eficiencia de regeneración (Garrocho-Villegas *et al.* 2012).

Existe un medio de cultivo capaz de mejorar la formación, crecimiento y diferenciación de callos embriogénicos, que originalmente fue reportado en arroz (Chih-Ching *et al.*, 1975). Éste es conocido como medio N6 y contiene  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  combinado con  $\text{KNO}_3$  a bajas concentraciones. Dicho medio ha pasado por numerosas mejoras para la regeneración del maíz mediante embriogénesis somática. Actualmente, las vitaminas del medio N6 se han sustituido por una combinación de fuentes de nitrógeno y vitaminas llamada “coctel 20”, que ha mostrado un incremento en la eficiencia para la regeneración de embriones (Garrocho-Villegas *et al.*, 2012).

Para la iniciación y propagación de callos embriogénicos, se usan hormonas que regulan la reprogramación del desarrollo. En este sentido, las auxinas y citocininas son los mejores reguladores, ya que están relacionadas con la regulación de la división y diferenciación celular (Jakubekova *et al.*, 2011).

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

El ácido 3-indolacético (IAA) es la auxina predominante en plantas; sin embargo, existen derivados sintéticos de auxinas que también son muy usados, tal es el caso del ácido 2,4-diclorofenoxiacético. El efecto de la auxina en el crecimiento de la planta depende del tipo de auxina aplicada y de su concentración. Las auxinas influyen en aspectos de la división celular, elongación de las células y diferenciación; la manera exacta en la que están involucradas en cada proceso no es completamente entendido (Teale *et al.*, 2006).

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

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

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

En la embriogénesis somática, las auxinas tienen un rol fundamental ya que son capaces de alterar el programa genético fisiológico de los tejidos de explante. Las células responden a

las auxinas, se reprograman y comienzan a dividirse. Se sabe que la aplicación de ciertas auxinas causa la hipermetilación del DNA, sugiriendo que este mecanismo epigenético es pivote para la reprogramación y desdiferenciación de células (Machakova *et.al.*, 2008). Sin importar la naturaleza de la auxina, ésta es percibida por receptores celulares para desencadenar una cascada de transducción de señales con un efecto fisiológico marcado: una expansión celular, aumento de la división, desdiferenciación y/u organogénesis, dependiendo de la concentración de la auxina aplicada.

En el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de UNAM, se ha desarrollado un protocolo de embriogénesis somática indirecta (figura 4). Se utilizan embriones inmaduros de maíz cosechados en un periodo entre 14 y 18 días después de la polinización para generar la inducción de cultivos de callos embriogénicos. Para la iniciación y la propagación se utiliza medio N6, el cual tiene la capacidad de mejorar la formación, crecimiento y diferenciación de callos embriogénicos al ser enriquecido con auxinas sintéticas como el ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) y condiciones de oscuridad. Transcurridos 7 días después de la inducción, se subcultivan los embriones en medio N6 con cinetina, una citocinina que en conjunto con el 2,4-D potencia la división celular y proliferación de callos embriogénicos. En este medio, se realizan los subcultivos cada dos semanas. Estos cultivos pueden mantenerse en proliferación hasta por dos años y regenerar una planta al retirarse la auxina, la cinetina y exponiendo los tejidos a la luz (Jakubekova *et al.*, 2011).

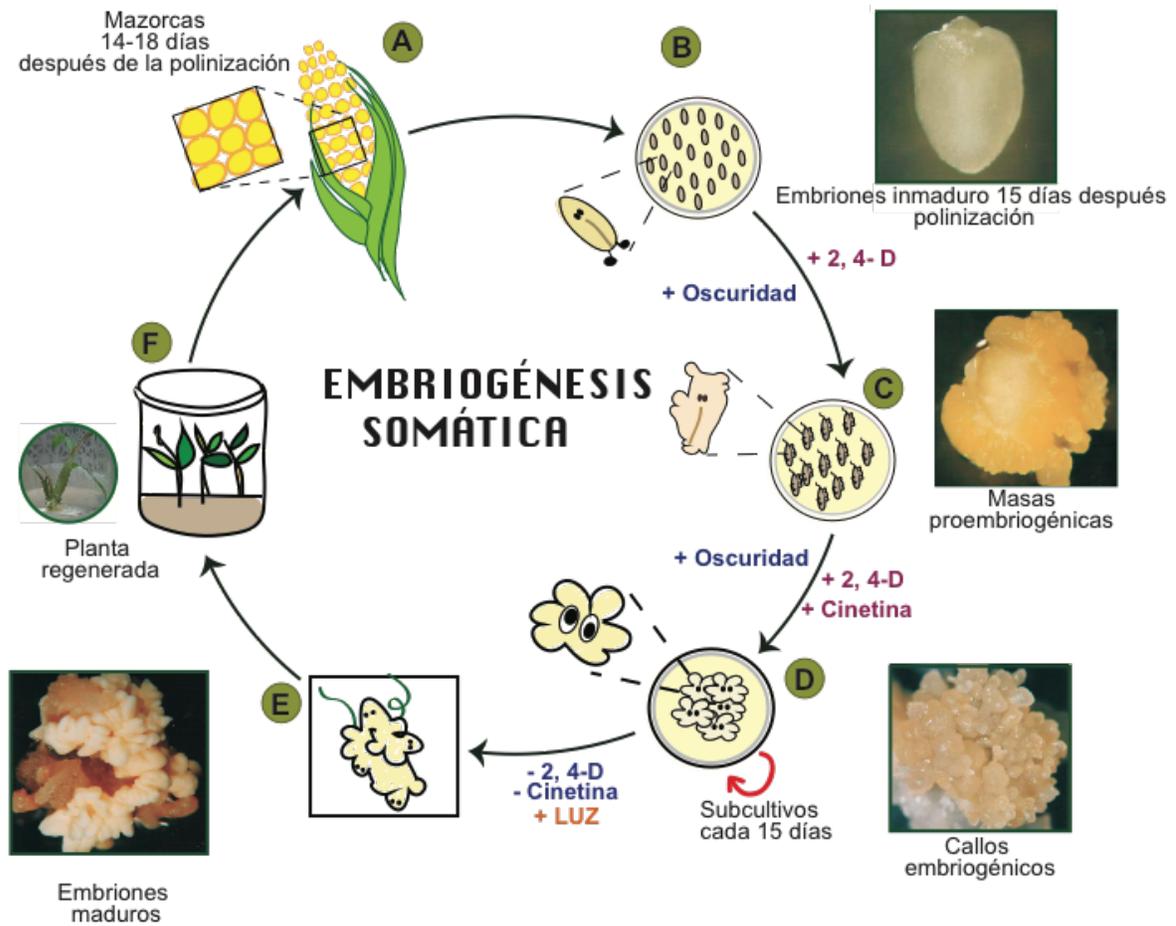


Figura 4. Esquema de la inducción, propagación y regeneración en embriogénesis somática de maíz (Jakubekova *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que uno de los posibles mecanismos regulatorios involucrados en la inducción de la embriogénesis somática es el mediado por RNAs pequeños (sRNAs); quienes se han evidenciado como moléculas clave en el desarrollo, crecimiento y respuestas a condiciones adversas de las plantas (Ramachandran & Chen, 2008; Katiyar-Agarwal & Jin, 2010).

### 3.4 RNAs pequeños (sRNAs)

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

Los sRNAs en plantas pueden ser clasificados principalmente en: microRNAs (miRNAs); RNAs pequeños interferentes heterocromáticos (hc-siRNAs); RNAs pequeños interferentes producidos en fase (phasiRNAs); y RNAs pequeños interferentes derivados de transcritos naturales antisentido (NAT-siRNAs). Estas categorías son definidas de acuerdo su origen y biogénesis (Tabla 1; Chen, 2009; Axtell, 2013).

**Tabla 1. Principales clases de sRNAs en plantas.**

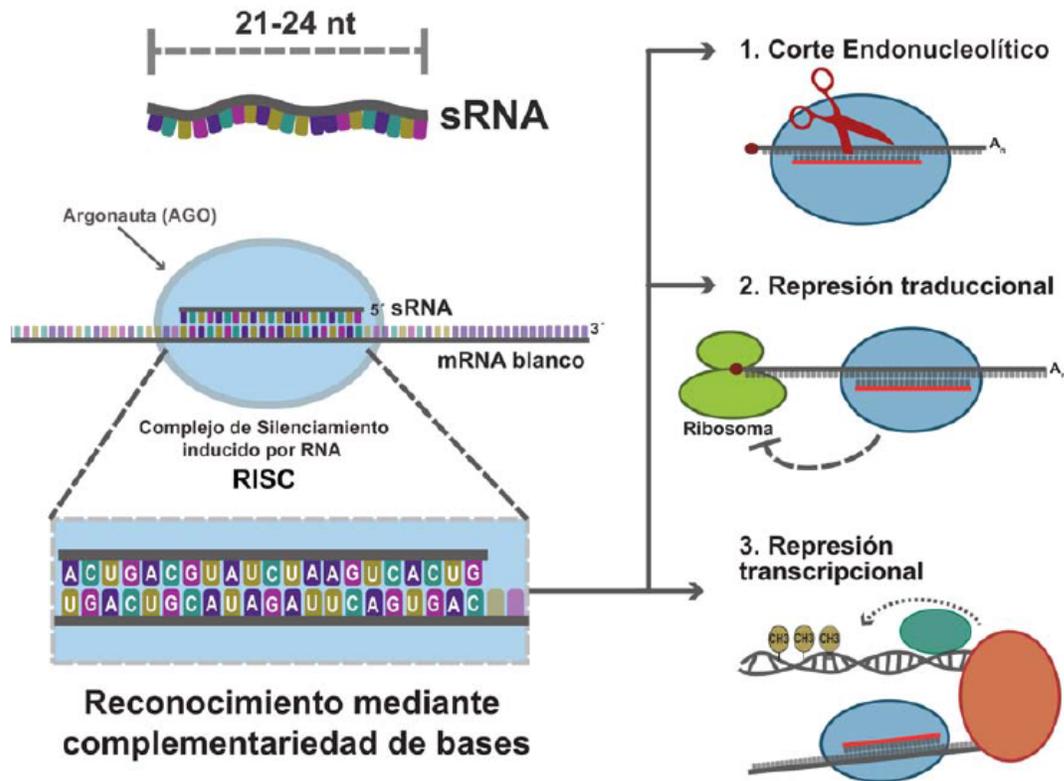
Clase	Descripción	Tamaño	Origen Genómico	Función
<b>miRNAs</b>	microRNAs	21 nt	Genes MIR	Regulación de la estabilidad del mRNA y su traducción
<b>phasiRNAs</b>	RNAs pequeños de interferencia en fase	21 nt	Loci PHAS	Regulación postranscripcional
<b>hc-siRNAs</b>	RNAs pequeños de interferencia heterocromáticos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

Conceptualmente, todos los eventos regulatorios mediados por cualquier sRNA pueden considerarse como el evento final de varios pasos consecutivos: la biogénesis del sRNA, la selección de la cadena efectora (en los casos donde el precursor es dsRNA), la incorporación de la cadena seleccionada en una proteína Argonauta (AGO), la identificación del blanco y el silenciamiento (Czech & Hannon, 2011).

La biogénesis de la mayoría de las clases de sRNAs, incluyendo microRNAs y a muchos siRNAs, requiere la acción de proteínas de la familia RNasa III, como Dicer o Dicer-like (DCL). Sin embargo, algunas clases de sRNAs en animales, incluyendo a los RNAs asociados a PIWI (piRNAs) y siRNAs secundarios en gusano, no son derivados de precursores de dsRNA y son producidos mediante mecanismos de biogénesis independientes de la familia de enzimas RNasa III (Brennecke, 2007).

Posteriormente a su producción, los sRNAs se incorporan con una proteína AGO específica, que funciona como el elemento central en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Czech & Hannon, 2011).

Entonces, el sistema de silenciamiento genético mediado por sRNAs es un sistema en el cual el sRNA es guiado a través de AGO en el complejo RISC para ejercer la actividad de silenciamiento. Mientras que AGO ejerce la actividad enzimática de silenciamiento, el sRNA dirige el complejo a los RNAs blanco por complementariedad (Chen, 2009). La función reguladora que ejerce RISC se basa en el reconocimiento de transcritos específicos mediante un reconocimiento RNA-RNA perfecto o parcialmente imperfecto (Tang, 2005). Algunas subclases de sRNAs requieren para su biogénesis o función otras enzimas como las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs), algunas proteínas de unión a dsRNA o chaperonas (Chen, 2009). Una vez que el complejo RISC encuentra al RNA blanco se llevará a cabo el silenciamiento por uno de tres mecanismos: escisión del mRNA blanco, represión traduccional o represión transcripcional mediante la metilación del DNA o modificaciones de histonas (Figura 5; Lee *et al.*, 2012).

