



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE POSIBLES MIEMBROS DEL
RECOMBINOSOMA TEMPRANO EN MAÍZ**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
ANA KAREN GÓMEZ ANGOA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ARNAUD JACQUES MARCEL RONCERET
Instituto de Biotecnología- Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LOPEZ
Instituto de Biotecnología- Universidad Nacional Autónoma de México

DRA. SVETLANA SHISHKOVA
Instituto de Biotecnología- Universidad Nacional Autónoma de México

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2019



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.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Generalidades de la meiosis.....	5
1.2 La recombinación meiótica	8
1.3 La proteína Spo11 y su papel en la formación de Rupturas de Doble Cadena en el DNA (RDCs).	12
1.3.1 Mecanismo de acción de las topoisomerasas de tipo II.....	12
1.3.2 Los genes <i>spo11</i> en eucariontes.	14
1.3.3 Mecanismos de empalme alternativo de los transcritos <i>Spo11</i>	15
1.4 El complejo de recombinación meiótica temprana.....	18
1.5 El contexto espacial de las RDCs y su distribución.	19
2. ANTECEDENTES	21
3. HIPÓTESIS	23
4 OBJETIVO GENERAL.....	23
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
5. MÉTODOS	24
5.1 Anotación y análisis de los diferentes transcritos para los genes contenidos en distintas bases de datos.	24
5.2 Identificación de proteínas ortólogas a AtMTOPIVIB en maíz.	24
5.2.1 Alineamiento de las secuencias de proteínas.....	25
5.2.2 Modelo tridimensional de la proteína MTOPIVIB1.	26
5.3 Extracción de RNA.....	27
5.4 Generación de DNA complementario (cDNA).....	28
5.5 PCR sobre DNA genómico de la línea de maíz B73.....	29
5.6 RT-PCR punto final	30
5.7 RT-qPCR de los transcritos <i>SPO11-1</i> , <i>SPO11-1B</i> , <i>SPO11-2</i> , <i>SPO11-3</i> y <i>MTOPIVIB1</i>	31
6.RESULTADOS	35
6.1 Análisis bioinformáticos de los genes <i>MTOPIVIB1</i> , <i>MTOPIVIB2</i> y <i>PRD1</i> . 35	
6.1.1 Las proteínas MTOPIVIB de maíz presentan motivos conservados.....	35
6.1.2 MTOPIVIB1 es estructuralmente similar a Topo VIB de <i>S. shibatae</i>	38
6.1.3 PRD1 de maíz tiene similitud con las proteínas ortólogas en plantas y animales.	39

6.2 Análisis de la expresión de <i>SPO11-1</i> , <i>SPO11-2</i> , <i>SPO11-3</i> , <i>MTOPVIB1</i> , <i>MTOPVIB2</i> y <i>PRD1</i>	42
6.2.1 La calidad del RNA permite realizar análisis posteriores	42
6.2.2 Estandarización de las reacciones de amplificación para el análisis de expresión por RT-PCR.	45
6.2.3 <i>SPO11-1</i> produce al menos dos transcritos.....	48
6.2.4 La expresión de los genes de referencia y los genes de interés varía entre réplicas biológicas.....	50
6.2.5 Los genes <i>SPO11</i> en maíz se expresan en los órganos vegetativos y reproductivos.....	50
6.2.6. Un mecanismo de “splicing” alternativo del mRNA genera dos transcritos de <i>SPO11-2</i>	53
6.2.7 <i>MTOPVIB1</i> se expresa en órganos vegetativos y reproductivos, mientras que <i>MTOPVIB2</i> no se expresa en los órganos analizados.	54
6.2.8 <i>PRD1</i> se expresa en órganos vegetativos y reproductivos.....	54
6.2.9 Los oligonucleótidos para el transcrito del gen de referencia <i>CYANASA</i> tienen eficiencia aceptable para un ensayo de RT-qPCR.....	55
6.2.10 Los oligonucleótidos para los transcritos <i>SPO11-1</i> , <i>SPO11-1B</i> , <i>SPO11-2</i> , <i>SPO11-3</i> y <i>MTOPVIB1</i> son eficientes para un ensayo de RT-qPCR y generan productos únicos.....	56
6.2.11 La abundancia de los transcritos <i>SPO11-1</i> , <i>SPO11-1B</i> , <i>SPO11-2</i> y <i>MTOPVIB1</i> está enriquecida en los órganos reproductivos.....	59
7. DISCUSIÓN.....	63
8. CONCLUSIONES	72
9. PERSPECTIVAS	73
10. REFERENCIAS	74
11. ANEXOS.....	82

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el departamento de Biología Molecular de Plantas en el laboratorio de Citogenómica de la Meiosis bajo la asesoría del Dr. Arnaud Ronceret. Este proyecto fue financiado por la DGAPA-PAPIIT UNAM a través del proyecto IA201217. Ana Karen Gómez Angoa recibió una beca de maestría por parte del CONACYT (CVU 742205).

AGRADECIMIENTOS

A la Biól. Elda Patricia Rueda Benítez por el valioso apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo, especialmente en la clonación de los fragmentos de los transcritos alternativos.

A la M. en C. Mayra Liliana López Valle por su asesoría y apoyo técnico brindado para la realización de los ensayos de qRT-PCR.

A los miembros del comité tutor, Dra. Svetlana Shishkova y Dra. Gladys Cassab López, por todo el apoyo y sus valiosas aportaciones a este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Joseph Dubrovsky, Dra. Martha Veronica Vazquez Laslop, Dr. Alexandre Tromas, Dr. José Luis Reyes Taboada y Dra. Elizabeth Cordoba Martínez, por todos los comentarios y sugerencias a la tesis, los cuales ayudaron a mejorar significativamente este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Ixtlilxochitl y Alejandro, y a mis hermanas Dalia e Issel, por tanta paciencia, apoyo y cariño. Por todo el esfuerzo que han puesto en mí, sin ustedes no lo habría logrado.

A mis abuelitos, por su incansable cariño y su gran ejemplo.

Al Dr. Arnaud Ronceret, por darme la oportunidad y la confianza de trabajar en este proyecto e incorporarme a su laboratorio. Gracias por la paciencia y apoyo para concluir el proyecto.

A mis amigos de la facultad, Andrea Valdés, Germán Hernández, Jorge García, Isareli Cruz y Tadeo Covarrubias, por todos los consejos, por animarme a seguir y por compartir muy buenos momentos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por confiar en mí, por formar un gran equipo y siempre estar dispuestos a colaborar. A Paty Rueda, Viri Rivas, Fer Lledías, Dulce García y Yared, por brindarme su amistad sincera y por siempre hacer divertido el trabajo en el laboratorio.

A mis todos mis compañeros y amigos de la maestría, por hacer mucho más agradable el camino. Gracias por compartir su tiempo, conocimiento y reactivos; sin todos ustedes este proyecto no habría sido posible.

A mis compañeras de casa, por generar un ambiente de amistad y confianza.

A mis amigos de Oaxaca, en especial a Eunice Franco y Denisse Canseco, que a pesar del tiempo y la distancia siempre han estado presentes.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
CDS	Secuencia codificante (“Coding Sequence” en inglés)
CO	Empalme recombinante (“Crossover” en inglés)
Cq	Ciclo en el cual un producto de RT-qPCR cruza el umbral de fluorescencia predeterminado.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
H	Hoja
IF	Inflorescencia femenina
IM	Inflorescencia masculina
NCO	Parche recombinante (“Non crossover” en inglés)
nM	Nanomolar
NMD	Degradación de mRNA mediada por mutaciones sin sentido (“Nonsense-mediated mRNA decay” en inglés)
mM	Milimolar
M	Molar (mol/L)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
µL	Microlitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction” en inglés)
PTC	Codón de paro prematuro (“Premature termination codon” en inglés)
R	Raíz
RDC	Ruptura de doble cadena
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rxn	Reacción
seg	Segundo
SDSA	Vía de alineamiento de cadenas dependiente de síntesis (“Synthesis-dependant strand annealing” en inglés)
Taq Polimerasa	DNA polimerasa proveniente de la bacteria <i>Thermophilus aquaticus</i>
UTR	Región no traducida (“Untranslated region” en inglés)

RESUMEN

La recombinación meiótica inicia con la formación de Rupturas de Doble Cadena en el DNA (RDCs), catalizadas por un complejo proteínico nombrado recombinosoma temprano. El recombinosoma temprano se compone de un centro catalítico y de proteínas accesorias. Se ha propuesto que el centro catalítico actúa por un mecanismo similar al de una topoisomerasa de tipo II, las cuales realizan cortes en cadenas dobles de DNA; y está conformado por proteínas Spo11 y proteínas de la familia MTOPVIB/TOPOVIBL. Las proteínas accesorias son necesarias para la formación de RDCs y se caracterizan por interactuar directamente con componentes del centro catalítico. En plantas se reconoció a PRD1 como una proteína accesoria (De Muyt *et al.*, 2007; De Muyt *et al.*, 2009), la cual corresponde a un ortólogo de MEI1 en ratón y dahumano (Libby *et al.*, 2002). Se ha demostrado que PRD1 interactúa directamente con las proteínas Spo11 y MTOPVIB1 (De Muyt *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2017), lo que apoya la hipótesis de su participación dentro del complejo. La proteína Spo11 está codificada por un solo gen en la levadura del pan y en ratón, contrario a los genomas vegetales que presentan más de un gen *spo11*. En maíz se encontraron tres genes *SPO11* en el genoma, *SPO11-1*, *SPO11-2* y *SPO11-3*. *SPO11-1* presentó un mecanismo de “splicing” alternativo del RNA mensajero generado por la retención del intrón dos, que permite la formación de dos transcritos principales, *SPO11-1A* y *SPO11-1B*. Por otro lado, se identificaron dos genes *MTOPVIB/TOPOVIBL* en maíz, que contrasta con lo reportado en otras especies en las que se presenta un solo gen. Dichos genes fueron nombrados *MTOPVIB1* y *MTOPVIB2*. *MTOPVIB1* presentó mayor similitud con las proteínas de la familia y mantiene los motivos característicos conservados, mientras que *MTOPVIB2* presentó un menor grado de conservación y la mayor parte de los motivos están ausentes. En este trabajo se detectó únicamente la expresión de *MTOPVIB1* en los cuatro órganos analizados, los datos obtenidos sugieren que *MTOPVIB2* podría ser un pseudogen. Aunque se conocen a los ortólogos de la proteína PRD1 y se observa similitud entre ellos, no se han identificado dominios proteínicos y motivos que puedan dar indicios de la funcionalidad de esta proteína dentro del complejo.