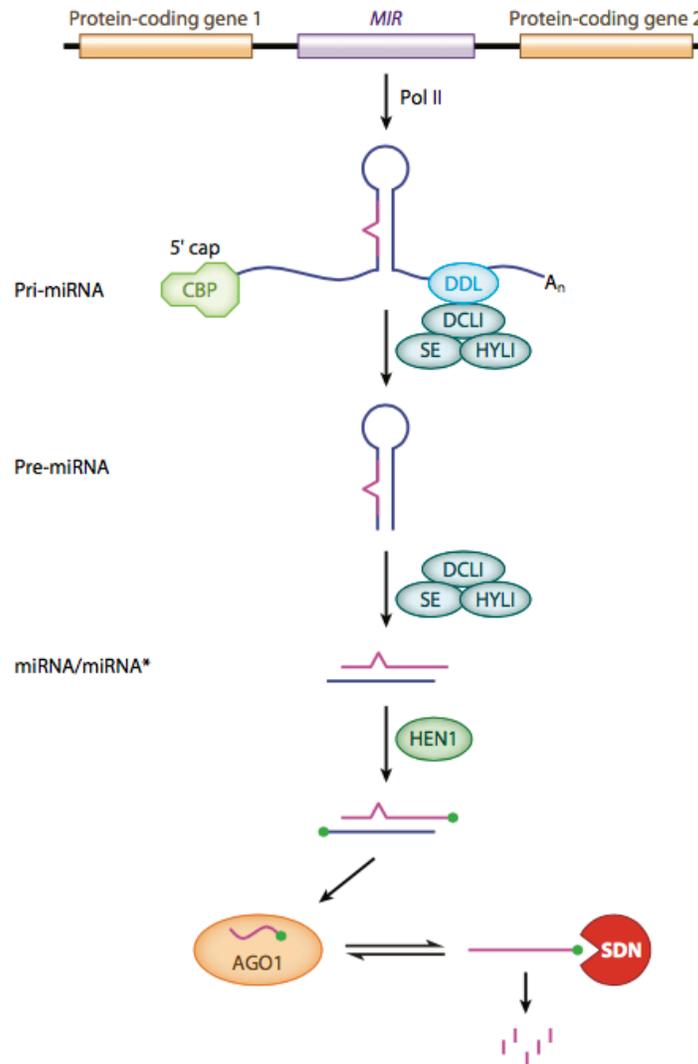


**Figura 5. Mecanismos de silenciamiento genético por RNAs pequeños.** Los RNAs pequeños se encuentran unidos a una proteína ArgonAUTA formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Para la regulación génica, RISC puede (1) Realizar un corte endonucleolítico al mRNA blanco, (2) Reprimir 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).

La regulación mediada por miRNAs es fundamentalmente a través de la escisión del mRNA blanco y/o su represión traduccional (eventos a nivel posttranscripcional), mientras que los siRNAs pueden regular a nivel post-transcripcional o transcripcional. (Lee, Li & Meyers, 2012).

La biogénesis de miRNAs es un proceso de múltiples pasos que incluyen la transcripción, el procesamiento, modificación y la carga en RISC (Figura 6). Un gen MIR es transcrito por la Polimerasa II en un pri-miRNA, al cual se le agrega un cap y, además, es poliadenilado. Éste pri-miRNA es procesado en un precursor stem-loop (llamado pre-miRNA) por una proteína DCL, usualmente DCL1 en *Arabidopsis* (Park et al. 2002; Reinhart et al. 2002). El pre-miRNA posteriormente es procesado por DCL1 en un dúplex de miRNA-5P/miRNA-3P. DCL1 actúa con otras dos proteínas: HYL1 (una proteína de

unión a RNA de doble cadena) y SE (una proteína dedo de zinc) (Han *et al.* 2004). Una proteína nuclear de unión a RNA, DDL, que interactúa con DCL1, promueve (pero no es esencial para ello) la acumulación de miRNA. El dúplex miRNA-5P/miRNA-3P es metilado por HEN1 (Yu *et al.* 2005). Una de las cadenas del dúplex es cargada en una proteína AGO formando el miRISC (Baumberger & Baulcombe, 2005). El miRNA es exportado del núcleo al citoplasma a través de factores de exportación que incluyen a la proteína HASTY (Park *et al.*, 2005). Finalmente, la familia de exonucleasas SDN1 degrada miRNAs de cadena sencilla para limitar sus niveles basales (Chen, 2009).



**Figura 6. Biogénesis y degradación de miRNAs.** Un gen de planta de microRNA (*MIR*) está localizado entre dos genes codificantes. El gen *MIR* es transcrito en un pri-miRNA, se le agrega un cap y es poliadenilado. El pri-miRNA es procesado en pre-miRNA, el cual es posteriormente procesado en el dúplex miRNA-5P/miRNA-3P. El dúplex es metilado por HEN1 y el miRNA-5P es cargado en el complejo AGO1. El complejo heterodimérico de unión a cap (CBP) y la proteína de unión a RNA DDL promueven la biogénesis del miRNA pero no son esenciales. DDL, DAWDLE; DCLI, DICER-LIKE1; SE, SERRATE; HYL1, HYONASTIC LEAVES1; AGO1, ARGONAUTE1; SDN, SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (Chen, 2009).

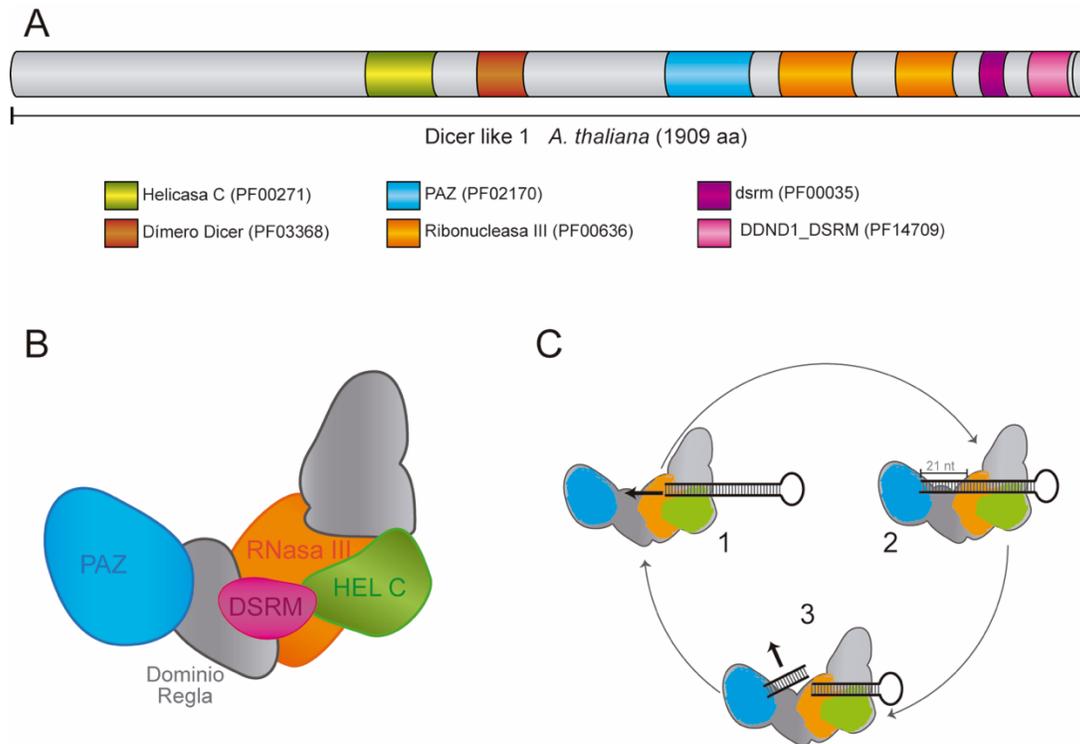
### 3.5 Proteínas Dicer-like (DCL)

En plantas, el procesamiento de los dsRNAs o hpRNAs para producir sRNAs lo realizan enzimas denominadas Dicer-like (DCL) por su homología con Dicer, las enzimas encontradas en mamíferos como responsables de la biogénesis de sRNAs (Finnegan & Matzke, 2003). Las DCL son endonucleasas (RNasa Tipo III) que actúan sobre dsRNAs para producir dsRNAs pequeños de 21-24 nt de longitud con 2 o 3 nucleótidos sobresalientes en cada cadena en el extremo 3' (Chen, 2009).

Se clasifican dentro de la subfamilia de enzimas Dicer, las cuales tienen varios dominios característicos: dos dominios RNasa III (RNasa IIIa y RNasa IIIb), un dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD), un dominio PAZ (Piwi Argonauta Zwiller) y un dominio helicasa. (Figura 7; Gan et al., 2008; Cárdenas Monroy *et al.*, 2016). Mutaciones en el dominio helicasa de DCL1 en *Arabidopsis thaliana* (AtDCL1) mostraron su relevancia para el procesamiento de algunos 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 que requiere ATP para los múltiples cortes a lo largo de los dsRNA. Los dominios RNasa III contienen 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 dúplex de sRNAs. El dominio PAZ se encuentra involucrado en la unión de los extremos 3' del dsRNA y el posicionamiento de la molécula en el centro de procesamiento RNasa III. Recientemente, se ha obtenido evidencia de que la distancia entre PAZ y el centro de procesamiento define el tamaño en los productos de corte del dsRNA, lo que explica el porqué cada una de las proteínas DCL en plantas genera dsRNAs con longitudes específicas. Por último, el dominio dsRBD se encuentra en el extremo carboxilo terminal, adoptando una estructura tipo "binding pocket" para crear una interfase de unión entre la proteína y el dsRNA (Figura 7; Pare & Hobman, 2007; Cárdenas Monroy *et al.*, 2016).

En relación con animales y hongos, las plantas presentan una expansión de la familia DCL, reflejando una mayor versatilidad en la implementación del silenciamiento por mRNA. (Mukherjee et al., 2013)

Análisis bioquímicos y genéticos muestran especificidad y redundancia en las funciones de DCLs durante el metabolismo de sRNAs. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado cuatro genes correspondientes a DCL (DCL1-4). Las proteínas DCL parecen ser específicas para procesar un tipo particular de precursor 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 sustratos de dsRNA y ésta depende del tamaño del dsRNA y la identidad del nucleótido 5' del dúplex. 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). En algunos casos de mutantes de DCLs, como AtDCL1 y la correspondiente de arroz, OsDCL1, se generan fenotipos letales (Song *et al.*, 2007). Otros estudios muestran que las DCLs se expresan de manera ubicua en todos los tejidos, pero lo hacen de manera diferencial en las distintas etapas del 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 del tallo. Además, la respuesta de la expresión de las DCLs a la sequía, frío y salinidad es diferente, por lo que podrían tener mecanismos regulatorios especializados en respuesta a los diferentes tipos de estrés abióticos (Liu et al., 2009).



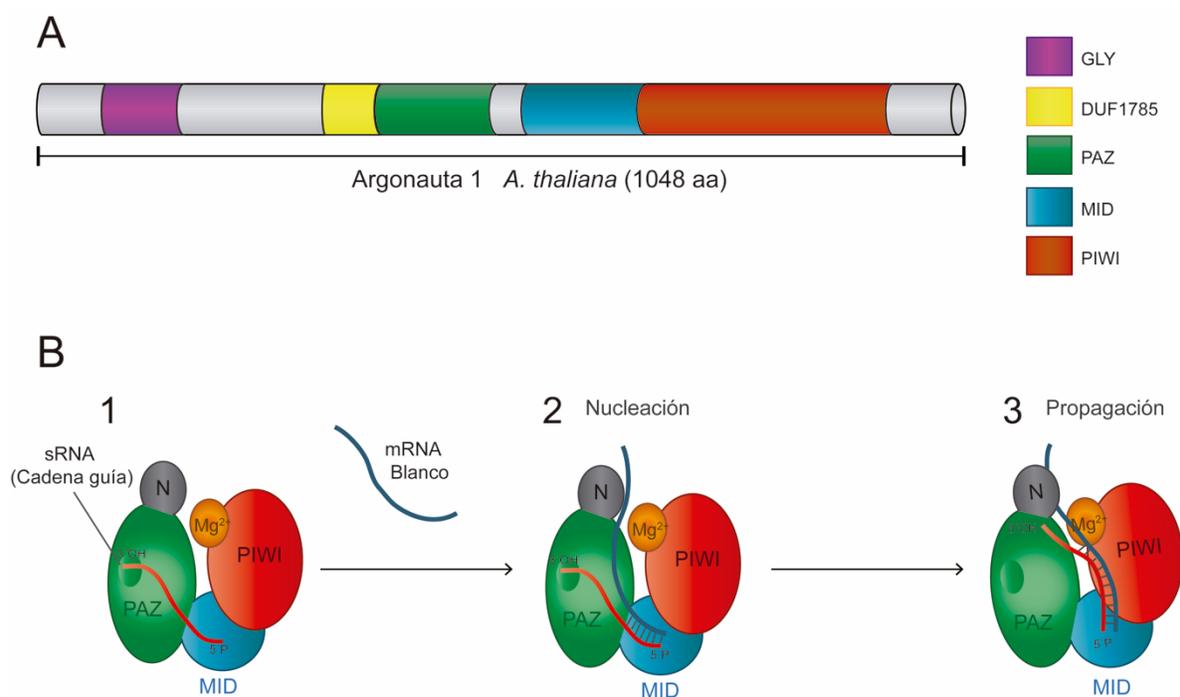
**Figura 7. Modelo estructural de Dicer-like (DCL).** A, Dominios característicos de DCL1 en *Arabidopsis thaliana*. B, Arreglo espacial de los dominios de DCL1 para formar el centro de procesamiento de RNasa III y el dominio “Regla” de separación entre PAZ y RNasa III. C, Ubicación del sustrato de RNA en el centro de procesamiento de DCL1 (Cárdenas Monroy *et al.*, 2016).

### 3.6 Proteínas Argonauta (AGO)

Las proteínas Argonauta (AGO) juegan un papel crucial en todas las vías de regulación mediadas por sRNAs en plantas. Los diferentes tipos de sRNAs se asocian con diferentes miembros de la familia AGO. En eucariontes, la familia de proteínas tipo AGO puede ser dividida en 3 grupos; los miembros del grupo 1 se unen a miRNAs y siRNAs, y son conocidas como proteínas AGO, los miembros del grupo 2 se unen a RNAs asociados a PIWI (piRNAs) y se conocen como proteínas PIWI, los miembros del grupo 3 han sido descritos únicamente en gusanos, dónde se unen a siRNAs secundarios (Vaucheret, 2008). El número y la diversidad de las AGO varía entre diferentes organismos; por ejemplo, el genoma de *Arabidopsis thaliana* reveló la presencia de 10 genes que correspondían a proteínas del grupo AGO. Todas las proteínas AGO contienen un dominio PAZ, uno MID y otro PIWI. Están divididas en clados con base en su relación filogenética y en su capacidad para unirse a RNAs pequeños (Vaucheret, 2008). La organización de los

dominios catalíticos y de unión a RNA juegan un papel crucial en el reconocimiento específico de sRNAs (Singh, 2015).