La producción de RDCs y reparación en “crossovers” (COs, por sus siglas en inglés) no sólo promueven la variación genética sino también son esenciales para la segregación correcta de los cromosomas homólogos. La introducción de RDCs tiene un riesgo asociado ya que representa un daño al DNA, sin embargo, es un proceso altamente regulado en tiempo y espacio. Aunque no se han identificado secuencias consenso en el DNA que indiquen los sitios de RDCs, se sabe que éstas no se distribuyen de manera aleatoria en los cromosomas. Existen sitios en donde se producen las RDCs con mayor

preferencia. Para que las RDCs se realicen de forma precisa debe existir una regulación del recombinosoma temprano en diferentes niveles, uno de los cuales puede ser transcripcional. En este trabajo evaluamos la expresión de seis posibles miembros del recombinosoma temprano en dos órganos vegetativos (hoja y raíz) y en los órganos reproductivos (inflorescencias masculina y femenina) de maíz. Los resultados muestran que la expresión de los genes *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1* y *PRD1* no es exclusiva de los órganos reproductivos que contienen a los meiocitos, sino también de órganos vegetativos que están compuestos únicamente de células somáticas. No obstante, se determinó un enriquecimiento en la abundancia de los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1* en los órganos reproductivos. Los transcritos canónicos *SPO11-1* y *SPO11-2* tuvieron un enriquecimiento con una relación mayor a seis. Aunque la abundancia del transcrito *SPO11-1B* mostró porcentajes muy bajos, se observó un incremento en los órganos reproductivos. La acumulación de dicho transcrito podría ser parte de un mecanismo de regulación transcripcional de *SPO11-1* o del recombinosoma temprano. La abundancia del transcrito *MTOPVIB1* disminuyó en los cuatro órganos analizados en comparación con los transcritos *SPO11*, pero el enriquecimiento en órganos reproductivos fue más elevado, con una relación mayor a 40, lo cual podría sugerir que el control de la transcripción de este gen involucra una regulación más fina y podría favorecer la especificidad del complejo. En conjunto, estos datos sugieren que existe una regulación fina a nivel transcripcional de los miembros del recombinosoma temprano en maíz.

ABSTRACT

Meiotic recombination initiates with the introduction of programmed Double Strand Breaks (DSBs) by the early recombinosome, which consists of a catalytic core and several accessory proteins. The catalytic core consists of Spo11 and MTOPVIB/TOPOVIBL proteins and works through a topoisomerase-like mechanism. PRD1 has been identified as an accessory protein in plants, and has some similarities to MEI1 in mouse and mammals. This protein directly interacts with catalytic core members. Unlike yeast and mouse where Spo11 is encoded by one gene, plants have more than one gene encodes for Spo11 proteins. In maize there are three *SPO11* paralog genes, *SPO11-1* is regulated by alternative splicing, and two major mRNA isoforms are formed by intron two retention, *SPO11-1A* and *SPO11-1B*. By contrast to the unique gene in other species, two *MTOPVIB* genes have been identified in maize, *MTOPVIB1* and *MTOPVIB2*, putatively encoding two proteins MTOPVIB1, and MTOPVIB2. MTOPVIB1 contains the conserved motifs and structure of other family members whereas, the putative protein MTOPVIB2 does not. Furthermore, we detected the presence of *MTOPVIB1* transcript in four organs, but not the ones of *MTOPVIB2*. These results suggest that *MTOPVIB2* could be a pseudogene.

Meiotic recombination promotes homologous pairing and physical connections between homologous chromosomes (homologous) through crossovers (COs), which are essential for a proper homologous segregation at first meiotic division. DSBs formation has an associated risk to DNA damage and an incorrect repair could lead to cellular damage, nonetheless, the process is temporary and spatially regulated. The regulation might operate at multiples levels in order to produce DSBs at the right time, place and number. A transcriptional regulation of early recombinosome members could be a possibility in the control of DSBs formation. Here we analyzed the expression of *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* and *PRD1*, six putative early recombinosome genes in two vegetative organs (root and leaves) and in the reproductive organs (ear and tassel) at meiotic stage. The results showed an increase in transcript relative abundance in reproductive organs that suggested only a minor transcriptional regulation of early recombinosome members in meiotic cells. The relative abundance of the *SPO11-1B* and *MTOPVIB1* transcripts was lower than the one of canonical transcripts of *SPO11-1* and *SPO11-2* suggesting that these subtle differences could be part of a fine transcriptional regulation of early recombinosome in maize.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la meiosis

La meiosis es un tipo de división celular especializada, mediante la cual se producen células haploides a partir de una célula diploide. Este proceso es de gran relevancia para los organismos con reproducción sexual, ya que les permite generar variabilidad genética y mantener un nivel de ploidía constante a través de las generaciones; el mantenimiento de un número constante de cromosomas en las células somáticas es posible debido a que las células reproductivas reducen a la mitad su material genético para posteriormente restaurar la ploidía durante la fertilización (Lambing *et al.*, 2017). La reducción del material genético durante la meiosis es factible porque se realiza únicamente una ronda de duplicación del DNA y dos rondas sucesivas de segregación de los cromosomas (Zickler y Kleckner, 2015).

Al igual que en la mitosis, las células meióticas inician la división duplicando sus cromosomas durante la fase S (de síntesis) del ciclo celular y como resultado se obtienen pares de cromátidas hermanas de cada cromosoma, las cuales se encuentran estrechamente unidas a lo largo de todo el cromosoma por complejos de cohesinas. La segregación de los cromosomas homólogos ocurre durante la primera división (meiosis I) (Alberts *et al.*, 2015), este evento es específico del ciclo meiótico y es clave para la producción de células haploides. La meiosis I es conocida también como división reduccional (Wang *et al.*, 2014). En la segunda división (meiosis II) ocurre la segregación de las cromátidas hermanas; esta división es similar a la mitosis y es conocida como división ecuatorial (Wang *et al.*, 2014). Basado en la dinámica de los cromosomas se pueden distinguir cuatro etapas dentro de cada ronda de división meiótica, estas son: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales comparten similitud (Figura 1), en términos de la condensación y la segregación de los cromosomas entre la mitosis y meiosis (Wang *et al.*, 2014).

Posterior a la fase S premeiótica inicia la profase I, en la que ocurren los eventos más significativos de la meiosis. Además, la profase I se caracteriza por ser la etapa más larga del ciclo meiótico, ya que conforma alrededor del 85% al 95% del

tiempo total. La profase meiótica se asemeja a la fase G2 del ciclo celular, por lo que pocas veces se hace referencia a la fase G2 en la meiosis (Alberts *et al.*, 2015). De acuerdo a las características citológicas de los cromosomas, la profase I está dividida en cinco etapas consecutivas: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis (Figura 1) (Wang *et al.*, 2014). En la fase leptoteno las cromátidas hermanas duplicadas se encuentran condensadas y unidas por un complejo de cohesinas, formando una estructura de filamento o de hilo visible al microscopio (Wang *et al.*, 2014).

Durante la transición entre la fase leptoteno y la fase cigoteno ocurre un reconocimiento entre los cromosomas homólogos, en un proceso conocido como apareamiento, no obstante, el mecanismo por el cual se lleva a cabo sigue sin ser completamente comprendido. Existen algunas evidencias que muestran que, antes de que se establezca un apareamiento específico entre los cromosomas homólogos, ocurren interacciones independientes entre los cromosomas; una de estas evidencias es la observación citológica de agrupaciones de telómeros y apareamiento o agrupación de centrómeros (Wang *et al.*, 2014). En la fase de cigoteno los cromosomas homólogos se encuentran asociados de manera más estrecha mediante la formación de una estructura proteínica a lo largo del eje entre los cromosomas homólogos, conocida como complejo sinaptonémico (CS) (Zickler y Kleckner, 2015); la sinapsis o formación del CS comienza en algunas regiones del cromosoma y posteriormente se va extendiendo hasta cubrirlo completamente (Wang *et al.* 2014).

El establecimiento completo del complejo sinaptonémico define la fase de paquiteno. En la fase diploteno el complejo sinaptonémico se disocia y los cromosomas homólogos permanecen unidos en los sitios de entrecruzamiento o CO; citológicamente los COs forman una estructura llamada quiasma (quiasmata en plural) (Zickler y Kleckner, 2015). La última etapa de la profase I es la diacinesis, caracterizada por la presencia de bivalentes que son los cromosomas homólogos altamente condensados y unidos físicamente en los sitios de CO, los bivalentes se mantienen hasta la metafase I donde se alinean a lo largo del eje ecuatorial de la célula para después ser segregados en la anafase I (Wang *et al.*, 2014).

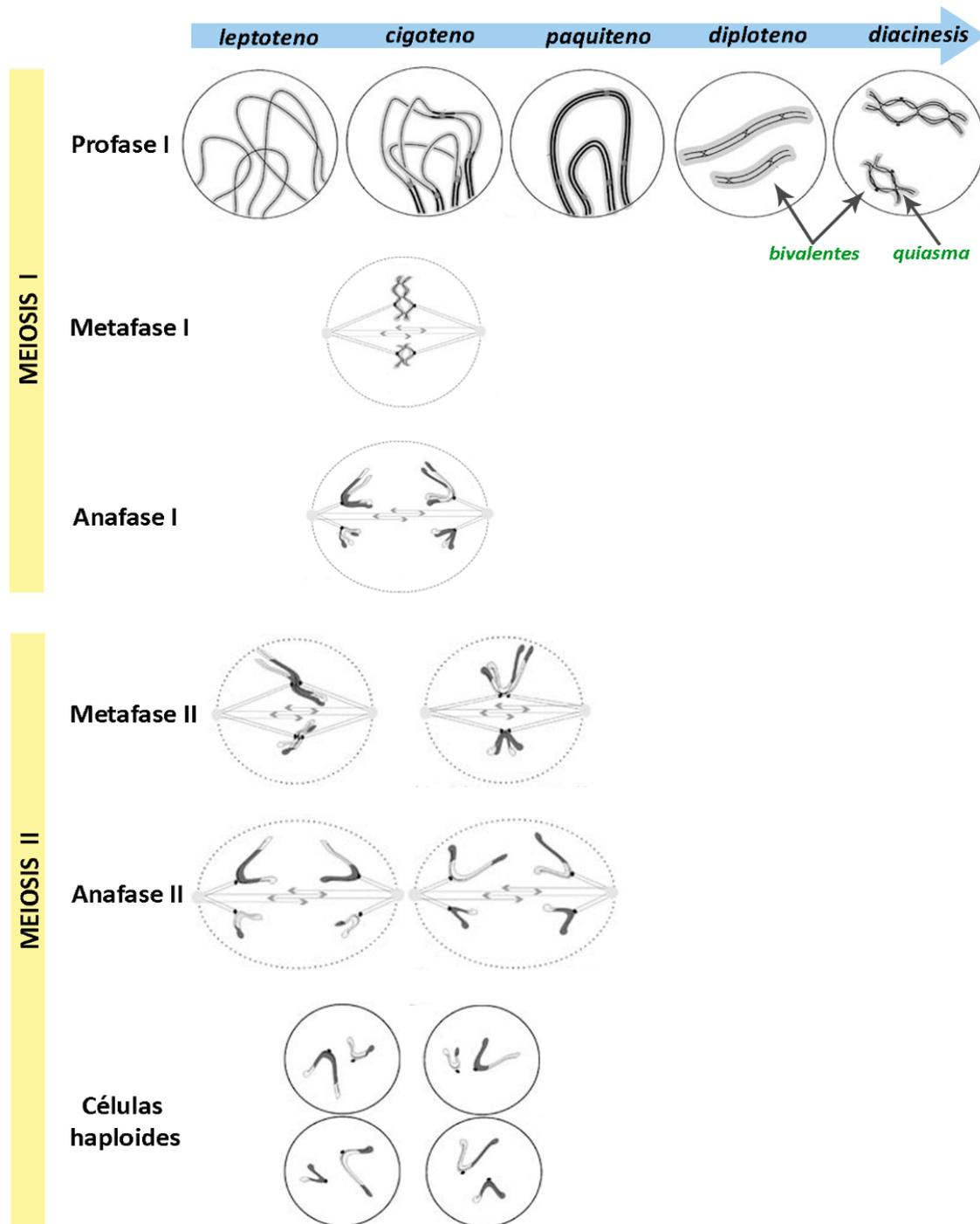


Figura 1. La meiosis como mecanismo de división. Antes de que ocurra la división meiótica las células duplican su material genético, por lo que los cromosomas que entran en meiosis están duplicados. Por lo tanto, cada cromosoma homólogo (paterno o materno) está compuesto por dos cromátidas hermanas. La meiosis consiste de dos divisiones (meiosis I y meiosis II); la meiosis I o división reduccional inicia con la profase I, durante la cual se llevan a cabo los eventos de la recombinación meiótica. Las etapas de la profase I se caracterizan por cambios en la conformación de los cromosomas, durante el leptoteno se producen rupturas de doble cadena en el DNA que inician con la búsqueda de las secuencias homólogas y el apareamiento de los cromosomas homólogos. La sinapsis inicia en la etapa de cigoteno en regiones que se han alineado previamente. En la etapa de paquiteno los sitios de entrecruzamiento o COs maduran y es en la etapa diploteno donde aparecen como quiasmas. Enseguida los cromosomas homólogos comienzan a separarse, excepto en los sitios donde se encuentran los COs. Durante la metafase I, los bivalentes se posicionan en el eje ecuatorial de la célula para posteriormente migrar hacia los polos en la anafase

I. En la segunda ronda de segregación o división ecuatorial se separan las cromátidas hermanas para formar las células haploides las cuales tendrán una sola copia del material genético (Figura modificada de Egel, 2007).

1.2 La recombinación meiótica

La recombinación desempeña un papel importante durante la meiosis, incrementa la diversidad genética y es fundamental para el apareamiento y la segregación de los cromosomas homólogos. Esto ocurre mediante la formación de COs, los cuales permiten establecer una conexión física entre los cromosomas homólogos antes de su segregación en la meiosis I (Petronczki *et al.*, 2003). La vía canónica de recombinación meiótica (Figura 2), inicia con la producción de rupturas de doble cadena en el DNA (RDC) a lo largo de los cromosomas; estas rupturas son catalizadas por una enzima altamente conservada en eucariontes llamada Spo11. Después de la formación de las RDCs, se lleva a cabo un corte endonucleolítico que provoca la liberación de oligonucleótidos cortos unidos covalentemente por el extremo 5' a Spo11. El DNA que se encuentra en el sitio de corte es procesado para generar segmentos largos de DNA de cadena sencilla con extremos 3' libres, mediante un proceso conocido como resección de 5' a 3', este evento es catalizado por el complejo enzimático MRX (Mre11, Rad50 y Xrs2) (Lam y Keeney, 2015; Watson *et al.*, 2008).

Las cadenas sencillas de DNA se asocian con las recombinasas Rad51 y Dmc1 para la formación de los nucleofilamentos, los cuales realizan la búsqueda de secuencias homólogas. Las proteínas Rad51 y Dmc1, homólogos de la recombinasa RecA de bacterias, promueven la invasión de las cadenas, evento que continúa en la recombinación meiótica (Brown y Bishop, 2014). Durante este proceso están involucradas diversas proteínas, entre ellas Hop2 y Mnd1 que funcionan como cofactores de Dmc1 (Brown & Bishop, 2014). Posteriormente, se lleva a cabo la migración de las ramas que resulta en la formación de un complejo de entrecruzamiento o doble unión de Holliday. Finalmente, el complejo de entrecruzamiento se resuelve generando empalmes recombinantes (CO) o parches recombinantes (NCO, "non crossover") (Lam y Keeney, 2015; Watson *et al.*, 2008).

La mayoría de las RDCs terminan en NCOs y aun no se comprende el mecanismo que determina que una RDC resulte en COs o NCOs. Sin embargo, se sabe que la

formación de los COs se controla en diferentes niveles (Lambing *et al.*, 2017). Uno de éstos se denomina CO obligado y hace referencia a que se requiere al menos un CO para la segregación correcta de los cromosomas homólogos. Otro es conocido como interferencia de CO y muestra que la presencia de un CO en una región disminuye la probabilidad de que ocurra otro CO cerca de esta región. La homeostasis de CO muestra que se produce un número determinado de COs por cromosoma, aún cuando el número de RDCs sea alterado. Esto último se observó en algunas especies como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y el ratón (*Mus musculus*: *M. musculus*), pero no en el maíz (*Zea mays*: *Z. mays*) (Lambing *et al.*, 2017).

La resolución endonucleolítica de las dobles uniones de Holliday es un elemento principal para explicar la formación de COs. Se reconocen dos clases de COs que se generan por vías independientes. La formación de COs de clase I depende del grupo de proteínas ZMM inicialmente identificado en *S. cerevisiae* y compuesto por las proteínas Zip1, Zip2, Zip3, Zip4, Spo16, Msh4, Msh5 y Mer3 las cuales tienen homólogos en plantas (Lambing *et al.*, 2017). La vía ZMM produce la entre un 80% y 90% del total de COs (Lambing *et al.*, 2017). Los COs de clase II corresponden del 10% al 20% del total de COs producidos y no están sometidos al efecto de interferencia (Berchowitz *et al.*, 2007). Los COs de clase II se pueden formar por la vía Mus81-Mms4, identificada también en *S. cerevisiae* (Berchowitz *et al.*, 2007, Lambing *et al.*, 2017). En plantas también se identificaron a los componentes de la vía Mus81-Mms4; en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) las mutaciones en dichos componentes reducen la cantidad de COs de clase II pero no completamente, por lo que se propuso que existe otra vía que no se ha identificado (Higgins *et al.*, 2008).

Se conocen tres vías para la formación de los NCOs. La primera involucra a la helicasa FANCM y sus dos cofactores MFH1 y MHF2; estas proteínas disocian intermediarios de la doble unión de Holliday generados durante la invasión de la cadena por la vía SDSA (SDSA por su nombre en inglés "Synthesis-dependant strand annealing") (Pâques y Haber, 1999; Lambing *et al.*, 2017). La segunda vía es a través del complejo RTR, formado por la helicasa RecQ, una topoisomerasa de tipo IA y la proteína RMI1, involucrado en el procesamiento de intermediarios de DNA producidos en la recombinación (Lambing *et al.*, 2017). La tercera vía es por

la resolución del complejo de entrecruzamiento mediante la ATPasa FIGL1 que actúa de manera independiente a FANCM (Figura 2). Las tres vías de formación de NCOs actúan de manera independiente y mutaciones en algún componente de cualquier vía resultan en un incremento en el número de COs, y el efecto es aditivo en mutantes en más de de las vías. Se sabe que los COs producidos en dichas mutantes dependen de MUS81 (Lambing *et al.*, 2017). Los datos indican que existen mecanismos independientes que limitan la producción de COs y favorecen la de NCOs (Lambing *et al.*, 2017).