Mediante cristalografía de Rayos X de AGO a partir de *Thermus thermophilus* (TtAGO) y *Pyrococcus furiosus* (PfAGO) se determinó que la proteína posee una estructura bilobular (Figura 8). El lóbulo PAZ se encuentra compuesto por el extremo amino terminal y el dominio PAZ, mientras que el lóbulo PIWI se encuentra conformado por los dominios MID y PIWI. El dominio MID ancla el extremo 5' fosfato del sRNA, mientras que el dominio PAZ reconoce el extremo 3' terminal del mismo. El dominio PIWI adopta una estructura doblada similar a la de las enzimas RNasaH y muestra actividad endonucleasa, dicha actividad es llevada a cabo por un sitio activo que generalmente consta de un motivo Asp-Asp-His (DDH). Las proteínas AGO interactúan a través de sus dominios PIWI con proteínas GW (repetidas glicina-triptófano) (Wang et al., 2009; Swarts et al., 2014; Vaucheret, 2008).



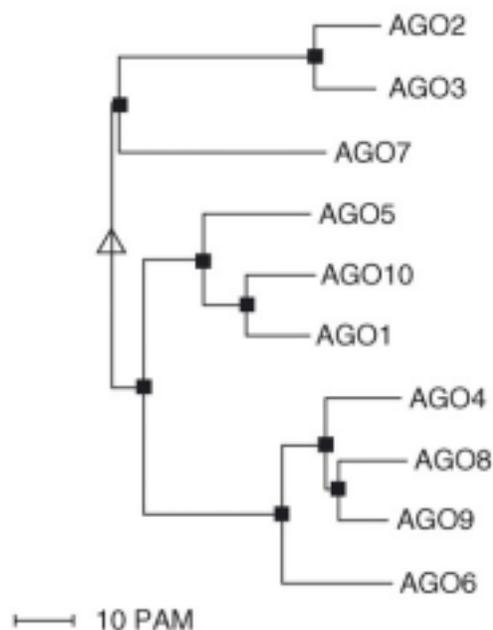
**Figura 8. Modelo estructural de Argonauta (AGO).** A, Dominios característicos de AGO1 en *Arabidopsis thaliana*. PAZ y PIWI se encuentran conservados en todas las AGO, mientras que los MID y Gly sólo están presentes en algunos miembros de la familia en plantas. B, Funcionamiento del complejo AGO-sRNA en el reconocimiento de su RNA blanco de silenciamiento (Cardenas Monroy *et al.*, 2016)

La presencia de un motivo DDH no implica necesariamente una actividad de escisión “slicer”. De manera recíproca, la ausencia de éste no impide a la proteína tener esta actividad. Por otro lado, también es posible generar represión traduccional de los RNA blanco mediante mecanismos que aún no son bien entendidos (Vaucheret, 2008).

Cuando el complejo AGO/sRNA reconoce a un RNA blanco por complementariedad, se forma el complejo ternario. En este complejo, el apareamiento entre el RNA blanco y el sRNA comienza desde el extremo 5' del sRNA que permanece unido al dominio MID, propiciando un cambio conformacional en el dominio PAZ para liberar el extremo 3' del sRNA y así permitir la propagación del apareamiento sRNA-RNA (Figura 8; Wang et al., 2009). Este proceso se conoce como nucleación y permite posicionar al RNA en el sitio activo del dominio PIWI. La presencia de dos cationes divalentes unidos al motivo DDH propicia el debido silenciamiento del RNA blanco (Swarts et al., 2014).

### 3.6.1 Algunas funciones de las proteínas AGO de plantas.

Análisis filogenéticos agrupan a las proteínas AGO de plantas en tres clados (Figura 9). *Arabidopsis thaliana* presenta la siguiente distribución de sus diez miembros en los tres clados: AtAGO1, AtAGO5 y AtAGO10 en el primer clado; AtAGO2, AtAGO3 y AtAGO7 en el segundo clado; y AtAGO4, AtAGO6, AtAGO8 y AtAGO9 en el tercero (Vaucheret, 2008).



**Figura 9. Clasificación filogenética de las proteínas AGO de *Arabidopsis thaliana* en 3 clados.** Las secuencias de las proteínas fueron alineadas usando Multialin. PAM indica el punto de mutación aceptado (Vaucheret, 2008).

## **Clado 1.**

**AGO1.** Se considera el miembro fundador de la familia AGO y fue descubierto a través de la identificación de mutantes de *Arabidopsis* que exhibían defectos pleiotrópicos en el desarrollo (Bohmert *et al.*, 1998).

Un indicio de que AGO1 tiene un papel en la vía de miRNA fue mostrado por la polaridad en los defectos de órganos pertenecientes a las mutantes *ago1*. En estas mutantes, la acumulación de miRNAs es reducida y, recíprocamente, la acumulación del mRNA blanco del miRNA se incrementa, indicando que AGO1 es necesaria para mantener la integridad de la vía de miRNAs. Diferentes ensayos de inmunoprecipitación indican que AGO1 se une a miRNAs, los cuales son procesados por DCL1, y a diferentes clases de siRNAs. AGO1 preferentemente se asocia con sRNAs que tienen un uracilo 5' terminal. Debido a que la mayoría de los miRNAs tienen un uracilo 5' terminal, AGO1 es la AGO más importante en la vía de miRNAs (Montgomery *et al.*, 2008)

La localización celular de AGO1 parece ser dinámica. De hecho, precursores de miRNAs y otras proteínas involucradas en la biogénesis de miRNAs como SERRATE (SE), HYPNONASTIC LEAVES (HYL1) y DCL1 se localizan en los cuerpos D, los cuales contienen también a AGO1. Esto sugiere que la biogénesis de miRNAs y su acción está ligada, por lo menos en algunos casos. Sin embargo, AGO1 media el silenciamiento de RNAs virales citoplasmáticos, lo que indica que también actúa en el citoplasma (Song *et al.*, 2007)

Debido a que AGO1 tiene un rol importante, su expresión se mantiene bajo estricto chequeo. La homeostasis de AGO1 es llevada, en parte, a través de la regulación por miR168 que tiene como blanco al mRNA de AGO1. Esta retroalimentación mantiene un balance correcto de los niveles normales de miRNA (Vaucheret, 2006). AGO1 es normalmente limitada y el nivel de AGO1 se mantiene en equilibrio gracias al efecto doble de miR168 en el mRNA de AGO1 y la proteína AGO1 en la expresión de miR168 (Vaucheret, 2004).

**AGO10** es el parálogo más cercano a AGO1. Análisis de mutantes simples *ago1* y *ago10* muestran que existen funciones redundantes entre estas dos proteínas, por lo menos en algunos aspectos de desarrollo. Las dobles mutantes nulas *ago1:ago10* son letales (Lynn, 1999).

AGO1 y AGO10 actúan redundantemente durante el desarrollo post-embionario. Debido a que AGO1 actúa en las vías de miRNA y siRNA, es posible que AGO10 también participe en éstas, al menos en algunos tejidos (Takeda *et al.*, 2008).

**AGO5** es el parólogo más cercano a AGO1 después de AGO10. Se localiza en el núcleo y en el citoplasma. Ensayos de inmunoprecipitación indican que AGO5 se asocia preferentemente con RNAs pequeños con citosina 5'-terminal. miR169 es uno de los pocos miRNAs que tienen un 5'C (Takeda *et al.*, 2008).

### **Clado 2**

**AGO7.** Ensayos de inmunoprecipitación indican que AGO7 se asocia preferentemente con miR390, el cual guía su unión al precursor de tasiRNAs TAS3. Se une a sitios duales de miR390 en el precursor pero ejerce la escisión únicamente en el sitio 3' (Montgomery *et al.*, 2008).

**AGO2 y AGO3.** Son las únicas AGO de Arabidopsis que carecen de un motivo DDH en su dominio PIWI (Baumberger, 2005). En cambio, AGO2 y AGO3 tienen un motivo degenerado DDD similar al de las enzimas RNasaH en bacteria. Son muy similares entre sí, lo cual sugiere que surgieron de una reciente duplicación, ya que ambos genes están organizados en tándem con solo 3kb de separación entre el codón de paro de AGO2 y el de inicio de AGO3. Por lo cual es probable que ambas proteínas tengan actividades similares y/o funciones redundantes (Lobbes *et al.*, 2006).

### **Clado 3.**

**AGO4.** Ensayos de inmunoprecipitación revelaron que AGO4 se asocia preferentemente con sRNAs de 24 nt que contienen una adenosina en su extremo 5' terminal. Algunos miRNAs que tienen adenosina en el 5' (como miR172 y miR390) se pueden asociar con AGO1 y AGO4. Sin embargo, la relevancia biológica no está clara, ya que las mutantes de *ago4* no muestran un fenotipo claro cuando se trata de regular miR172 o miR390 (Mi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2006).

**AGO6.** Análisis de acumulación de sRNAs endógenos y metilación de DNA de los blancos correspondientes revelaron que AGO6 actúa específicamente en las vías de silenciamiento mediadas por siRNAs y que su actividad es parcialmente redundante con la de AGO4 (Zheng, 2007).

**AGO8 y AGO9.** Son muy similares en secuencia y están separados uno de otro por 50kb, lo que sugiere que se duplicaron recientemente. Por tanto, es posible que ambas tengan actividades similares y que los dos genes actúen redundantemente. El mRNA de AGO8 se expresa a bajos niveles en todos los tejidos de Arabidopsis y muestra un desplazamiento de marco de lectura inducido por splicing, lo que sugiere que es un pseudogen (Takeda, 2008). En contraste, el mensajero de AGO9 es expresado a mayores niveles, sin embargo, sus funciones también son desconocidas (Takeda, 2008; Katiyar-Agarwal, 2007).

## 4 ANTECEDENTES

En plantas, el papel de los sRNAs durante el desarrollo, crecimiento y respuesta a condiciones adversas ha sido extensivamente estudiado. En el laboratorio, se ha abordado la función de los sRNAs en la embriogénesis somática de maíz, particularmente durante la inducción de callos embriogénicos, el subcultivo prolongado de estos y la regeneración de plantas por esta vía. Se ha observado que el tiempo de subcultivo puede influir en el patrón de expresión de sRNAs específicos y en la estimulación para la regeneración de plantas (Dinkova y Alejandri-Ramírez, 2014). Al analizar las etapas de inducción, establecimiento y proliferación prolongada de callos embriogénicos, se encontró que hay cambios importantes en las poblaciones correspondientes a miRNAs y hc-siRNAs en las transiciones de inducción (de embrión inmaduro a callos de un mes) y establecimiento (entre callos de un mes a cuatro meses de subcultivo), mientras que los cambios observados durante la proliferación ya establecida suelen ser menores durante el primer año de subcultivo (Alejandri-Ramírez, datos no publicados).

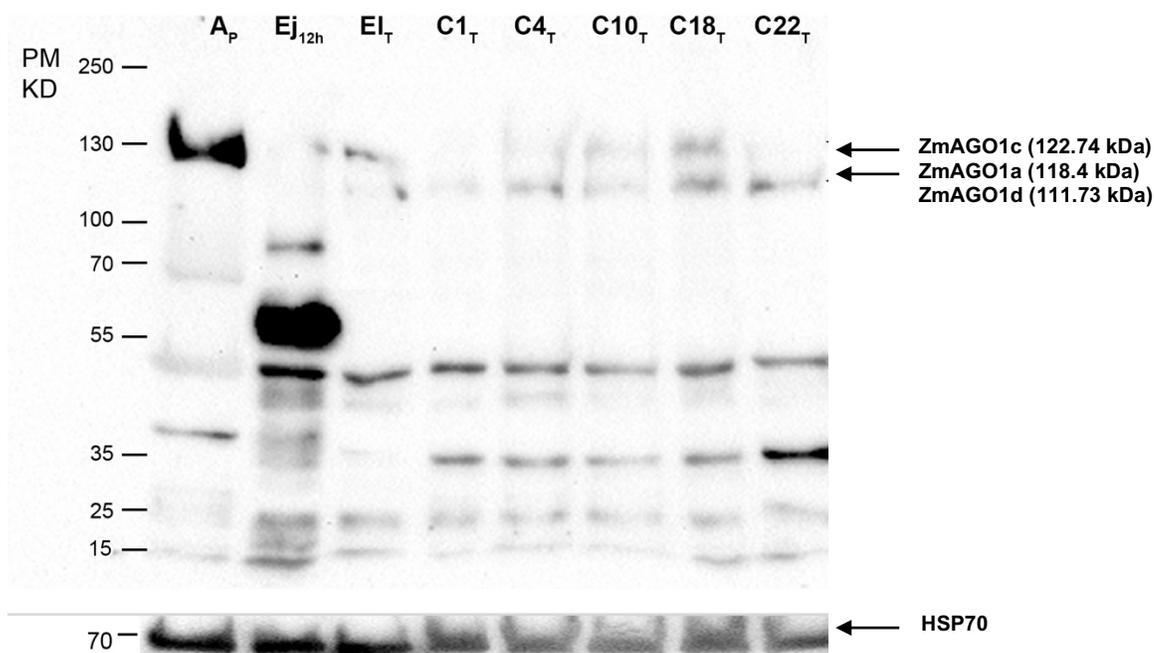
Una manera de explicar el cambio observado en las poblaciones de sRNAs podría ser a través de la expresión de la maquinaria de biogénesis. Se ha visto que un cambio en la expresión de esta maquinaria podría desencadenar una expresión diferencial de sRNAs; por lo que un aumento en la expresión de la maquinaria de biogénesis y funcionamiento de las vías de sRNAs podría dar como resultado un aumento en las poblaciones de sRNAs asociados a estas vías (Nobuta *et al.*, 2008).