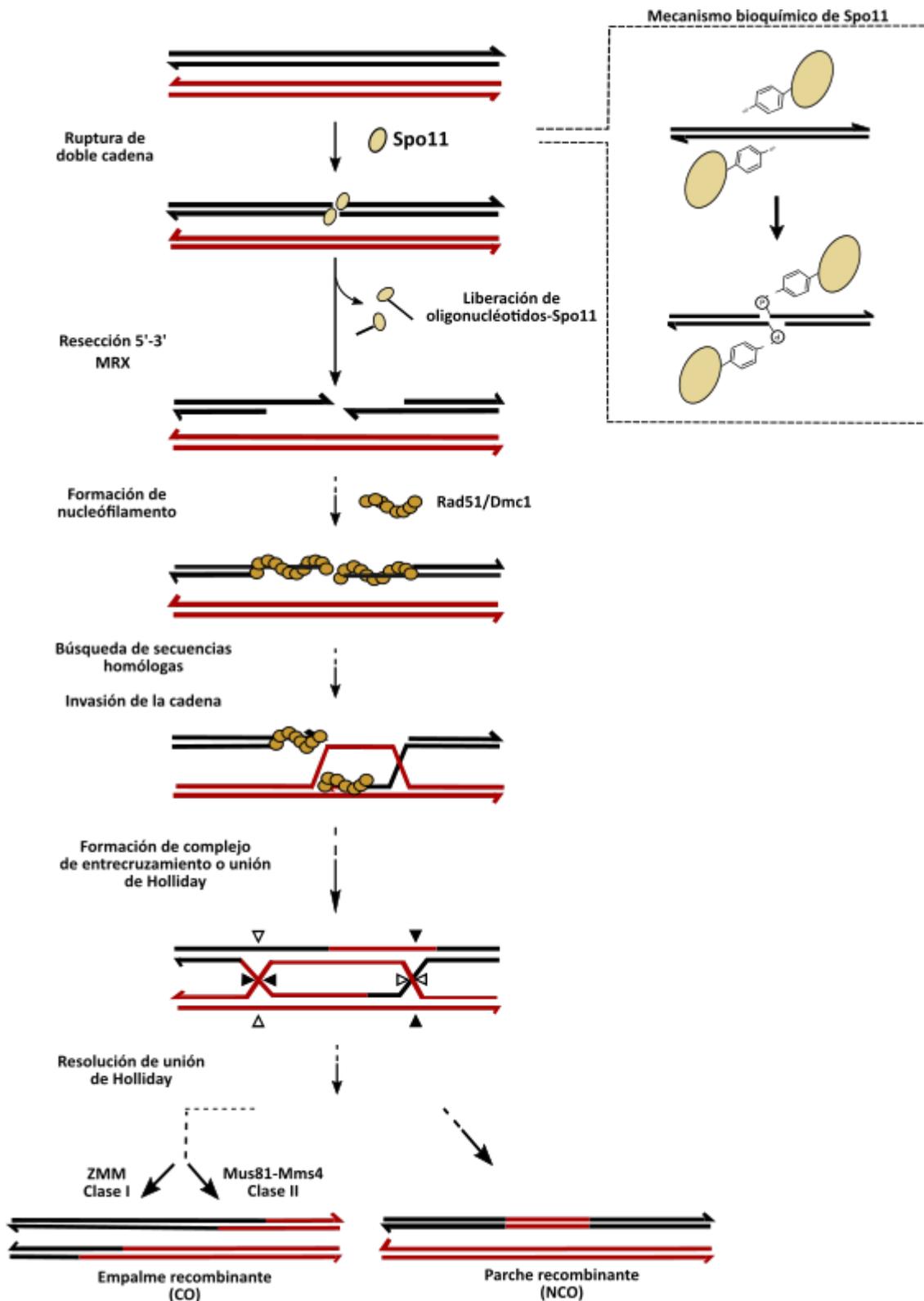


Figura 2. La recombinación meiótica. El proceso de recombinación meiótica inicia con la formación de rupturas de doble cadena en el DNA introducidas por la enzima Spo11. Los cortes endonucleolíticos generados resultan en la liberación de oligonucleótidos unidos a Spo11 que posteriormente se editan por el complejo MRX (Mre11, Rad50 y Xrs2) para generar cadenas sencillas de DNA con extremos 3' libres. Las cadenas sencillas de DNA se asocian con las proteínas Rad51/Dmc1 para generar los nucleofilamentos; Rad51/Dmc1 también promueven la búsqueda de las secuencias homólogas para que posteriormente se lleve a cabo la invasión de la

cadena del cromosoma homólogo (la invasión de la cadena se puede dar también entre cromátidas hermanas). Posteriormente ocurren los eventos de síntesis de DNA y ligación que resultan en la formación de un complejo de entrecruzamiento o doble unión de Holliday; la resolución de esta estructura lleva a formación de empalmes recombinantes (COs) o de parches recombinantes (NCOs). La formación de COs puede darse por diferentes vías que involucran a diferentes proteínas o complejos de proteínas. Las proteínas del complejo ZMM participan en la formación de COs de clase I mientras que las proteínas Mus81-Mms4 están involucradas en la formación de COs de clase II (Figura modificada de Robert *et al.*, 2016b y Lambing *et al.*, 2017).

1.3 La proteína Spo11 y su papel en la formación de Rupturas de Doble Cadena en el DNA (RDCs).

La enzima involucrada en la producción de las RDCs al inicio de la recombinación meiótica es Spo11 (proteína de esporulación 11). Esta proteína se identificó inicialmente en *S. cerevisiae* en un estudio donde se aislaron mutantes con deficiencias en la esporulación, que en dicho organismo representa la meiosis y formación de células sexuales (ascosporas) (Esposito y Esposito, 1969). En el estudio se buscaron mutantes que además pudieran continuar con el proceso de esporulación a temperaturas no óptimas, lo cual permite el análisis genético de la meiosis. de las mutantes antes mencionadas se identificó a *spo11* (Esposito y Esposito, 1969). Posteriormente se evidenció como la proteína que permanece unida a los oligonucleótidos generados por las RDCs. Estos descubrimientos sumados con análisis genéticos y a su similitud a nivel de secuencia con la topoisomerasa VI (Topo VI) de arqueas demostró que la proteína Spo11 cataliza las RDCs (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997). Otros estudios han demostrado la similitud bioquímica que existe entre Spo11 y Topo VI, ya que presenta aminoácidos conservados que además son indispensables para su función (Diaz *et al.*, 2002); la relación entre estas proteínas es clara y por ello es importante conocer cómo funcionan las topoisomerasas de este grupo.

1.3.1 Mecanismo de acción de las topoisomerasas de tipo II.

Las topoisomerasas son enzimas que tienen la capacidad de cambiar el estado topológico de moléculas de DNA, catalizando reacciones de ruptura y reunión del DNA (Wang, 1996; Corbett y Berger, 2004). Estas enzimas participan en la resolución de problemas topológicos que se presentan en las células durante el metabolismo del DNA, como en la replicación, la transcripción, la recombinación y la remodelación de la cromatina (Champoux, 2001). Las topoisomerasas se

clasifican en dos grupos con base en el tipo de ruptura que introducen en el DNA. Las topoisomerasas de tipo I catalizan la ruptura de un enlace fosfodiéster en una cadena de DNA, a través de la cual puede pasar otra cadena de DNA y, las topoisomerasas de tipo II catalizan cortes en ambas cadenas del DNA permitiendo el paso de una hebra de doble cadena de DNA a través de la ruptura generada (Champoux, 2001). Las topoisomerasas de tipo II se subdividen en dos grupos A y B. El grupo de topoisomerasas IIB está representado por la topoisomerasa VI (Topo VI) (Champoux, 2001).

La enzima Topo VI se descubrió y caracterizó inicialmente en la arquea *Sulfurus shibatae* (*S. shibatae*) (Bergerat *et al.*, 1994), funciona como un heterotetrámero compuesto por dos subunidades A y dos subunidades B (A₂B₂). La subunidad A tiene la actividad catalítica de la enzima, mientras que la subunidad B hidroliza ATP y forma un canal para el DNA. La subunidad A (Topo VIA) tiene dos dominios importantes para su función, el dominio WHD (“winged-helix domain” en inglés), que incluye a la tirosina (Y) catalítica y el dominio TOPRIM (topoisomerasa/primasa) que está presente en las topoisomerasas y primasas de bacterias, y en algunas nucleasas (Corbett y Berger, 2004). La subunidad B (Topo VIB) presenta tres dominios: el dominio GHLK (“Gyrase, Hsp90, Histidine kinase, MutL” en inglés) en el extremo amino terminal, encontrado también en la familia de las adenosin trifosfatasa (ATPasa) e involucrado en la unión e hidrólisis del ATP (Corbett y Berger, 2003); el dominio transductor en el extremo carboxilo terminal se ha propuesto que establece una comunicación entre el dominio GHKL y la subunidad A de la topoisomerasa (Corbett y Berger, 2003; Graille *et al.*, 2008); el dominio H2TH (“helix-two turns-helix” en inglés) parece ser único de las proteínas Topo VI, éste conecta a los dominios GHKL y transductor, pero su función no se ha descrito a detalle (Corbett y Berger, 2003).

Se ha propuesto un mecanismo de acción para las enzimas Topo VI mediado por la formación de dos puertas (Figura 3) por las cuales una molécula de DNA puede pasar a través de otra (Corbett y Berger, 2004), este modelo ha sido apoyado con la información obtenida de la estructura de la enzima Topo VI en arqueas (Graille *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 1999) (Figura 3).

Anteriormente se reportó que los eucariontes usaban preferentemente

topoisomerasas del tipo IIA (Wang, 1996), sin embargo, el descubrimiento y la caracterización de Spo11 y otros ortólogos de Topo VI en plantas cambió esta visión (Hartung *et al.*, 2002a; Hartung y Puchta, 2001). Las proteínas identificadas se asociaron a distintos procesos celulares, particularmente Spo11 mostró una función durante la meiosis (Bergerat *et al.*, 1997; Hartung *et al.*, 2002a). Spo11 presenta homología a Topo VIA (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney, 2007) y en ella se identificaron los dominios conservados WHD y TOPRIM. En el 2016 se identificó un tipo de proteínas ortólogas a Topo VIB en eucariontes, que participan en la meiosis y además presentan interacción con las proteínas Spo11 (Robert *et al.*, 2016a; Vrielynck *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016) por lo que se propuso que el inicio de la recombinación meiótica se produce por la actividad de una topoisomerasa VI.

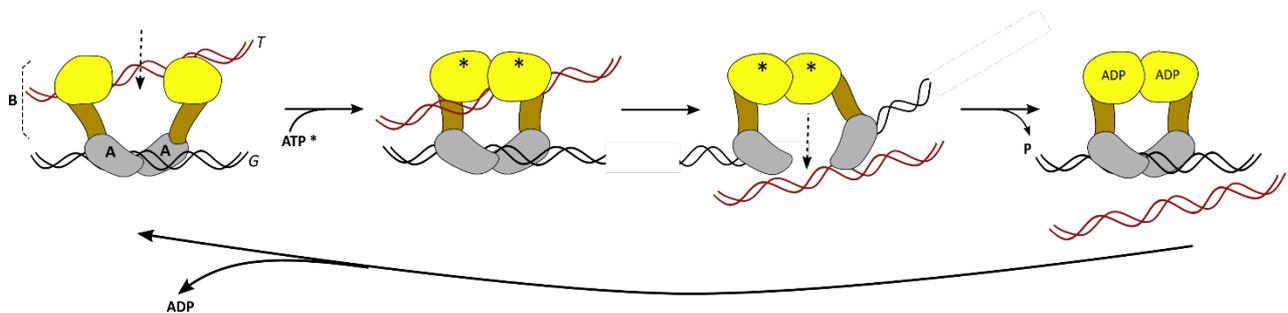


Figura 3. Mecanismo de acción de la topoisomerasa VI (Topo VI) de arquea. El modelo de las dos puertas (Corbett y Berger, 2004) describe el mecanismo de acción de Topo VI, un heterotetrámero compuesto por dos subunidades A (en gris) y dos subunidades B (en amarillo y café). Las subunidades A se unen a una molécula de DNA de doble cadena (G), en la cual se realizan los cortes para formar una puerta; otra molécula de DNA (T) atraviesa la enzima por la primera puerta que se forma entre los dominios GHKL (amarillo) de las subunidades B. La unión e hidrólisis de ATP (indicado con asterisco) induce la dimerización de las subunidades B que atrapan a la molécula y produce un cambio conformacional acompañado de la ruptura de la doble cadena de DNA lo cual provoca que se abra la segunda puerta formada por las subunidades A y la molécula G, por donde pasa la molécula T. La liberación de ADP y la unión de la molécula G terminan con este mecanismo, la enzima Topo VI regresa a su estado inicial y se recicla (Figura modificada de Robert *et al.*, 2016b).

1.3.2 Los genes *Spo11* en eucariontes.

Spo11 está ampliamente distribuida y conservada en los eucariontes; en la mayoría de los genomas se encuentran genes que codifican para las proteínas Spo11, aún en algunos linajes que no tienen ciclo sexual o en algunos donde no se ha identificado una etapa meiótica en su ciclo de vida (Ramesh *et al.*, 2005). La

función de Spo11 en la recombinación meiótica se demostró en especies de hongos, en nematodos, en *Drosophila melanogaster* y en *M. musculus* (Revisado en Keeney, 2007). En algunas especies como *S. cerevisiae* y *M. musculus*, Spo11 se codifica por un solo gen y alteraciones en éste causan esterilidad y defectos en la recombinación. A diferencia de lo reportado para *S. cerevisiae* y *M. musculus*, los genomas vegetales presentan más de un gen parálogo a Spo11 en una organización genética más compleja que en muchos otros organismos (Grelon *et al.*, 2001; Hartung y Puchta, 2000; Jain *et al.*, 2006). En *A. thaliana* se identificaron tres genes homólogos a Spo11 nombrados SPO11-1, SPO11-2, y SPO11-3. SPO11-1 y SPO11-2 están involucrados en la formación de las RDCs (Stacey *et al.*, 2006), mientras que SPO11-3 no es esencial para la recombinación meiótica pero participa en la endoreduplicación somática (Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). Al igual que en muchas de las especies de plantas, en el maíz se han identificado tres genes homólogos de Spo11. Los tres genes SPO11 codifican para proteínas que conservan los dominios característicos de éstas proteínas, sin embargo, la función meióticas de éstos ha sido descrita sólo para el gen SPO11-1, el cual es necesario para la formación de bivalentes, el apareamiento y la sinapsis de los cromosomas (Ronceret *et al.*, 2018, En prensa).

La organización de los genes SPO11 está conservada en varias especies vegetales en las cuales se observó que los genes SPO11-1 y SPO11-2 presentan el mismo número de exones e intrones (Sprink y Hartung, 2014). Por otro lado, el gen SPO11-3 está compuesto por dos exones y un intrón en *A. thaliana* (Hartung *et al.*, 2002a; Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2002), mientras que en maíz se identificó únicamente un exón (Ronceret *et al.*, 2018, En prensa .). Un aspecto interesante es que de los genes SPO11 de plantas, SPO11-3 presenta un mayor porcentaje de identidad con SPO11 de las algas verdes (Malik *et al.*, 2007), pero SPO11 de algas verdes presenta una gran cantidad de exones (Malik *et al.*, 2007).

1.3.3 Mecanismos de empalme alternativo de los transcritos Spo11.

En *spo11* de ratón y de humanos se observó la formación de dos transcritos: *Spo11α* y *Spo11β*, los cuales presentan una expresión diferencial, el transcrito largo *Spo11β* se expresa en etapas tempranas de la profase I, cuando ocurre la formación de la mayoría de RDCs; mientras que el transcrito corto *Spo11α* se

expresa más tarde, durante el paquiteno/diploteno (Bellani *et al.*, 2010; Kauppi *et al.*, 2011; Romanienko y Camerini-Otero, 2000). La organización *Spo11* en ratón consta de 13 exones y 12 intrones; el transcrito *Spo11α* se forma por la exclusión del exón 2 y codifica para una proteína de 358 aa, por otro lado, el transcrito *Spo11β* mantiene los 13 exones y codifica para una proteína de 396 aa. Estos transcritos codifican para dos isoformas de SPO11, SPO11α y SPO11β, aunque ambas participan en la recombinación meiótica presentan funciones particulares. Por un lado SPO11β participa en la recombinación de los autosomas, mientras que SPO11α está involucrada en la recombinación de cromosomas sexuales XY y permite su apareamiento correcto (Kauppi *et al.*, 2011).

En algunas especies vegetales se identificaron también mecanismos de “splicing” alternativo de los transcritos derivados de *SPO11-1* y *SPO11-2*. Sprink y Hartung en el 2014 reportaron la producción de más de un transcrito de ambos genes en *A. thaliana*, *Oryza sativa* (*O. sativa*), *Brassica rapa* (*B. rapa*), *Carica papaya* (*C. papaya*) y *Physcomitrella patens* (*P. patens*). En dicho estudio se describieron eventos de exclusión de exones, empalme alternativo 5' y 3' y retención de intrones; varios de los transcritos identificados presentaron más de un evento de empalme alternativo. Entre los transcritos producidos por “splicing” alternativo se encontraron algunos que mantienen el marco de lectura y podrían generar proteínas funcionales, aunque hasta ahora no se ha demostrado si estos transcritos se traducen. Sin embargo, muchos de los transcritos generados producen codones de paro prematuros (PTC, “premature termination codon” en inglés), sobre todo como resultado de eventos de retención de intrones, así como también de eventos de empalme alternativo 5' y 3' que producen cambios en la longitud de exones. Cabe mencionar que la producción de diversos transcritos se lleva a cabo no sólo en órganos reproductivos sino también en órganos vegetativos.

SPO11-1 y *SPO11-2* de *A. thaliana* presentan un intrón en la región 3' UTR (“Untranslated region”, por sus siglas en inglés), en la cual puede ocurrir un evento de “splicing” alternativo; dentro de este intrón se localiza uno de los tres sitios de poliadenilación que se identificaron en la región 3' UTR de ambos genes (Hartung y Puchta, 2000). En de *SPO11-2* se encontraron transcritos con los tres diferentes sitios de poliadenilación en cantidades equimolares; dos de estos sitios de poliadenilación resultan en la generación de transcritos complementarios a otro

RNA mensajero (mRNA) en antisentido proveniente de un gen distinto (Hartung y Puchta, 2000). De manera interesante, el sitio de poliadenilación ubicado en el intrón de la región 3' UTR evita la formación de transcritos de *SPO11-2* complementarios a dicho mRNA en antisentido. El mecanismo de empalme alternativo en la región 3' UTR del gen *SPO11-2* podría ser una forma de regulación de la expresión del mismo y tener implicaciones en la traducción de la proteína (Hartung y Puchta, 2000).

En el maíz también se forman dos transcritos maduros de *SPO11-1* como resultado del empalme alternativo, lo que resulta en la generación de dos isoformas de la proteína (Ronceret *et al.*, 2018, En prensa). Estas dos isoformas de *SPO11-1* difieren en tamaño, la isoforma más grande adiciona 43 aminoácidos río arriba del dominio WHD, como resultado de la retención del intrón 2 (Ronceret *et al.*, 2018, En prensa). Hasta ahora se desconoce si los transcritos presentan una expresión diferencial y si las proteínas tienen funciones distintas durante la meiosis, como lo reportado para ratón, ya que en el maíz no existen cromosomas sexuales y todos los cromosomas inician la recombinación de manera sincronizada. Un análisis bioinformático muestra que las isoformas grandes de la proteína Spo11 en ratón, humano y maíz presentan una región única de estas isoformas, aunque la secuencia de aminoácidos no está completamente conservada (Figura 4, recuadro negro).

Hasta ahora no se ha descrito con detalle la función de los transcritos alternativos en plantas, a diferencia de lo que se reportó en ratón, por lo que se desconoce si este mecanismo tiene algún efecto en la recombinación meiótica.