El análisis *in silico* del genoma reportado para maíz (versión 2.0) arrojó la presencia de 5 DCLs y 24 AGOs, algunas involucradas en la vía de biogénesis de siRNAs y otras en la vía de miRNAs, acorde a la clasificación reportada para la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Juárez-González, 2015). Se analizó la expresión a nivel de RNA de algunas proteínas DCL y AGO, donde se vio que los patrones de expresión para ZmDCL1, ZmDCL3 y ZmAGO1 presentaban un aumento progresivo de su expresión durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz. Utilizando un anticuerpo contra AGO1 de *Arabidopsis* se observó la presencia de varias bandas correspondientes a la masa molecular esperada para los ortólogos predichos *in silico* (Figura 10). En este trabajo, se analizaron extractos de diferentes tejidos, incluyendo embrión inmaduro y callos embriogénicos de diferentes

edades de subcultivo. Aunque las proteínas Argonauta son difíciles de detectar debido a su propensa degradación y poca abundancia, se logró observar que hay patrones diferenciales en la inducción de embriogénesis somática y en germinación de maíz. Acorde a lo mostrado en la figura 10, fue posible observar proteínas tipo AGO1 en maíz (ZmAGO1a-f; Tabla 2). Los patrones de bandas en callos embriogénicos parecen corresponder a las AGO1a/c/d. Debido a que el anticuerpo utilizado no es específico para maíz., cabe la posibilidad de que no todas las bandas representen a proteínas AGO1, por lo que sería importante estudiar la reproducibilidad en los patrones detectados mediante inmunoblot e identificar las proteínas mediante espectrometría de masas. Así mismo, sería importante evaluar los niveles de proteína de ZmDCL1 y ZmDCL3, ya que estos no fueron evaluados.

**Tabla 2. Pesos moleculares esperados para proteínas AGO1 en maíz.** El peso molecular se calculó usando el software ExPASy Compute pI/Mw.

genBank Acc	Proteína	No. aa.	Peso Molecular (kDa)
AQK79604	ZmAGO1a	1079	118.4
AQK45569	ZmAGO1b	968	108.33
ONM14924	ZmAGO1c	1104	122.74
AQK67374	ZmAGO1d	1007	111.73
AQK53962	ZmAGO1 (hipotética)	384	42.5
AQK95696	ZmAGO1f (AGO106)	1093	119.75



**Figura 10. 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 12h de germinación; E<sub>i</sub>: Embrión inmaduro; Callos embriogénicos de 1 (C1), 4 (C4), 10 (C10), 18 (C18) y 22 (C22) meses de cultivo. El subíndice “T” indica que las muestras corresponden a maíz variedad Tuxpeño (VS-535). Anti-AGO1 (1:10000) en buffer TBS-TT. Se utilizó anti-HSP70 como control constitutivo. Juárez-González V.T., 2015. Tesis de Maestría.

## 5 HIPÓTESIS.

- Durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz cambia los niveles/presencia de las diferentes proteínas DCL y AGO responsables de las diferentes vías de biogénesis y funcionamiento de sRNAs.
- Existen diferentes isoformas de la proteína AGO1 de maíz (ZmAGO1) que corresponden al ortólogo AtAGO1 y cuya presencia cambia durante diferentes etapas de la embriogénesis somática.

## 6 OBJETIVOS.

### 6.1 Objetivo General.

- Evaluar la presencia a nivel proteína de DCL1, DCL3 e isoformas de AGO1 en callos embriogénicos de maíz.

## 6.2 Objetivos particulares.

- Estandarizar un método de fraccionamiento de proteínas enriquecidas en alto peso molecular íntegras útil para la identificación de DCL y AGO en callos embriogénicos de maíz.
- Estandarizar de manera reproducible la identificación de proteínas DCL y AGO mediante inmuno réplicas tipo western blot en callos embriogénicos de maíz.
- Localizar isoformas de AGO1 en maíz mediante separación de proteínas en dos dimensiones e inmuno réplicas tipo western blot en callos embriogénicos de maíz.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1 Material Biológico.

Los callos embriogénicos fueron proporcionados por laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de UNAM.

### 7.2 Extracción de proteínas.

Amortiguador de extracción\* (Juárez-González, 2015):

50 mM TRIS-HCl (pH:7.5)

5 mM MgCl<sub>2</sub>

150 mM NaCl

10% Glicerol

\*Agregar al momento de usar:

5 mM Ditioneitol (DTT)

0.1% IGEPAL CA-630 (SIGMA-ALDRICH)

1% 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 un mortero hasta formar un polvo fino blanco, la muestra se mantuvo congelada durante todo el proceso con nitrógeno líquido. Se colocó el polvo en tubos de 1.5 mL (hasta llegar aproximadamente a la marca de 0.5 del

tubo) y se agregaron 0.2 mL de buffer de extracción. Se mezcló en vortex para homogeneizar y se agregó buffer en los tubos que era necesario. Se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min a 4°C. Las muestras se colocaron en hielo y se recuperó el sobrenadante distribuyéndolo en alícuotas de 0.2 mL, que se almacenaron a -70°C.

### 7.3 Concentración de proteína.

Se llevó a cabo mediante el uso de Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices de 50k (número de catálogo: UFC805024). Se centrifugó a 7000 x g durante 20 min. Antes de concentrar, el volumen de muestra que se depositó en cada unidad fue superior a 1.5 mL y no mayor a 2.5 mL. Durante la centrifugación se tuvo cuidado de que el volumen no disminuyera a menos de 200 µL.

### 7.4 Cuantificación de proteínas por método Bradford.

**Estándar.** Se utilizó un estándar 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 7 diluciones, cada una con 2, 5, 8, 10, 12, 15 y 20 µL de estándar BSA (1.0µg/µL) respectivamente, añadiendo el volumen necesario de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> para completar 800µL. Se agregaron 200µL de reactivo concentrado de Bradford (BioRad), se mezcló e incubó a temperatura ambiente (TA) por al menos 5min. Se cuantificó la absorbancia a 595nm.

**Cuantificación de muestras.** Se agregó 1.0 µL de extracto total de proteínas a 799 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 TA por al menos 5 min. Se cuantificó la absorbancia A 595nm.

### 7.5 Electroforesis.

Soluciones:

#### ▪ **Solución I. Por cada 100.0 mL:**

-30.0 g de Acrilamida

-0.8 g de Bis-Acrilamida

\*Agregar H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> cbp 100.0 mL; filtrar a través de filtro de 2 µm de diámetro.

#### ▪ **Solución II. Por cada 100.0 mL:**

-9.07 g TRIS-Hcl (pH: 8.8)

-0.2 g Sodio duodecil sulfato (SDS)

\*Agregar H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> cbp 100.0 mL

▪ **Solución III. Por cada 100.0 mL:**

- 3.03 g TRIS-HCl (pH: 6.8)
- 0.2 g SDS
- \* Agregar H<sub>2</sub>O dd cbp 100.0 mL

▪ **Buffer de carga de proteínas (5X; 20 mL)**

- 240 mM Trizma base
- 0.8% SDS
- 40.0% glicerol
- 0.08% azul de bromofenol
- \* Agregar antes de usar:
- 5.0% β-mercaptoetanol

**Preparación del geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7% (SDS-PAGE).**

▪ **Gel de resolución pH 8.8**

- 2.6 mL Solución I
- 5.5 mL Solución II
- 2.9 mL H<sub>2</sub>O dd
- 80.0 μL Persulfato de amonio (APS; 10%)
- 7.0 μL Tetrametiletilendiamina (TEMED)

▪ **Gel concentrador pH 6.8**

- 830.0 μL Solución I
- 2.5 mL Solución III
- 1.6 mL H<sub>2</sub>O dd
- 60.0 μL APS (10%)
- 7.0 μL TEMED

▪ **Buffer de corrida (10X; 1L)**

- 30.3 g Trizma base
- 144.0 g Glicina
- 5% SDS

Se mezclaron los componentes del gel de resolución y se vaciaron entre las placas de vidrio del sistema MiniProtean de BioRad™. Una vez polimerizado, se agregó la solución de gel concentrador. Se cargó en cada pozo la proteína de cada muestra y se separaron con buffer de corrida por aproximadamente 120 min a 100 V.

## 7.6 Inmunodetección mediante 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 agregar H<sub>2</sub>O cbp 1.0 L

### ▪ **Buffer TBS-TT**

-15.0 mL TBS 10X

-0.15 mL Tritón x-100

3.75 mL Tween 20 (10%)

\*Agregar H<sub>2</sub>O cbp 150 mL

### ▪ **Buffer de Transferencia**

-100 mL Metanol

-100 mL Buffer de corrida

\*Agregar H<sub>2</sub>O cbp 1L

Las proteínas en los geles se transfirieron a membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PDVF; Millipore), previamente activada en metanol, mediante un sistema húmedo (BioRad) a 25V durante 16h a 4°C.

En tubo falcon de 50.0mL, se prepararon 35.0mL de solución de bloqueo al 5% (1.75 g de leche Svelty®) en buffer TBS-TT. Se colocó la membrana 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: anti-AtAGO1 1:5000 (Agrisera #AS09 527); anti-AtDCL 1:1000 (Agrisera #AS12 2102) y anti-AtDCL3 1:1000 (Agrisera #AS12 2013). Se incubó durante 1h a TA y en agitación. Se recuperó el anticuerpo primario y se lavó 3 veces en agitación a TA por 5 min con buffer TBS-TT. Se disolvió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) en buffer TBS-TT 1:10000 (US Biological #I1904-46Q) 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 minutos con buffer TBS-TT. Por último, se visualizaron las membranas utilizando el sustrato Luminata Classico Western HRP (Millipore) y con ayuda del software ChemiDoc™ (BioRad), mediante un método de canales múltiples y secuencias de imágenes a lo largo de 2 minutos de exposición.

## 7.7 Purificación de proteínas para isoelectroenfoque

### ▪ **Solución de isoelectroenfoque (IEF):**

- 8 M urea
- 2 M tiourea
- 4% m/v CHAPS
- 2% v/v Triton X-100
- 50 mM DTT

La purificación se llevó a cabo mediante el kit de purificación para 2D (2-D CleanUp kit) de GE Healthcare.

En un tubo de 1.5 mL se colocaron 100  $\mu$ L del extracto concentrado. Se añadieron 300  $\mu$ L de la solución precipitante, se agitó vigorosamente y se incubó a 4°C por 15 min. Posteriormente se añadieron 300  $\mu$ L del coprecipitante, se agitó suavemente y se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se removió el sobrenadante para añadir nuevamente coprecipitante en una cantidad que cubriera al pellet obtenido sin perturbarlo. Se centrifugó durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Posterior a la centrifugación, al pellet se le añadió H<sub>2</sub>O lo suficiente para cubrirlo y se agitó suavemente. Se añadió 1 mL de buffer de lavado y 5  $\mu$ L de aditivo de lavado. Los tubos se incubaron a -20°C durante 4h agitando de 20-30s cada 15 min. Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron por 10 min a 8000 x g. Terminada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet (no más de 5 minutos). Se resuspendió en 30  $\mu$ L de solución IEF.

## 7.8 Electroforesis de dos dimensiones.

### ▪ **Buffer SDS**

- Tris 50 mM pH 8.8
- 6 M urea
- 30% Glicerol
- 4% SDS

Para el isoelectroenfoque se calculó el volumen de cada muestra necesario para cargar 200  $\mu$ g de proteína previamente purificada y fue depositado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Cada volumen fue completado a 130  $\mu$ L con solución IEF. Se añadieron 1.5  $\mu$ L de anfotericina y se mezclaron bien con micropipeta. A continuación, se centrifugaron por 5

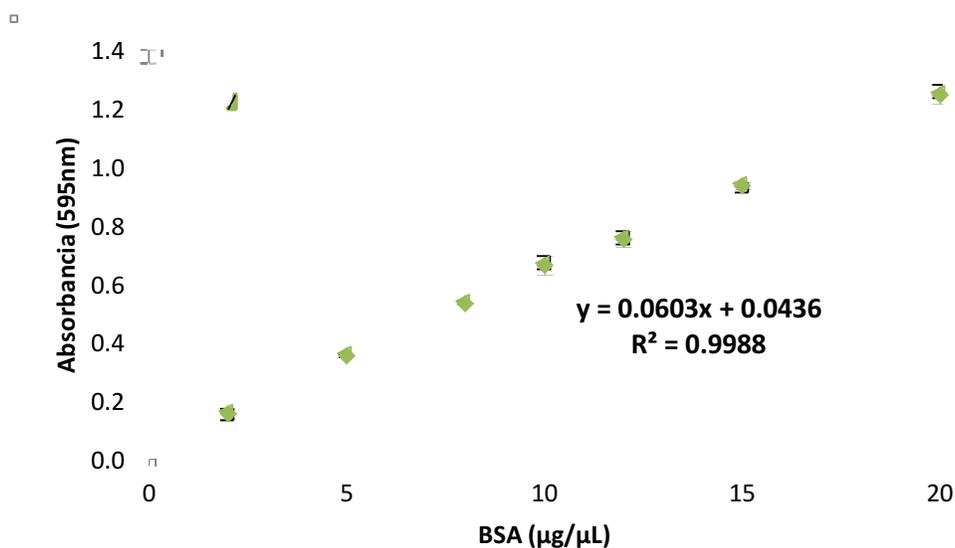
minutos a 15,000 rpm a TA. El sobrenadante se distribuyó a lo largo del carril correspondiente en la bandeja de isoelectroenfoque. Se tomaron tiras de gel de poliacrilamida de 7cm con un gradiente inmovilizado de pH (IPG) en un intervalo de 4-7, se separaron de su protector y se colocaron boca abajo sobre cada muestra en la bandeja. Se colocó 1mL de aceite mineral sobre cada tira. La bandeja se colocó en la unidad de isoelectroenfoque Protean i12 IEF Cell. Se programó rehidratación activa (12h, 20 °C), seguida del protocolo de separación pre-cargado en el equipo. Al terminar el isoelectroenfoque, las tiras IPG se retiraron de la charola y se les retiró el exceso de aceite mineral. Posteriormente a cada tira se le aplicaron dos lavados, cada uno con 1.0mL de ditioteritol al 2% m/v en buffer SDS, seguidos de dos lavados con yodoacetamida al 2.5% en buffer SDS a resguardo de la luz.