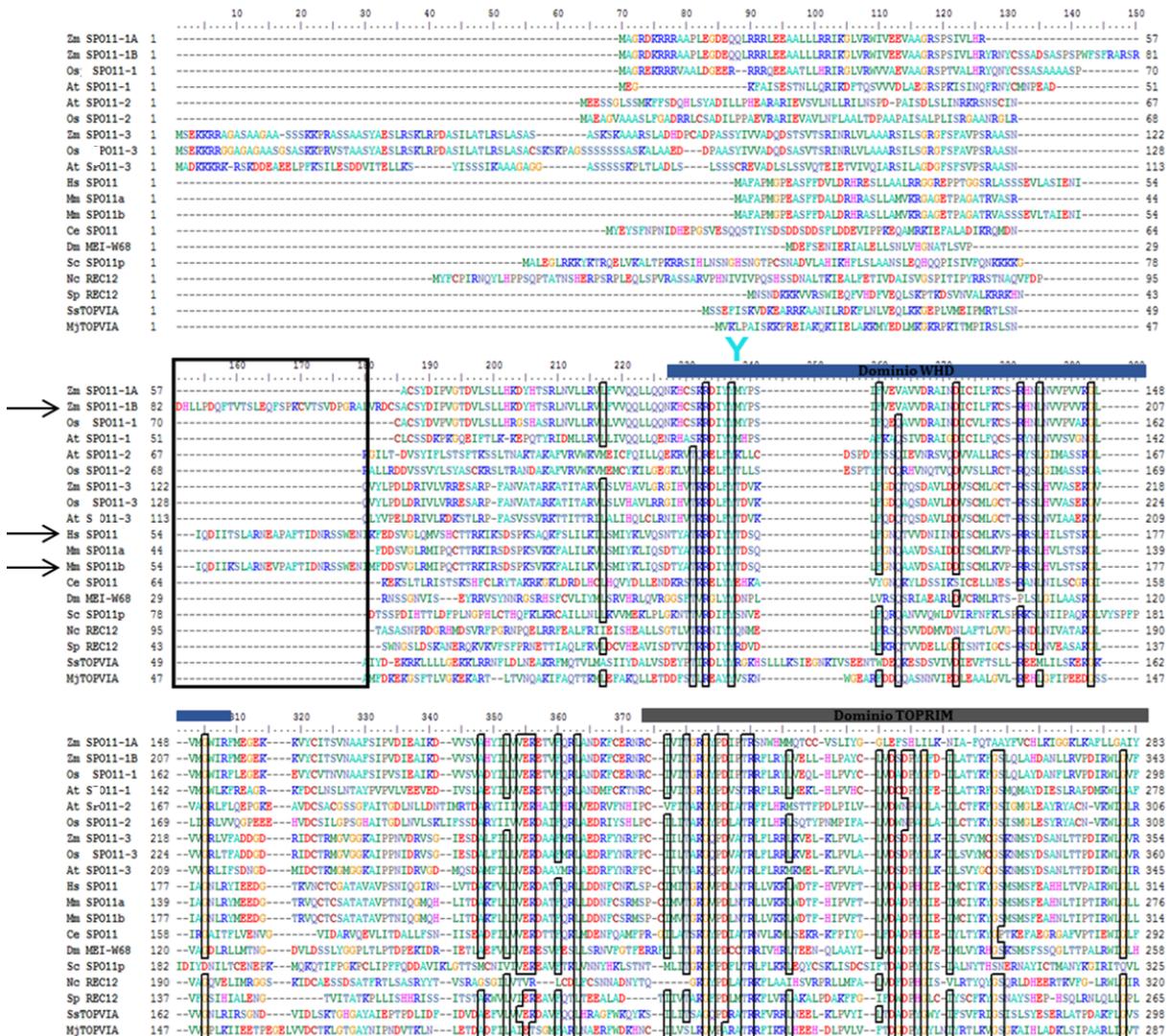


Figura 4. Alineamiento entre proteínas Spo11. En la figura se muestra un alineamiento en secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de las proteínas Spo11 en varios organismos (Ss: *Sulfurus shibatae*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*, Nc: *Neurospora crassa*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, At: *Arabidopsis thaliana*, Zm: *Zea mays*, Os: *Oryza sativa*, Mm: *Mus musculus*, Hs: *Homo sapiens*); en la banda gris se indica el dominio TOPRIM y en la banda azul el dominio WHD; en el recuadro negro se muestra una región única de las isoformas grandes de la proteína Spo11 en ratón (*M. musculus*), humano (*H. sapiens*) y maíz (*Z. mays*); Y: tirosina catalítica. (Ronceret et al., 2018, En prensa).

1.4 El complejo de recombinación meiótica temprana

Se sabe que la proteína Spo11 de *S. cerevisiae* trabaja en conjunto con otras proteínas necesarias para la formación de las RDCs: hasta ahora se han identificado al menos nueve proteínas adicionales (Rad50, Mre11, Xrs2, Rec102, Rec104, Rec114, Ski8, Mer2 y Mei4), importantes para iniciar la recombinación meiótica; estas proteínas forman un complejo inicial de recombinación meiótica o

recombinosoma temprano (Panizza *et al.*, 2011). Algunas de las funciones que se propusieron para estas proteínas son promover la unión de Spo11 a sus sitios blancos, la activación de Spo11 y la coordinación de la formación de las RDCs en un contexto de cromatina en eucariontes superiores (Keeney, 2007). En *A. thaliana* también se requieren proteínas adicionales a SPO11-1 para la formación de las RDCs, entre las cuales se han identificado a las proteínas SPO11-2, PRD1 y MTOPVIB (De Muyt *et al.*, 2009; Stacey *et al.*, 2006; Vrielynck *et al.*, 2016). El fenotipo asociado a las mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas es la carencia de sinapsis en la profase I y una reducción drástica en la presencia de quiasmas durante la metafase I (De Muyt *et al.* 2009). El gen *PRD1* de *A. thaliana* codifica para una proteína de 1330 aminoácidos, involucrada en la recombinación meiótica y formación de las RDCs, al igual que su ortólogo en ratón MEI1, pero hasta ahora no se han identificado dominios conservados en esta proteína (De Muyt *et al.*, 2007). Se ha demostrado que PRD1 interactúa de manera directa con SPO11-1 y con MTOPVIB, lo que sugiere que forma parte del recombinosoma temprano (De Muyt *et al.* 2007; Tang *et al.*, 2017).

Las proteínas MTOPVIB/TOPOVIBL son esenciales para la formación de las RDCs (Fu *et al.*, 2016; Robert *et al.*, 2016a; Vrielynck *et al.*, 2016) e interactúan con las proteínas Spo11 para formar un complejo similar a Topo VI (Vrielynck *et al.* 2016; Robert *et al.*, 2016a). Este complejo corresponde al núcleo catalítico del recombinosoma temprano.

1.5 El contexto espacial de las RDCs y su distribución.

El evento que da inicio a la recombinación meiótica es la formación de RDCs. Las RDCs son esenciales para que el proceso de meiosis sea exitoso; no obstante, la formación de muchas rupturas podría ser deletéreo para el mantenimiento de los cromosomas ya que podría llevar a una fragmentación cromosomal si no se reparan. La célula puede controlar la temporalidad y la cantidad de RDCs que se producen y así minimizar los efectos deletéreos (Keeney *et al.*, 2014).

Las RDCs no se forman de manera aleatoria a lo largo de los cromosomas, sino que existen regiones o “hot spots” de los mismos donde las RDCs ocurren con mayor frecuencia (Watson *et al.*, 2008). Las regiones de pocas kilobases donde

preferentemente se producen las RDCs, presentan una organización espacial particular de la cromatina. Algunos datos sugieren que es importante que el DNA esté accesible para que se puedan formar las RDCs, ya que en *S. cerevisiae* y el ratón se observó que los “hot spots” coinciden con regiones promotoras, asociadas a una baja densidad de nucleosomas y enriquecidas en la histona 3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3), una marca de cromatina activa (Borde y de Massy, 2013; Pan *et al.*, 2011; Smagulova *et al.*, 2011). En *A. thaliana* los “hot spots” se localizaron con mayor frecuencia en los promotores, terminadores e intrones de genes, que contienen secuencias ricas en AT (Adenina/Timina) y en donde la densidad de nucleosomas es menor; en algunas regiones de los cromosomas también se observó una correlación entre la presencia de RDCs y la presencia de histonas H3K4me3 (Choi *et al.*, 2018). En maíz se observó también que los “hot spots” coinciden con regiones con pocos nucleosomas, no obstante, la co-localización de estos sitios con la histona H3K4me3 fue baja. Adicionalmente, se observó que muchas de las RDCs se localizan en secuencias repetidas de DNA como retrotransposones y una porción menor (un cuarto) se localizan cerca de genes. Estas últimas son las que contribuyen a la formación de COs (He *et al.*, 2017).

El contexto espacial de la formación de RDCs está asociado a la organización estructural de los cromosomas; los pares de cromosomas homólogos forman bucles, los cuales se anclan en serie a un eje estructural llamado elemento axial, que a su vez forma parte de una estructura mayor, que es el complejo sinaptonémico (CS). El CS está compuesto por dos elementos laterales (elementos axiales integrados en el CS), que corren a lo largo de los cromosomas homólogos y que están unidos por los filamentos transversales (Figura 5). Los elementos axiales están compuestos de diversas proteínas, algunas de las cuales son requeridas para la formación de niveles normales de RDCs (Lam y Keeney, 2015; Lambing *et al.* 2017). Esto sugiere que los elementos axiales podrían estar involucrados en la formación de RDCs. Recientemente se reportó la participación de la proteína P31^{comet}, un componente del CS, en la producción de RDCs (Ji *et al.*, 2016). En el estudio realizado por Ji *et al.* (2016) se observó también que la mutación del gen *p31^{comet}* enmascara el fenotipo de fragmentación asociado a la mutación de *Rad51* en arroz; esto indica que *p31^{comet}* está involucrado en la formación de la RDCs.

Esta evidencia apoya la idea de que los elementos del CS podrían participar en etapas tempranas de la recombinación meiótica, como lo es la formación de RDCs, e interactuar con los componentes del recombinosoma.

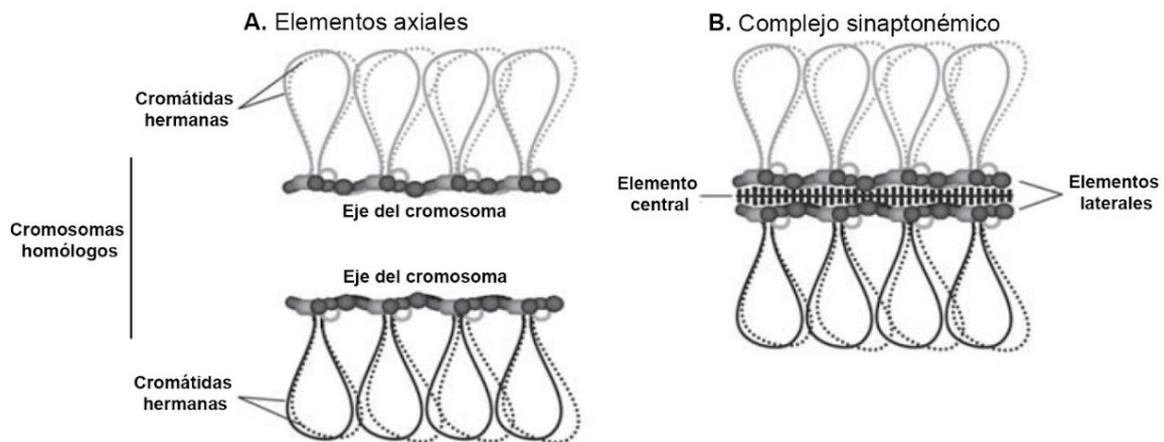


Figura 5. Estructura de los cromosomas durante la profase de meiosis I. A. Durante la meiosis cada cromosoma, compuesto por dos cromátidas hermanas, se encuentra organizado en una serie de bucles los cuales permanecen unidos a una estructura proteínica conocida como elemento axial para formar el eje del cromosoma. B. Los cromosomas homólogos comienzan a asociarse mediante la formación del CS durante la fase de cigoteno, los elementos axiales ahora se convierten en los elementos laterales y se unen mediante los filamentos transversales, que juntos forman el elemento central (Figura modificada de Lam y Keeney, 2015).

2. ANTECEDENTES

La formación de RDCs programadas durante la recombinación meiótica es necesaria para la generación de COs que permiten una interacción física de los cromosomas homólogos y su segregación correcta en la meiosis I, sin embargo, también pueden representar un daño al DNA si no se reparan. Las células tienen un nivel de regulación de la producción de RDCs muy fino a nivel espacial y temporal de la producción de RDCs (Keeney, 2007). Aunque no se encontraron secuencias de DNA consenso asociadas a los sitios de formación de RDCs, se realizaron unos mapas de recombinación en los que se observó que éstas no están distribuidas al azar en el genoma, sino que hay regiones donde se producen con mayor frecuencia (He *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2011; Smagulova *et al.*, 2011). La especificidad con la que se introducen las RDCs sigue sin ser explicada a detalle.

Una pieza clave en la formación de las RDCs es Spo11 ya que es la responsable de catalizar las RDCs; la expresión de los genes *spo11* está delimitada a las células meióticas en algunos hongos y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Dernburg *et al.*, 1998; Lin y Smith, 1994), no obstante, en otros organismos como en ratón y en plantas se encontraron mRNA en células somáticas (Hartung y Puchta, 2000; Klein *et al.*, 2002). A nivel global se observó que existe un cambio en el patrón de expresión génica en las células meióticas y que muchos genes meióticos incrementan su expresión respecto a las células somáticas (Cheng *et al.*, 2018; Chu *et al.*, 1998; Nelms, 2018). Además de Spo11, se reconocieron proteínas esenciales para la formación de RDCs, dentro de las cuales se encuentran las proteínas MTOPVIB/TOPOVIBL y las proteínas PRD1/MEI1, que forman parte del recombinosoma temprano (Vrielynck *et al.* 2016; Robert *et al.* 2016a; De Muyt *et al.* 2009). La regulación compleja del recombinosoma temprano y su especificidad podrían suceder a diferentes niveles, incluyendo el transcripcional, pues se identificaron una variedad de transcritos de *SPO11-1* y *SPO11-2* en plantas que podrían estar participando en ese tipo de regulación (Sprink y Hartung, 2014). Por otro lado, también es importante estudiar las proteínas y sus interacciones entre ellas para tratar de elucidar su función en la especificidad del complejo. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de la expresión de algunos genes candidatos a formar parte del recombinosoma temprano en maíz.

3. HIPÓTESIS

Se propone que existe una regulación transcripcional diferencial entre los órganos vegetativos y reproductivos de los genes que codifican para proteínas del recombinosoma temprano en maíz (*Zea mays*).

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* y *PRD1*, que codifican para proteínas del recombinosoma temprano en maíz.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un análisis bioinformático de las secuencias de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *PRD1*, *MTOPVIB1* y *MTOPVIB2* en maíz, y de las secuencias de aminoácidos codificadas en comparación a proteínas ortólogas. Utilizar estos datos para anotar las secuencias de los genes de maíz.
2. Evaluar la abundancia de transcrito de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *PRD1*, *MTOPVIB1* y *MTOPVIB2*, así como también de los dos transcritos conocidos de *SPO11-1* (*A* y *B*), en dos órganos vegetativos y en los órganos reproductivos de plantas de maíz de la línea B73.

5. MÉTODOS

5.1 Anotación y análisis de los diferentes transcritos para los genes contenidos en distintas bases de datos.

Se analizó la información contenida en distintas bases de datos para los genes *SPO11-1* (Zm00001d013262, GRMZM2G129913, LOC100279325), *SPO11-2* (Zm00001d049550, GRMZM5G890820, LOC100216726), *SPO11-3/RHL2* (Zm00001d028705, GRMZM2G052581, LOC100273699), *MTOPVIB1* (Zm00001d014728, GRMZM2G439198, LOC103626426), *MTOPVIB2* (Zm00001d036446+Zm00001d036447, AC200287.4_FG006) y *PRD1* (Zm00001d046970, GRMZM2G308884, LOC103638879). Los nombres de los genes se tomaron respectivamente de las bases de datos Gramene (Zm00001d...) (http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/) (Tello-Ruiz *et al.*, 2016), MaizeGDB (GRMZM...) (http://www.maizegdb.org/gene_center/gene/) (Andorf *et al.*, 2016) y NCBI (LOC10...) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para realizar la anotación de los genes, se descargó la secuencia genómica de cada gen más 2 kb río arriba y 2 kb río abajo de los marcos de lectura abierta (ORF, "Open Reading Frame" en inglés) contenidos en la base de datos Gramene (http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/); posteriormente se delimitaron los exones, intrones y secuencias no traducidas (UTRs) de los transcritos predichos en las diferentes bases de datos (MaizeGDB y NCBI).

La selección del transcrito canónico se realizó con base en la similitud de las proteínas predichas para los diferentes transcritos respecto a las proteínas ortólogas de las que se tiene información reportada y de proteínas ortólogas de especies filogenéticamente relacionadas a maíz como el arroz (*O. sativa*) y sorgo (*Sorghum bicolor*: *S. bicolor*); la descripción realizada de los transcritos resultantes del empalme alternativo contenidos en las diferentes bases de datos se realizó en relación al transcrito canónico.

5.2 Identificación de proteínas ortólogas a AtMTOPVIB en maíz.

La secuencia primaria de la proteína MTOPVIB de *A. thaliana* (AtMTOPVIB, AT3G13170.1) se utilizó como molde para realizar un alineamiento PSI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=b>

[lastp&RUN_PSIBLAST=on](#)) contra el genoma de maíz; el resultado del alineamiento mostró dos proteínas hipotéticas en maíz que presentan similitud con la proteína de *A. thaliana*. La proteína que presentó un porcentaje de identidad de 36% y un E-value de $1e-79$ respecto a la proteína de *A. thaliana* (Figura 6), se nombró MTOPVIB1, mientras que la proteína con un porcentaje de identidad de 35% y un E-value de $2e-16$ (Figura 6) se nombró MTOPVIB2. Los números de acceso de GenBank AFW69414.1 y AFW75826.1 corresponden a los números de acceso en la base de datos MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>) GRMZM2G439198/ZEAMMB73_480886 para MTOPVIB1 y AC200287.4_FG006/ZEAMMB73_988158 para MTOPVIB2. De las dos secuencias identificadas, MTOPVIB1 posee una mayor similitud con la proteína de *A. thaliana*.

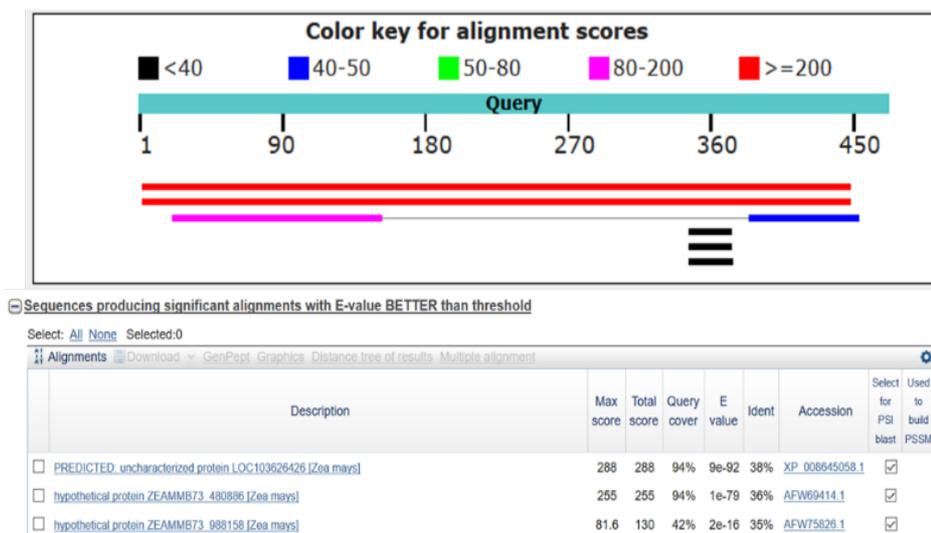


Figura 6. Resultados del PSI-BLAST para proteínas MTOPVIB de maíz. La búsqueda de las proteínas se realizó utilizando como secuencia templado a la proteína AtMTOPVIB; en el resultado se muestran dos secuencias de proteínas con sus respectivos números de acceso de GenBank.

5.2.1 Alineamiento de las secuencias de proteínas.

MTOPVIB1 y MTOPVIB2

Se realizó un alineamiento múltiple a nivel de secuencia de aminoácidos de las proteínas MTOPVIB de plantas, para ellos se utilizó el algoritmo estándar T-COFFEE (<http://www.tcoffee.org/>). Se utilizaron las secuencias proteínicas de las

siguientes especies de plantas: *A. thaliana*, *Boechera stricta*, *Citrus clementina* (*C. clementina*), *Phaseolus vulgaris*, *Vitis vinifera*, *Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon*, *O. sativa*, *S. bicolor* y *Z. mays*. Para maíz se utilizaron las secuencias de las proteínas identificadas en este trabajo. La secuencia de *O. sativa* utilizada se reanotó por Robert *et al.* (2016a). Para obtener las secuencias de proteínas MTOPVIB en las plantas restantes se realizó un alineamiento BLAST en la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) utilizando como molde a la proteína de *AtMTOPVIB* para buscar a los ortólogos en las especies vegetales analizadas.

También se realizó un alineamiento de las proteínas Topo VIB de las arqueas *S. shibatae*, *Methanosarcina mazei* y *Methanobrevibacter arboriphilus*, y proteínas MTOPVIB de las plantas *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. bicolor* y *Z. mays*. El alineamiento se realizó con el algoritmo estándar de T-COFFEE.

PRD1

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo Clustal Omega incluido en el servidor EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), con los parámetros establecidos. Las secuencias proteínicas de *A. thaliana*, *O. sativa*, *H. sapiens* y *M. musculus* fueron obtenidas de la publicación de De Muyt *et al.* (2007), los números de accesos son ABQ12642.1, CAE02100, CAI17882 y XP_487041, respectivamente. La secuencia de las proteínas ortólogas de *P. patens* y *C. clementina* fueron obtenidas de la base de datos Phytozome, mediante un BLAST utilizando como molde la secuencia de la proteína PRD1 de *A. thaliana*. La secuencia de la proteína PRD1 de *Xenopus tropicalis* fue obtenida de la base de datos NCBI mediante un BLAST utilizando como molde a la proteína MEI1 de humano.