Para la segunda dimensión, se elaboró un gel SDS-PAGE. Las tiras se colocaron sobre la superficie del gel concentrador y se selló con una solución de agarosa 0.5% m/v en buffer de corrida SDS-PAGE y trazas de azul de bromofenol, para poder ver el frente de corrida durante la separación electroforética, que se llevó a cabo aproximadamente durante 120 min a 80V. Al terminar la corrida los geles se tiñeron en Coomassie coloidal.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Identificación de DCL1 y DCL3 mediante inmuno réplicas tipo western blot.

Se extrajo proteína total de diferentes tejidos con base en el protocolo establecido por Juárez-González (2015) para obtener proteínas DCL y AGO en el extracto. Para cuantificar la cantidad de proteína obtenida en cada muestra se construyeron curvas patrón con albúmina de suero bovino (BSA). A continuación, se muestra el ejemplo de un gráfico obtenido:



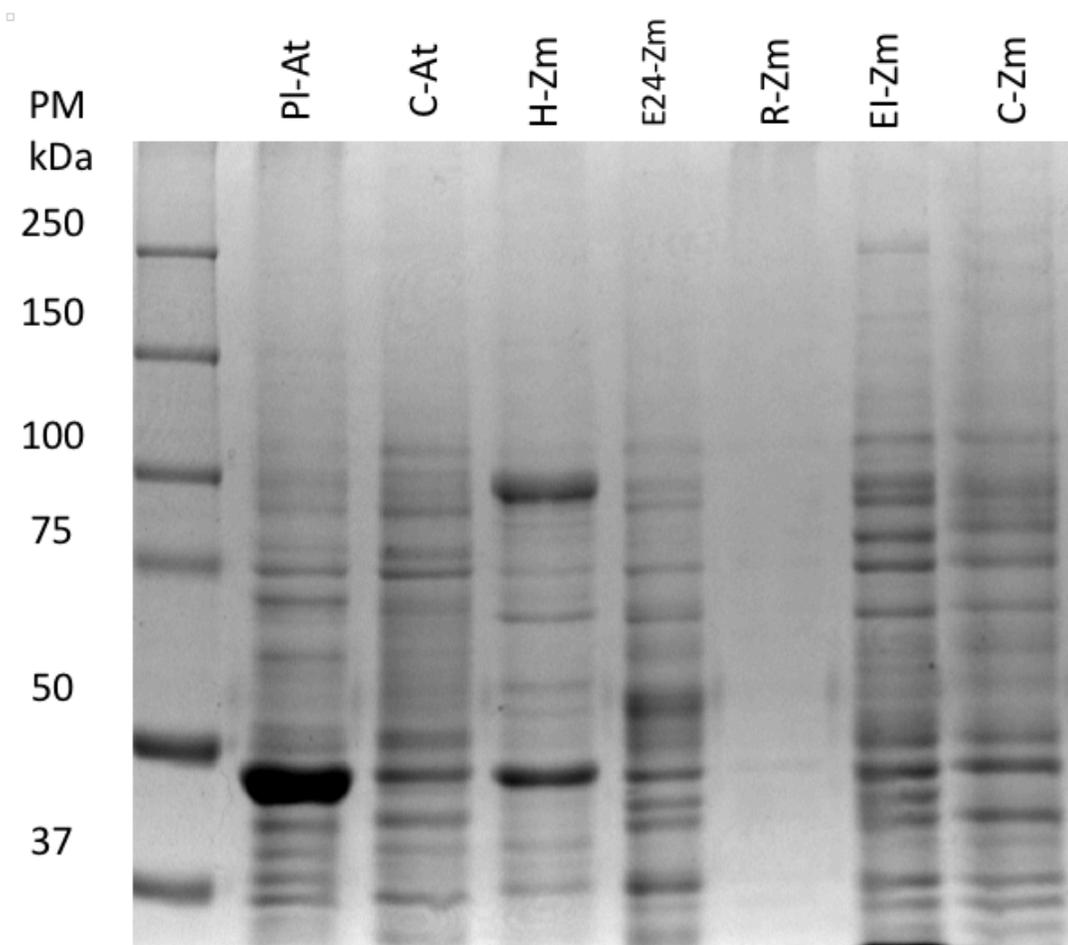
**Figura 11.** Ejemplo de curva patrón para la cuantificación de proteína.

Con la ecuación de la recta obtenida, se calculó la concentración de proteína en cada extracto por el método de Bradford por triplicado. En la tabla 3, se muestran las concentraciones obtenidas en cada extracto de esta primera parte.

<b>TABLA 3.</b> Concentración de proteína en diferentes extractos.		
Muestra	Concentración µg/ µL	Desv. STD
Plántula de Arabidopsis 15 días (Pl-At)	2.421	0.019
Callo de Arabidopsis 3 meses (C-At)	1.465	0.100
Hoja de maíz 11 días (H-Zm)	1.894	0.019
Ejes de maíz 24h (E24-Zm)	3.155	0.043

Raíz de maíz 11 días (R-Zm)	1.004	0.062
Embrión inmaduro maíz (EI-Zm)	8.331	0.041
Callo de maíz 8 meses (C-Zm)	2.679	0.015
Antera de maíz (A-Zm)	4.731	0.032
Polen de maíz (Po-Zm)	3.169	0.093

Con el objetivo de verificar si la integridad de las proteínas extraídas era óptima, se llevaron a cabo separaciones electroforéticas de una dimensión. En la figura 12 se muestra un ejemplo de los geles que se realizaron para este paso.



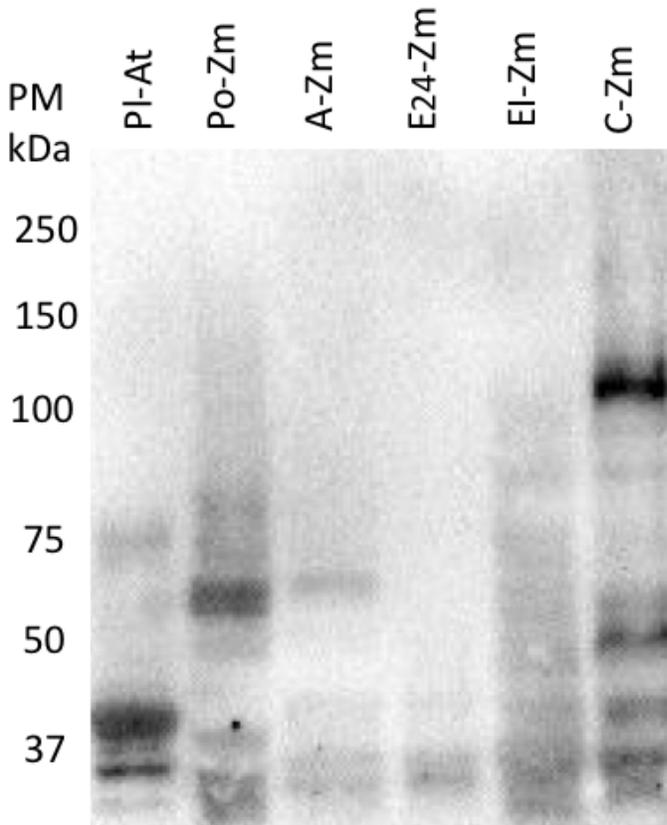
**Figura 12. Muestras utilizadas.** Gel SDS (PAGE) 7% (PI-At: Plántula arabidopsis 15 días; C-At: Callo de Arabidopsis 3 meses; H-Zm: Hoja de maíz; E24-Zm: Eje de maíz 24h; R-Zm: Raíz de maíz; EI: Embrión inmaduro de maíz; C-Zm: Callo de maíz 8 meses). Tinción con azul de Coomassie. Se cargó el equivalente a 20  $\mu$ g de proteína total en cada pozo.

Se observó que la mayoría de los extractos contaba con una buena calidad de proteína; a excepción del obtenido a partir de raíz de maíz, que a pesar de que el método de Bradford indica que sí hay proteína, no se alcanza a ver ninguna banda. Esto puede deberse a que la extracción se llevó a cabo con el tejido de raíz completo, no con las puntas que, de acuerdo con la literatura, es la parte del tejido que contiene la mayor cantidad de proteína, mientras que el resto no tiene una cantidad significativa; además de que la proteína que podría haber estado presente en el extracto pudo ser de muy bajo peso molecular, por lo que no se visualizó en el gel, ya que éste no muestra la proteína por debajo de 37 kDa. Se observaron bandas de alto peso molecular (entre 75 y 250 kDa) en el resto de los tejidos analizados; sin embargo, las bandas con mejor definición se encontraban en los tejidos de plántula de *Arabidopsis*, embrión inmaduro de maíz y callo embriogénico de maíz.

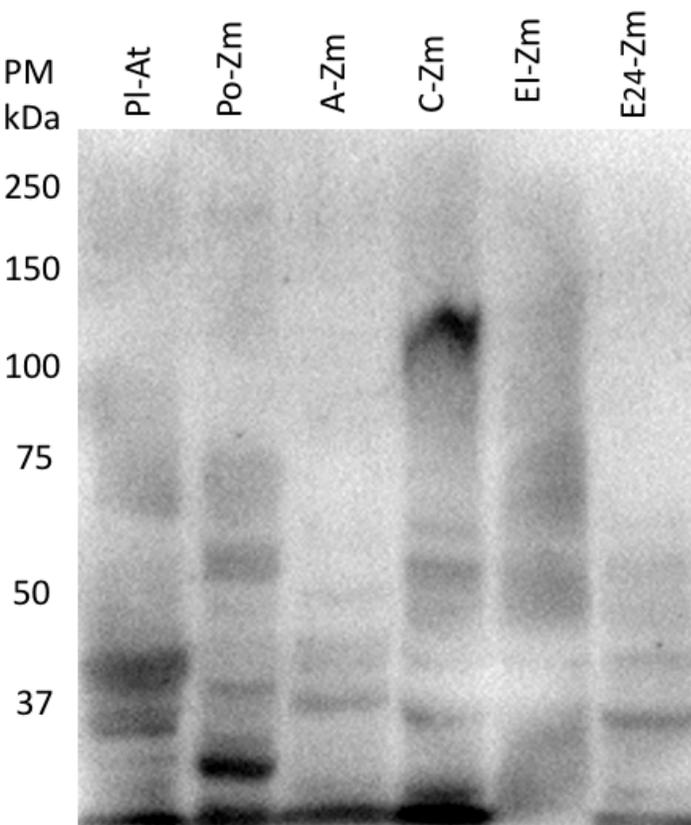
Se eligieron extractos que se consideró mostraban mayor cantidad de proteínas de alto peso molecular en el gel de una dimensión, y se probaron mediante inmuno réplicas tipo western blot con los diferentes anticuerpos.

En la figura 13, se muestra uno de los inmunoblots obtenidos con el anticuerpo anti-AtDCL1; ésta proteína tiene un peso de alrededor de 213 kDa en *Arabidopsis thaliana*. En el inmunoblot aparece una banda de alto peso molecular entre 100-150 kDa, lo cual podría coincidir con el peso esperado del otrólogo en maíz, que tiene un peso de alrededor de 146.02 kDa. Sin embargo, en el tejido control de *Arabidopsis* no se logró observar una señal por encima de 200 kDa, que es donde se esperaría encontrar una señal más intensa. Existen señales por debajo de 75 kDa en el control, que podrían deberse a que la proteína se está degradando en el extracto y una parte más pequeña (que contiene el motivo) está dando la señal; no obstante, al no contar con una señal contundente y cercana al peso en el control positivo, este resultado no es claro.

En la figura 14 se encuentra uno de los inmunoblots obtenidos con el anticuerpo anti-AtDCL3. En este caso tampoco se observa una señal contundente en el tejido control, que debería estar alrededor de 117 kDa. En maíz, el ortólogo ZmDCL3 tiene un peso de 66.44kDa, pero tampoco es claro el resultado debido a que en esa zona en el callo embriogénico existen algunas bandas cercanas a este peso. Por otro lado, en antera se visualiza una banda cercana a ese peso sin las inespecificidades o degradaciones como en el caso del callo, lo cual podría ser un resultado interesante.



**Figura 13. Inmuno detección Anti-AtDCL1 (1:1000).** 80  $\mu$ g de proteína de cada tejido (PI-At: Plántula arabidopsis 15 días; Po-Zm: Polen de maíz; A-Zm: Antera de maíz; E24-Zm: Eje de maíz 24h; EI: Embrión inmaduro de maíz; C-Zm: Callo de maíz 8 meses). Gel SDS-Page al 7% transferido a membrana de Fluoruro de Polivinilideno Se bloqueó 1h con leche baja en grasa en buffer TBS-TT.



**Figura 14. Inmuno detección Anti-AtDCL3 (1:1000).** 80  $\mu$ g de proteína de cada tejido (PI-At: Plántula arabidopsis 15 días; Po-Zm: Polen de maíz; A-Zm: Antera de maíz; C-Zm: Callo de maíz 8 meses; EI: Embrión inmaduro de maíz; E24-Zm: Eje de maíz 24h). Gel SDS-Page al 7% transferido a membrana de Fluoruro de Polivinilideno. Se bloqueó 1h con leche baja en grasa en buffer TBS-TT.

De manera destacable, se encontró que había señales intensas en ambos tejidos de callo embriogénico de maíz alrededor de 150 kDa en las detecciones con ambos anticuerpos. En el caso de ZmDCL1, como ya se mencionó, la señal sería congruente con su peso molecular; por el contrario, en el inmunoblot para ZmDCL3 (que tiene un peso menor), no debería identificar una banda en tan alto peso molecular. Se decidió revisar que los epítopes de los anticuerpos se encontraran dentro de la secuencia reportada para las proteínas en EnsemblPlants (Figuras 15-18). Se realizó un alineamiento utilizando ClustalW y se generó un archivo gráfico. Se vio que la secuencia del epítopo para AtDCL3 no se encuentra en la secuencia de ZmDCL3 (Figura 16), por tanto, las señales que se ven en el inmunoblot no son debidas a la presencia de esta proteína. En el caso del epítopo para AtDCL1 se vio que sí existe una coincidencia de secuencia en ZmDCL1 y aunque no es total, se considera suficiente para que pudiera existir una señal en el inmunoblot; sin embargo, al no contar con el control no es claro cuál podría ser la identidad de la proteína que el anticuerpo contra AtDCL1 está identificando. Por otro lado, este mismo anticuerpo tiene una secuencia de 3 aminoácidos de coincidencia con ZmDCL3, que no se consideran suficientes para una adecuada detección (Figura 17), pero que quizá podría estar causando alguna señal en el inmunoblot y que por alguna razón se está reconociendo. Para el momento en el que se habían obteniendo estos resultados, fue reportado en la página de Agrisera (fabricante de los anticuerpos) que no había especificidad del anticuerpo de AtDCL1 ni del de AtDCL3 en maíz (Anexos), por lo que se decidió no continuar con el intento, a pesar de que, con base en los alineamientos realizados, sería posible detectar ZmDCL1 con el anticuerpo contra AtDCL1.

ZmDCL1 (GRMZM2G040762)	INEGGPAHAKRFVYAVRVNTSDSGWTDECIGEPMPSPVKKAKDSAAVLLLELLNRNYRGKP	1304
AtDCL1	VKEGGPAHAKRFTFGVVRVNTSDRGWTDECIGEPMPSPVKKAKDSAAVLLLELLNKTFS---	1909
EpitopeDCL1	-----CEPMPSPVKKAKD-----	12
	*****	

**Figura 15.** Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL1 con las secuencias de AtDCL1 y ZmDCL1.

ZmDCL3	-----	0
AtDCL3	MHSSLEPEKMEEGGGSNSLKRKFSEIDGDQNLDSVSSPMMTDSNGSYELKVYEVAKNRNI	60
EpitopeDCL3	MHSSLEPEKMEC-----	12

**Figura 16.** Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL3 con las secuencias de AtDCL3 y ZmDCL3.

ZmDCL3	VKVKLSKGGPRISLYESCKKLQWPMPTEFEVVKVEPSVCSSSCGSSQKVAPQGFASFIT	550
AtDCL3	GPINMKKGGPRGTLHEFCCKHLWPMPTEFDTSEEKSRTPFEFIDGG-EKRTSFSSFTSTIT	1536
EpitopeDCL1	-----CEPMPSPVKKAKD-----	12
	***:.. :	

**Figura 17.** Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL1 con las secuencias de AtDCL3 y ZmDCL3.

EpitopeDCL3	-----MHSSLEPEK-----	9
AtDCL1	SYRVLSSKTLADVVEALIGVYYVEGGKIAANHLMKWIGIHVEDDPDEVDGTLKVNVPES	1552
ZmDCL1 (GRMZM2G040762)	CYRVLSSKTLADVVEALIGVYYVAGGKIATNHLMKWIGINAELDPQEIPS-SKPYNIPES	958
	:: . :*::	

**Figura 18.** Alineamiento del epítipo del anticuerpo Anti-AtDCL3 con las secuencias de AtDCL1 y ZmDCL1.

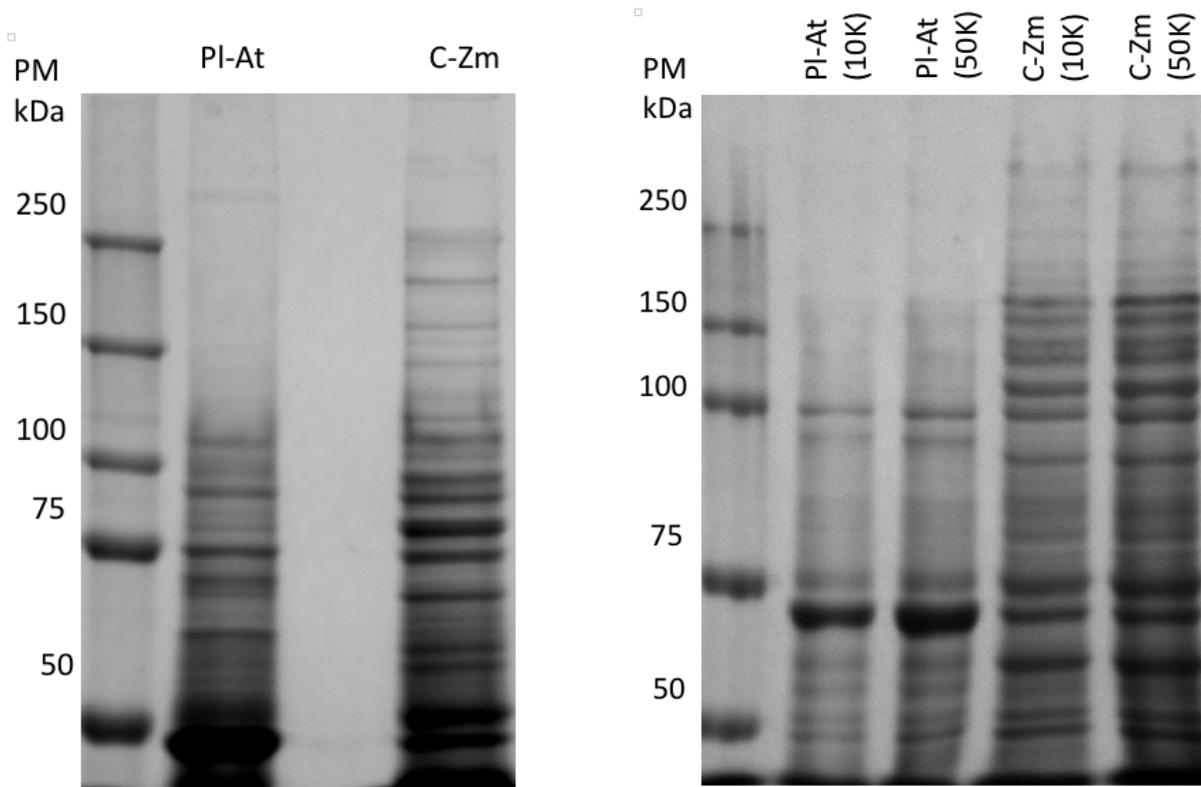
## 8.2 Identificación de AGO1 mediante electroforésis 2D e inmuno réplicas tipo western blot.

Con el objetivo de mejorar la calidad de las inmuno detecciones para la identificación de AGO1, se estandarizó un método de enriquecimiento de las proteínas de alto peso molecular en las muestras. Se utilizaron columnas (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices) de 10 y 50k con las cuales, al centrifugar, se logró obtener muestras con concentraciones que superaban a los extractos iniciales de plántula de *Arabidopsis* y callo embriogénico de maíz de 8 meses, que fueron obtenidos en una nueva ocasión (tabla 4). Se verificó que la calidad de la proteína se conservara después del proceso mediante la

separación en geles de electroforesis, evidenciándose que el proceso no dañaba la integridad de la proteína.

<b>TABLA 4. Concentración obtenida con columnas de enriquecimiento.</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Desv. STD</b>
Plántula de Arabidopsis (15 días)	1.342	0.066
Callo de maíz (8 meses)	2.502	0.023
Arabidopsis 10k	5.503	0.132
Arabidopsis 50k	17.852	0.067
Callo 10k	3.657	0.019
Callo 50k	9.808	0.081

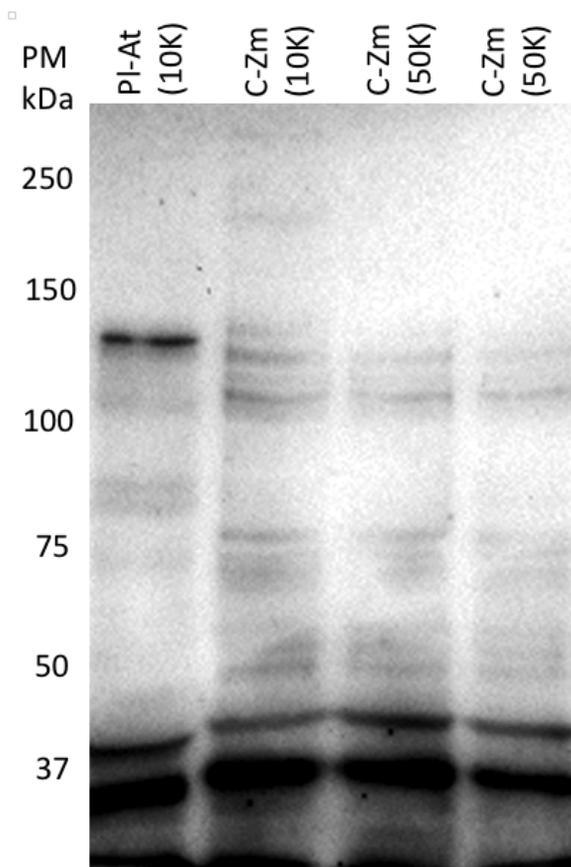
En la figura 19, a la izquierda se observan las separaciones electroforéticas llevadas a cabo con los extractos originales, éstas muestran que en la extracción se obtuvo proteína íntegra de ambos tejidos. A la derecha se encuentran los extractos obtenidos con las columnas de 10 y 50k, las cuales dejan ver que con ambas la integridad se conserva; sin embargo, se decidió trabajar con las de 50k debido a que las concentraciones obtenidas eran superiores y el enriquecimiento de proteínas de alto peso molecular parece lograrse mejor a partir de ellas.



**Figura 19. Geles SDS (PAGE) 7% con proteína antes y después de la prueba de enriquecimiento.** Se cargó el equivalente a 30  $\mu$ g de proteína en cada pozo. Izquierda: Extracto de plántula de arabisopsis y de callo embriogénico de maíz de 8 meses. Derecha: Extractos después de la concentración mediante columnas de 10k y 50k.

Una vez confirmado el estado óptimo de los extractos, se prosiguió con una inmuno detección tipo western blot contra AtAGO1 y se encontró una mejora en la visualización de la membrana, que además conservaba el patrón observado en los antecedentes, ya que se observan bandas entre 100-150 kDa en los tejidos de maíz; además en el tejido control se observa una banda contundente que coincide con el rango esperado para el peso de AtAGO1 (figura 20).

Después de obtener este extracto, el siguiente paso fue realizar una electroforésis en dos dimensiones para facilitar la identificación de la presunta proteína AGO1 mediante espectrometría de masas; por tanto, se necesitaba que estos extractos fueran adecuados para realizar un isoelectroenfoque, ya que el buffer en el que se encontraban posee sales que pueden interferir para llevar a cabo este proceso con éxito.



**Figura 20. Inmuno detección Anti-AtAGO1 1:5000.** Se cargó el equivalente a 70  $\mu$ g de proteína total de cada extracto (PI-At: plántula de Arabidopsis; C-Zm: callo embriogénico de maíz; 10k y 50k: columna de extracción con las cuales fueron obtenidos). Gel SDS-Page al 7% transferido a membrana de Fluoruro de Polivinilideno. Se bloqueó 1h con leche baja en grasa en buffer TBS-TT.

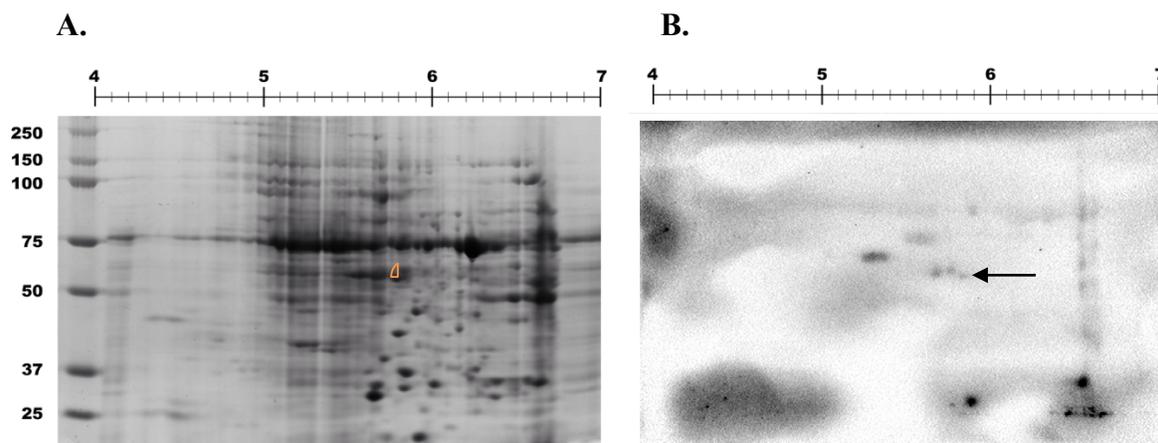
Finalmente se logró purificar el extracto con ayuda de un kit de purificación para 2D (2-D CleanUp kit; GE Healthcare), con el que se lograron obtener geles en dos dimensiones a partir de las dos muestras.

Para la primer dimensión, se utilizaron tiras de 7 cm con un rango de pH de 4-7, dado que la mayor cantidad de proteínas del maíz se encuentran en este rango. Se obtuvieron patrones electroforéticos reproducibles, que además dejan ver que la focalización se lleva a cabo de manera óptima gracias al paso de purificación estandarizado.

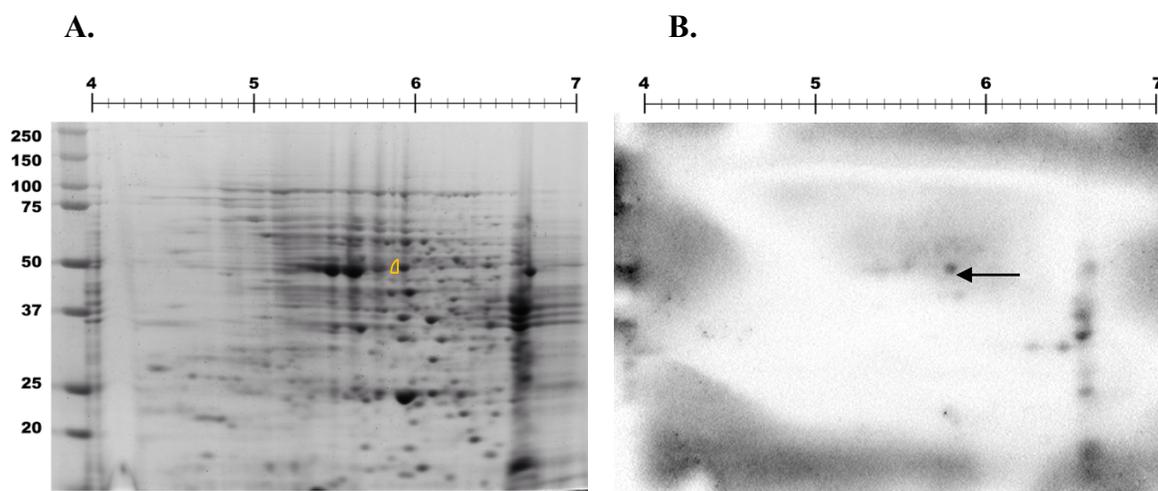
Finalmente se llevó a cabo una inmuno réplica tipo western blot en ambos geles, donde se obtuvieron señales positivas que indicaban la posible presencia de proteínas Argonauta.

En la figura 21B, en Arabidopsis se observan varias señales en peso molecular alto que podrían corresponder a la proteína buscada, por lo que varias de estas podrían ser tomadas

para la prueba; sin embargo, las más interesantes serían las cercanas al pI de 6 (se observan algunas alrededor de 5.8) donde también se encuentran las señales obtenidas en maíz (figura 22). En la figura 22B, se observa una señal contundente en callo casi al mismo nivel que en *Arabidopsis*, con un pI de alrededor de 5.8, por lo que sería el punto candidato a identificación por espectrometría de masas.



**Figura 21.** A: Separación electroforética 2D del extracto purificado de plántula de *Arabidopsis thaliana*. En la parte superior se muestran los rangos de pH de la primera dimensión; B: Inmuno réplica en gel 2D de *Arabidopsis thaliana*. Se bloqueó 1h con leche baja en grasa en buffer TBS-TT. Anti-AGO1 (1:5000)



**Figura 22.** A: Separación electroforética 2D del extracto purificado de **Callo embriogénico** de maíz de 8 meses. En la parte superior se muestran los rangos de pH de la primera dimensión; B: Inmuno réplica en gel 2D de Callo embriogénico de maíz de 8 meses. Se bloqueó 1h con leche baja en grasa en buffer TBS-TT. Anti-AGO1 (1:5000)

Hasta el momento no ha sido posible realizar la identificación mediante espectrometría de masas por problemas técnicos. Sin embargo, la estandarización de la metodología permite que la identificación se pueda realizar una vez que el equipo indicado se encuentre en funcionamiento.

De acuerdo con la literatura, el punto isoeléctrico de las proteínas Argonauta se encuentra alrededor de 9. En los inmunoblots obtenidos, se pueden ver señales intensas cercanas al punto isoeléctrico de 6, lo que podría estar hablando de modificaciones postraduccionales que modifiquen el punto isoeléctrico de las presuntas isoformas de la proteína AGO. Por otro lado, de manera interesante, también se observa una señal contundente que se aglomera hacia la derecha de ambas inmuno réplicas, indicando que podrían existir proteínas que son identificadas con el anticuerpo pero que no se alcanzan a distribuir en la primera dimension debido al rango de pH que se está utilizando.

## 9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La embriogénesis somática ha adquirido relevancia durante los últimos años, ya que es un fenómeno central en procesos biotecnológicos como la micropropagación, que permite regenerar plantas a partir de una pequeña cantidad de tejido; además, ha sido propuesta como la mejor vía de regeneración en la crioconservación y transformación de plantas (Celestino *et al.*, 2005).

La caracterización de elementos regulatorios en el proceso de desdiferenciación celular que ocurre en la embriogénesis somática, ha involucrado a distintos mecanismos, dentro de los cuales destaca el mediado por sRNAs, que están implicados durante la inducción de embriones somáticos en diversas especies (Lin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Identificar los elementos requeridos para la actividad de las vías de regulación mediadas por sRNAs durante la embriogénesis somática es esencial para comprender su funcionamiento; en especial cuando se trabaja con modelos diferentes a *Arabidopsis thaliana*, donde muchas de las vías ya han sido caracterizadas. Existen reportes en especies más relacionadas con maíz, por ejemplo, el arroz, donde se ha visto una mayor diversificación de las vías, puesto que se ha encontrado una cantidad superior de secuencias pertenecientes a familias de proteínas DCL, RDR y AGO de las que se conocen en *Arabidopsis* (Langham *et al.*, 2004; Gaut, 2001).

Mediante un análisis *in silico* del genoma reportado para maíz, Juárez González reportó en el 2015 la presencia de 5 DCLs y 24 AGOs, algunas involucradas en la vía de siRNAs, otras en la vía de miRNAs, acorde a la clasificación reportada para la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El presente trabajo se centró en la identificación de tres enzimas indispensables para el funcionamiento de algunas vías de regulación mediadas por sRNAs, reportadas en dicho análisis, mediante inmuno réplicas tipo western blot.

La identificación de las proteínas ZmDCL1 y ZmDCL3 no pudo llevarse a cabo, ya que los anticuerpos con los que se contaba en el laboratorio no son específicos para maíz. Se evaluaron distintos tejidos, en los cuáles se obtuvieron diversas señales, donde la obtenida en el tejido de callo embriogénico de maíz resultaba prometedora al ser reproducible, intensa y encontrarse cerca del peso molecular esperado para ZmDCL1; sin embargo, en el extracto correspondiente al tejido control de *Arabidopsis* no fue posible obtener ninguna

señal contundente. Aunque es posible que los diferentes tejidos utilizados, plántula en *Arabidopsis* y callo embriogénico en maíz, presentaran distintos niveles de la proteína DCL1, será necesario establecer un control positivo para seguir evaluando la utilidad de este anticuerpo en maíz. El alineamiento que se llevó a cabo dejó claro que la identificación de ZmDCL3 no es posible con el anticuerpo anti-AtDCL3, ya que su secuencia de aminoácidos es inexistente en la proteína de maíz. ZmDCL3 es una proteína requerida para la producción de hc-siRNAs; su presencia en los diferentes tiempos de subcultivo supondría la existencia de poblaciones de hc-siRNAs de 24 nt, que a su vez podrían indicar una vía RdDM activa, lo cual tiene sentido dado 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 para disminuir la expresión de elementos transponibles que pudiesen estar activos después de la reprogramación generalizada que sufren las células (Liu *et al.*, 2017). Por lo anterior, la identificación de esta proteína en los distintos tiempos de subcultivo sería de gran trascendencia, pero para ello es necesario generar un anticuerpo que sea específico para maíz, con lo que se podría evaluar la presencia de esta enzima de manera adecuada.

En el caso de ZmDCL1, con base en el alineamiento que se llevó a cabo, parece ser posible que el anticuerpo anti-AtDCL1 reconozca a su ortólogo en maíz. Sin embargo, debido a la falta de señal ya mencionada en el control positivo (*Arabidopsis*), no fue posible comparar la señal observada para callo embriogénico de maíz y se requiere de una identificación adicional para corroborar la utilidad del anticuerpo. Dado que en los inmunoblots contra DCL1 y DCL3 se encuentra una banda que podría corresponder al peso molecular teórico de ZmDCL1, se puede pensar que el anticuerpo contra AtDCL3 también podría estar reconociendo a ZmDCL1. Esto estaría apoyando la presencia de algunos aminoácidos que comparten DCL1 y DCL3. Dados los resultados obtenidos, también sería recomendable la generación de un anticuerpo específico para la identificación de ZmDCL1, que ayude al estudio de la expresión de esta proteína durante el proceso de embriogénesis somática.

Por otro lado, el análisis de secuencias para Argonauta en maíz realizado por Juárez-González (2015), indicó que hay 4 genes cuyos transcritos tienen todas las características necesarias para traducirse y conformar una proteína tipo AGO1 funcional. En ese mismo trabajo, se analizó el nivel de proteínas de tipo AGO1 en los distintos tiempos de subcultivo

utilizando el anticuerpo contra AGO1 de Arabidopsis. Dependiendo del tejido, se encontraron presuntas bandas correspondientes a ZmAGOc/e y ZmAGO1a acorde a su masa molecular teórica. Posteriormente, se publicó la homología entre proteínas Argonauta de diferentes especies de plantas, confirmando el agrupamiento de los 4 genes de maíz en el clado de AGO1 (Zhang et al., 2015). Con el protocolo de enriquecimiento de proteínas de alto peso molecular estandarizado en este trabajo, se logró una mejora significativa en la visualización de las membranas de las inmuno réplicas llevadas a cabo, lo cual es algo novedoso ya que, revisando literatura, no ha sido reportado algún método como el mencionado que ayude a mejorar la identificación de proteínas AGO o DCL en inmunoblots.

El llevar a cabo electroforesis de dos dimensiones e inmuno detecciones que puedan estar identificando proteínas AGO también es algo innovador, ya que, en primera instancia, el extraer proteínas Argonauta en maíz es difícil debido a que su inestabilidad complica su extracción, aunado a esto, un paso de purificación para llevar a cabo isoelectroenfocos puede comprometer aún más su integridad y su posterior identificación, por lo que si resultase que las bandas candidatas son proteínas argonautas; no sólo se habrán identificado parálogos de AtAGO1 en maíz a nivel protéico; sino que, además, se habrá logrado estandarizar un protocolo de extracción de proteínas Argonauta en maíz para su posterior focalización en una electroforesis de dos dimensiones que nos ayudará a identificarlas mediante espectrometría de masas.

Tomando en cuenta que las señales encontradas en los inmunoblots realizados, tanto para Arabidopsis como para maíz, se encuentran en un punto isoelectrico diferente al teórico esperado de las proteínas AGO, es posible que estas proteínas sufran modificaciones postraduccionales o que su asociación con sRNAs cambie sus características. Existen algunos estudios que identifican fosforilaciones en proteínas AGO de humano, y estos eventos están implicados en la localización celular de estas proteínas o en la regulación de la unión a sRNAs; sin embargo, no hay evidencia clara *in vivo* sobre la modulación de la actividad de las proteínas AGO mediante fosforilación (Meister, 2013). En plantas, tampoco existen reportes que muestren este tipo de regulación de las AGO mediante modificaciones postraduccionales, por lo que, si se logra identificar este tipo de modificación, sería un paso importante para su estudio en plantas.

## **10 CONCLUSIONES.**

Los anticuerpos contra AtDCL1 y AtDCL3 no muestran la especificidad requerida para identificar los ortólogos correspondientes en maíz; sin embargo, ambos anticuerpos reconocen una proteína de peso molecular similar al esperado para ZmDCL1 en las muestras de callo embriogénico y sería interesante conocer su identidad.

El enriquecimiento de proteínas de alto peso molecular estandarizado en este trabajo conserva la integridad del extracto proteico y de proteínas Argonauta, además de concentrarlo.

La purificación mediante el 2-D CleanUp kit de GE Healthcare da como resultado un extracto que es apto para un correcto isoelectroenfoque.

El anticuerpo contra AtAGO1 tiene un patrón reproducible en muestras de callos embriogénicos de maíz de 8 meses; además en los geles de dos dimensiones se observan señales que podrían corresponder a ortólogos de AtAGO1 en maíz acorde a la comparación con el patrón de señales correspondientes en Arabidopsis.

## **11 PERSPECTIVAS.**

Realizar la identificación mediante espectrometría de masas de las señales identificadas mediante anti-AtAGO1 en electroforésis de dos dimensiones para proteínas de maíz.

Obtener anticuerpos que sean específicos para maíz de DCL1 y DCL3 para lograr la identificación de estas proteínas.

Llevar a cabo electroforésis en dos dimensiones con tiras con un rango de pH de 3-10 que permitan que todas las proteínas alcancen su punto isoeléctrico y verificar si existe una señal cercana a 9 mediante inmuno réplicas tipo western blot.

This product is for **research use only** (not for diagnostic or therapeutic use)

contact: [support@agrisera.com](mailto:support@agrisera.com)

Agrisera AB | Box 57 | SE-91121 Vännäs | Sweden | +46 035 33000 | [www.agrisera.com](http://www.agrisera.com)

product **AS12 2102**

**DCL1 | Dicer-like protein 1**

### product information

<b>Background</b>	DCL1 (EC=3.1.26) is a ribonuclease (RNase) III involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing (PTGS). Functions in the microRNAs (miRNAs) biogenesis pathway by cleaving primary miRNAs (pri-miRNAs) and precursor miRNAs (pre-miRNAs). Synonyms: Protein ABNORMAL SUSPENSOR 1, Protein CARPEL FACTORY, Protein SHORT, INTEGUMENTS 1, Protein SUSPENSOR 1.
<b>Immunogen</b>	KLH-conjugated synthetic peptide derived from <i>Arabidopsis thaliana</i> DCL1 sequence, <a href="#">Q9SP32</a> , <a href="#">At1g01040</a>
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Clonality</b>	Polyclonal
<b>Purity</b>	Affinity purified serum
<b>Format</b>	Lyophilized
<b>Quantity</b>	100 µg
<b>Reconstitution</b>	For reconstitution add 50 µl of sterile water.
<b>Storage</b>	Store lyophilized/reconstituted at -20°C; once reconstituted make aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles. Please, remember to spin tubes briefly prior to opening them to avoid any losses that might occur from lyophilized material adhering to the cap or sides of the tubes.
<b>Tested applications</b>	RIP (RNA immunoprecipitation assay), Western Blot (WB)
<b>Related products</b>	<a href="#">AS15 3100</a>   anti-DCL2   Dicer-like protein 2, rabbit antibodies <a href="#">AS12 2103</a>   anti-DCL3   Dicer-like protein 3, rabbit antibodies <a href="#">AS15 3105</a>   anti-DCL4   Dicer-like protein 4  <a href="#">Plant protein extraction buffer</a>  <a href="#">Secondary antibodies</a>
<b>Additional information</b>	Freezing and re-using of diluted anti-DCL1 antibodies is not recommended and will contribute to non-conclusive results.

### Application information

<b>Recommended dilution</b>	1 : 1000 with standard ECL (WB)
<b>Expected   apparent MW</b>	213 kDa
<b>Confirmed reactivity</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Predicted reactivity</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Not reactive in</b>	<i>Zea mays</i>
<b>Additional information</b>	Recommend protein load is from 40-50 µg/well (using 1.5 mm spacers helps to obtain wider wells)
<b>Selected references</b>	<a href="#">Su et al. (2017)</a> . The Protein Phosphatase 4 and SMEK1 Complex Dephosphorylates HYL1 to Promote miRNA Biogenesis by Antagonizing the MAPK Cascade in Arabidopsis. <i>Dev Cell</i> . 2017 Jun 5;41(5):527-539.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2017.05.008. <a href="#">Yoshikawa (2016)</a> . Pre-microRNA processing activity in nuclear extracts from Arabidopsis suspension cells. <i>J Plant Res</i> . 2016 Nov 24. [Epub ahead of print] <a href="#">Li et al. (2016)</a> . Intron Lariat RNA Inhibits MicroRNA Biogenesis by Sequestering the Dicing Complex in Arabidopsis. <i>PLoS Genet</i> . 2016 Nov 21;12(11):e1006422. doi: 10.1371/journal.pgen.1006422. eCollection 2016. <a href="#">Francisco-Mangilet et al. (2015)</a> . THO2, core member of the THO/TREX complex, is required for micro RNA

product **AS12 2103**  
**DCL3 | Dicer-like protein 3**

### product information

<b>Background</b>	<b>DCL3</b> (EC=3.1.26) is a ribonuclease (RNase) III involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing (PTGS). Functions in the microRNAs (miRNAs) biogenesis pathway by cleaving primary miRNAs (pri-miRNAs) and precursor miRNAs (pre-miRNAs). Synonyms: Endoribonuclease Dicer homolog 3.
<b>Immunogen</b>	<u>KLH</u> -conjugated synthetic peptide derived from <i>Arabidopsis thaliana</i> DCL3 sequence, <u>Q9LXWZ</u> , <u>A13q43920</u>
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Clonality</b>	Polyclonal
<b>Purity</b>	Affinity purified serum
<b>Format</b>	Lyophilized
<b>Quantity</b>	200 µg
<b>Reconstitution</b>	For reconstitution add 200 µl of sterile water.
<b>Storage</b>	store lyophilized/reconstituted at -20°C; once reconstituted make aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles. Please, remember to spin tubes briefly prior to opening them to avoid any losses that might occur from lyophilized material adhering to the cap or sides of the tubes.
<b>Tested applications</b>	western blot (WB)
<b>Related products</b>	<a href="#">AS12 2102</a>   anti-DCL1   Dicer-like protein 1, rabbit antibodies <a href="#">AS15 3100</a>   anti-DCL2   Endoribonuclease Dicer homolog 2, rabbit antibodies <a href="#">AS15 3105</a>   anti-DCL4   Dicer-like protein 4, rabbit antibodies  <a href="#">collection of antibodies to proteins involved in microRNA metabolism</a>  <a href="#">Plant protein extraction buffer</a>  <a href="#">Secondary antibodies</a>

### Application information

<b>Recommended dilution</b>	1 : 1000 with standard ECL (WB)
<b>Expected   apparent MW</b>	117 kDa
<b>Confirmed reactivity</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Predicted reactivity</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Not reactive in</b>	<i>Zea mays</i>
<b>Additional information</b>	Recommend protein load is from 40-50 µg/well (using 1.5 mm spacers helps to obtain wider wells)
<b>Selected references</b>	to be added when available, antibody released in August 2012.

product **AS09 527**  
**AGO1 | Argonaute 1**

### product information

<b>Background</b>	<b>AGO1</b> belongs to a group of argonaute proteins which are catalytic component of the RNA-incudes silencing complex (RISC). This protein complex is responsible for the gene silencing (RNAi).
<b>Immunogen</b>	N-terminal peptide of <i>Arabidopsis thaliana</i> AGO1 <a href="#">O04379</a> , <a href="#">At1g48410</a>
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Clonality</b>	Polyclonal
<b>Purity</b>	Affinity purified serum
<b>Format</b>	Lyophilized
<b>Quantity</b>	50 µg
<b>Reconstitution</b>	For reconstitution add 50 µl of sterile water.
<b>Storage</b>	Store lyophilized/reconstituted at -20 °C; once reconstituted make aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles. Please, remember to spin tubes briefly prior to opening them to avoid any losses that might occur from lyophilized material adhering to the cap or sides of the tubes.
<b>Tested applications</b>	Western Blot (WB)
<b>Related products</b>	<a href="#">AS09 527-ALP</a>   Anti-AGO1   Argonaute 1 (40 µg, ALP-conjugated) <a href="#">AS09 527B</a>   Anti-AGO1   Argonaute 1 (40 µg, Biotin conjugated) <a href="#">AS09 527-HRP</a>   Anti-AGO1   Argonaute 1 (40 µg, HRP-conjugated) <a href="#">AS14 2776</a>   Anti-AGO1   Argonaute 1 ( <i>Chlamydomonas</i> ), rabbit antibody <a href="#">AS09 527P</a>   AGO1   Argonaute 1   Blocking peptide <a href="#">AS13 3682</a>   Anti-AGO2   Aargonaute 2, rabbit antibody <a href="#">AS09 617</a>   Anti-AGO4   Argonaute 4, rabbit antibody <a href="#">AS10 671</a>   Anti-AGO5   Argonaute 5, rabbit antibody <a href="#">AS10 672</a>   Anti-AGO6   Argonaute 6, rabbit antibody <a href="#">AS10 673</a>   Anti-AGO9   Argonaute 9, rabbit antibody <a href="#">AS15 3071</a>   Anti-AGO10   Argonaute 10, rabbit antibody <a href="#">Collection of antibodies to micro RNA</a> <a href="#">Plant protein extraction buffer</a> <a href="#">Secondary antibodies</a>
<b>Additional information</b>	Antibody binds microRNA and tasiRNAs, preference for 21nt miRNAs with 5'U.  To detect AGO1 in <i>Nicotiana benthamiana</i> , please <a href="#">inquire</a> .

### Application information

<b>Recommended dilution</b>	1: 5000 - 1: 10 000 (WB)
<b>Expected   apparent MW</b>	116.4   130 kDa
<b>Confirmed reactivity</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>
<b>Predicted reactivity</b>	<i>Brassica pekinensis</i> , <i>Capsella rubella</i> , <i>Malus domestica</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Ricinus communis</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Vitis vinifera</i>
<b>Not reactive in</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<b>Additional information</b>	AGO expression may be tissue specific and using floral tissue is recommended where most of the AGOs are expressed the highest. Use of proteasome inhibitors as MG132 can help to stabilize AGO proteins during extraction procedure.

### 13 REFERENCIAS.

- Axtell, M. J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology*, 64, 137-159.
- Bai, S., Chen, L., Yund, M. A., & Sung, Z. R. (2000). Mechanisms of plant embryo development. *Current topics in developmental biology*, 50, 61-88.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Becraft PW. 2007. Aleurone Cell Development. *Plant Cell Monogr*. Springer-Verlga Berlin Heidelberg.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., & Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO journal*, 17(1), 170-180.
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., & Rouzé, P. (2006). The small RNA world of plants. *New Phytologist*, 171(3), 451-468.
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. *Cell*, 128(6), 1089-1103.
- Cai H. 2006. Maize. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cárdenas Monroy, C., González Andrade, M., Guevara Flores, A., Lemus, L., & Matuz Mares, D. (2016). EL UNIVERSO DE RNAs PEQUEÑOS EN PLANTAS: SU VERSATILIDAD EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, 40.
- Coenen, C., & Lomax, T. L. (1997). Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant science*, 2(9), 351-356.
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 19-31.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 21-44.

- Chih-Ching, C., Ching-chu, W., Ching-san, S., Chen, H., Kwang-chu, Y., CHIH, C., & Feng-yun, B. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia sinica*, 18(5), 659-668.
- Dinkova, T. D., Alejandri-Ramírez, N.A. (2014) MicroRNA expression and regulation during plant somatic embryogenesis. In: Alvarez-Venegas et al. (Eds.) Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications, doi: 10.1007/978-3-319-07971-4\_7.
- Fei, Q., Xia, R., & Meyers, B. C. (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant Cell*, 25(7), 2400-2415.
- Gan, J., Shaw, G., Tropea, J. E., Waugh, D. S., Court, D. L., & Ji, X. (2008). A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Molecular microbiology*, 67(1), 143-154.
- 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.
- Goldberg, R. B., De Paiva, G., & Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 605-605.
- Gray, W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS biology*, 2(9), e311.
- Jakubeková MP, Obert BA. 2011. Somatic Embryogenesis and Plant regeneration from immature embryo induce callus of maize (*Zea mays* L.) Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 1(4):478-487.
- Juárez-González V. T. (2015) Análisis de la expresión de enzimas de la vía de biogénesis de RNAs pequeños (sRNAs) durante la embriogénesis somática de maíz. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Jugenheimer, Robert W. Maíz. Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Editorial Limusa. México 1981. Primera edición
- Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annual review of phytopathology*, 48, 225-246.

- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A., & Jin, H. (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes & development*, 21(23), 3123-3134.
- Langham, R. J., Walsh, J., Dunn, M., Ko, C., Goff, S. A., & Freeling, M. (2004). Genomic duplication, fractionation and the origin of regulatory novelty. *Genetics*, 166(2), 935-945.
- Lee T, Li P, Meyers BC. 2012. The Biology and Dynamics of Plant Small RNAs. Plant Genome Diversity. Springer-Verlag. Wien, Austria.
- Liu, H., Ma, L., Yang, X., Zhang, L., Zeng, X., Xie, S., ... & Wu, Y. (2017). Integrative analysis of DNA methylation, mRNAs, and small RNAs during maize embryo dedifferentiation. *BMC Plant Biology*, 17(1), 105.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., & Barton, M. K. (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development*, 126(3), 469-481.
- Mateos, J. L., Bologna, N. G., & Palatnik, J. F. (2011). Biogenesis of plant microRNAs. In *Non Coding RNAs in Plants* (pp. 251-268). Springer Berlin Heidelberg.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), 447-459.
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 155-203). Springer Netherlands.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., ... & Chen, S. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1), 116-127.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118.
- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., ... & Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390

interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 133(1), 128-141.

- Mujib A., Šamaj J. 2005. *Somatic Embryogenesis*. Berlin Heidelberg, Germany. Springer-Verlag
- Mukherjee, K., Campos, H., & Kolaczowski, B. (2012). Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Molecular biology and evolution*, 30(3), 627-641.
- Nobuta, K., Lu, C., Shrivastava, R., Pillay, M., De Paoli, E., Accerbi, M., ... & Green, P. J. (2008). Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the mop1-1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 14958-14963.
- Nottrott, S., Simard, M. J., & Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1108-1114.
- Ortega, Alejandro; Guerrero, Manuel, Preciado, Ricardo. 2013. Diversidad y distribución del maíz nativo y sus parientes silvestres en México. 1ª edición. Biblioteca básica de agricultura. México.
- Paliwal RL. Granados G, Lafitte HR, Violic AD. 2001. El maíz en los Trópicos. Mejoramiento y producción. Grupo de cultivos alimentarios extensivos. Servicio de Cultivo y Pastos. Dirección de Producción y Protección Vegetal de la FAO. Roma, Italia.
- Pare, J. M., & Hobman, T. C. (2007). Dicer: structure, function and role in RNA-dependent gene-silencing pathways. *Industrial Enzymes*, 421-438.
- Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., & Poethig, R. S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), 3691-3696.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, 12(17), 1484-1495.
- Pessino SC, Ortiz JPA. 2010. Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires.

- Polanco J., A. Y T. Flores M. 2008. Bases para una política de I&D e innovación de la cadena de valor de maíz. Foro Consultivo Científico y Tecnológico, A. C. México, D.F. 244 p.
- Qi, Y., He, X., Wang, X. J., Kohany, O., Jurka, J., & Hannon, G. J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443(7114), 1008.
- Qin, Z., Li, C., Mao, L., & Wu, L. (2014). Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. *Frontiers in plant science*, 5.
- Ramachandran V, Chen X. 2008. Small RNA metabolism in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 13 (7), 368-374.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development*, 16(13), 1616-1626.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... & Minx, P. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science*, 326(5956), 1112-1115.
- Simon, S. A., & Meyers, B. C. (2011). Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Current opinion in plant biology*, 14(2), 148-155.
- Singh, R. K., Gase, K., Baldwin, I. T., & Pandey, S. P. (2015). Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC plant biology*, 15(1), 23.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745.
- Song, L., Han, M. H., Lesicka, J., & Fedoroff, N. (2007). Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5437-5442.
- Sun, Guiling. 2012. MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol. Biol*, 2012. 80: 17-36

- Swarts, D. C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R. F., Koonin, E. V., ... & Van Der Oost, J. (2014). The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nature structural & molecular biology*, *21*(9), 743-753.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant and cell physiology*, *49*(4), 493-500.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in biochemical sciences*, *30*(2), 106-114.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(11), 847-859.
- Vaucheret, H. (2008). Plant argonautes. *Trends in plant science*, *13*(7), 350-358.
- Vaucheret, H., Mallory, A. C., & Bartel, D. P. (2006). AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular cell*, *22*(1), 129-136.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Cr  t  , P., & Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development*, *18*(10), 1187-1197.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, *136*(4), 669-687.
- Wang, B., Yanez, A., & Novina, C. D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(14), 5343-5348.
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(11), 4034-4039.
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, *29*(1), 36-57.
- Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K., & Zhang, X. (2013). Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of experimental botany*, *64*(6), 1521-1536.

- Yu, B., & Wang, H. (2010). Translational inhibition by microRNAs in plants. In *miRNA Regulation of the Translational Machinery* (pp. 41-57). Springer Berlin Heidelberg.
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B. C., & Walbot, V. (2015). Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Current opinion in plant biology*, 27, 84-90.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal*, 26(6), 1691-1701.
- Zimmerman JL (1993) *Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants*. Plant Cell 5:1411-1423