5.2.2 Modelo tridimensional de la proteína MTOPVIB1.

La secuencia de aminoácidos de la proteína MTOPVIB1 fue modelada en el servidor PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/help.cgi?id=help/faq>), utilizando como templado la estructura cristalizada de la proteína TOPVI de *S. shibatae* (código de acceso en PDB: 2Zbk). Las imágenes fueron generadas en la

versión educativa del programa PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

5.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizaron los órganos vegetativos y reproductivos de la línea de maíz B73. Se utilizaron las segundas hojas (H), de plantas de 15 días de desarrollo; raíces (R), de plantas de 3 días; inflorescencias femeninas (IF), de aproximadamente 1.5 cm a 2.5 cm e inflorescencias masculinas (IM), en etapas tempranas del desarrollo de plantas que crecieron durante los meses de marzo a junio del 2016, en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos ubicado en Cuernavaca, Morelos con coordenadas 18°58'53" Norte, 99°13'58.4" Oeste, y a una altitud de 1880 msnm (Figura 7).

Se utilizaron aproximadamente 100 mg de peso fresco de cada órgano, que se trituraron con nitrógeno líquido, se agregaron 500 µL de Buffer de extracción GS (Isotiocianato de guanidina 5 M; Lauril sarcosinato de sodio, 0.5% y Citrato de sodio 50 mM pH 7.0) para raíz, inflorescencias femenina y masculina, o Buffer Z6 (Clorhidrato de guanidina, 8 M; MES, 20 mM y EDTA 20 mM) para hoja. Posteriormente se realizó una extracción con fenol-cloroformo y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y un volumen de isopropanol. Finalmente se realizaron tres lavados, uno con etanol al 70% seguido de un lavado con acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y un lavado más con etanol al 70%.

La concentración de RNA se cuantificó en un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y se evaluó la pureza del RNA mediante los ratios de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm. Para evaluar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa al 1.2% (peso/volumen).

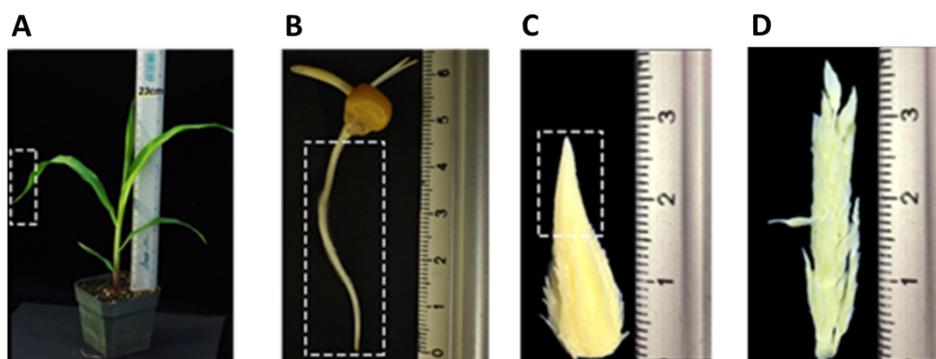


Figura 7. Material biológico utilizado de la línea B73 de maíz. **A)** Se utilizaron las segundas hojas (H), de plantas de 15 días de desarrollo; **B)** raíces (R), de 3 días de germinación; **C)** inflorescencias femeninas (IF), de aproximadamente 1.5 cm a 2.5 cm y **D)** inflorescencias masculinas (IM) en etapas tempranas de desarrollo para realizar la extracción de RNA y elaboración de cDNA. Las partes de los órganos utilizados se muestran dentro de los rectángulos blancos.

5.4 Generación de DNA complementario (cDNA)

Para la generación de cDNA se utilizó 1 µg de RNA total de órganos vegetativos (hoja y raíz) y órganos reproductivos (inflorescencias femenina y masculina) de la línea de maíz B73. Para eliminar el DNA genómico de las muestras se realizó un tratamiento con 1 U de DNasa I (Invitrogen, No. Cat. 18068-015) o DNasa I (ThermoScientific, No. Cat. EN021) en un volumen total de 10 µL; la enzima se inactivó incubando 10 min a 65°C. Una vez realizado este paso, se utilizó 1 µg de RNA tratado con DNasa para la síntesis de cDNA mediante una reacción con la enzima Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche, No. Cat. 03531317001) en un volumen final de 20 µL siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos de DNA.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Referencia
RT-PCR		
AR452 Zm CYA-RTF	GCTGGTGAGGAGGAGAAACA	Nan <i>et al.</i> , 2011
AR453 Zm CYA-RTR	CAGCAATCATGCCAGGTAGA	Nan <i>et al.</i> , 2011
AR327 Zm tub6-475f	AGTATGCCACTCCCTTGGTG	Skibbe <i>et al.</i> , 2012
AR328 Zm tub6-979r	GGCACACATCATGTTCTTGG	Skibbe <i>et al.</i> , 2012
AR101 ZmSPO11-1-RT3'F	CAAACCTTGTTGCGTGTCCC	
AR102 ZmSPO11-1-RT3'R	AAGGAAATGGAATTTGCGG	
AR103 ZmSPO11-1-RT5'F	CTCCTCCGCAGGATCAAAGGGCTT	
AR104 ZmSPO11-1-RT5'R	TGGCACGGTCAACAACCTGCTACTT	
AR241 ZmSPO11-1B qRTF	TCACCCAAATGTGTGACATCCG	
AR242 ZmSPO11-1B qRTR	CGAAGATGGAGGGGTACATGTA	
AR243 ZmSPO11-2 qRTF	GGCTGAAGACCGCCTGTATAATCA	
AR244 ZmSPO11-2 qRTR	GCCCATTGATATGCTTCCGTAT	
AR245 ZmSPO11-3 qRTF	CTGCATTCATGCGACTCGCCGA	

AR246	ZmSPO11-3 qRTR	GCGTTCGTCAGATTGGCACTGT
AR446	ZmMTOPIVIB1-RTF1	TTGCTCCACTCCCTGGTGTACTG
AR447	ZmMTOPIVIB1-RTR1	AGTGTGCCATCCCATCTCTCTAC
AR450	ZmMTOPIVIB2-RTF1	TGGGCCGTTTTTACTGGGTC
AR451	ZmMTOPIVIB2-RTR1	TGTGCCATCCCATTCTCTACTG
AR512	ZmMTOPIVIB2-RTR2	TTTCTCTACTGGAGTCTCACGC
AR247	ZmPRD1 qRTF	TGGAACAATTTTACTGCAATGG
AR248	ZmPRD1 qRTR	TTCATATGGAAAGGTCCCACCA
AR234	ZmPRD1 ScreenRev CF	TCAATCTCTTCAGTGAGCTCATGG
AR226	ZmPRD1C-R	AGGCGTAGGCGTAGGCTCACTAGTG

RT-qPCR

AR452	Zm CYA-RTF	GCTGGTGAGGAGGAGAAACA
AR453	Zm CYA-RTR	CAGCAATCATGCCAGGTAGA
AR101	ZmSPO11-1-RT3'F	CAAACCTTGTTGCGTGTCCC
AR136	ZmSPO11-1-STOP	CCAATCTTATAAATGCATGCCTTGTTTG
AR629	ZmSPO11-1B qRTF3	AGGATCAAAGGGCTTGTCG
AR630	ZmSPO11-1B qRTR3	ATGTGACGGTGAATTGGTCGG
AR243	ZmSPO11-2 qRTF	GGCTGAAGACCGCCTGTATAATCA
AR244	ZmSPO11-2 qRTR	GCCCATTGATATGCTTCCGTAT
AR245	ZmSPO11-3 qRTF	CTGCATTCATGCGACTCGCCGA
AR246	ZmSPO11-3 qRTR	GCGTTCGTCAGATTGGCACTGT
AR633	ZmMTOPIVIB1 qRTF3	CAAACAGGCAACACTGGTTCC
AR634	ZmMTOPIVIB1 qRTR3	TGCGTGGACGAGCAATTTGC

Amplificación CDS

AR135	ZmSPO11-1-ATG	TCAAATAAAAAACTAGCGCCATGGC
AR136	ZmSPO11-1-STOP	CCAATCTTATAAATGCATGCCTTGTTTG
AR137	ZmSPO11-2-ATG	CAGCGTCTCCAACCTCCATCGATG
AR138	ZmSPO11-1-STOP	ATCGTCAGATGTAATCGCCCTGCAC
AR505	Zm MTOPIVIB1-FLF2	CGGCTCAACGATCCATAGCTTTC
AR506	Zm MTOPIVIB1-FLR2	CTACGAGACGGTAGACGGGTGAA

pJET 1.2 Blunt

pJET1.2 Forward	CRACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Thermo Fisher Scientific
pJET1.2 Reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Thermo Fisher Scientific

5.5 PCR sobre DNA genómico de la línea de maíz B73

Con el objetivo de establecer las condiciones de amplificación para el análisis de expresión por RT-PCR, se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde DNA genómico (gDNA) de la línea de maíz B73. Todas las reacciones se realizaron con una mezcla que contiene a la enzima Taq Polimerasa (GoTaq® Green Master Mix, Promega, No. catálogo M7123) en un volumen final de 16 µL con las siguientes cantidades: 7.5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (dATP 400 µM, dGTP 400 µM, dCTP 400 µM, dTTP 400 µM y MgCl₂ 3 mM), 0.25 µL de una

dilución 10 μ M de cada oligonucleótido, 1 μ L de gDNA de una dilución 50 ng/ μ L, 0.5 μ L de DMSO al 100% y 6.5 μ L de agua ultrapura estéril. Para la reacción con los oligonucleótidos del gen *MTOPVIB2* se utilizó una concentración final de 3 mM de MgCl₂.

Las reacciones de PCR se realizaron con el siguiente programa: una etapa de desnaturalización por 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de alineamiento (T_m), 72°C por el tiempo de extensión específico para cada reacción; posteriormente se realizó una extensión final por 3 min a 72°C. Para cada par de oligonucleótidos se utilizaron distintas condiciones de temperatura de alineamiento, especificadas en la Tabla 2 y el tiempo de extensión se ajustó al tamaño de fragmento esperado. Los tamaños esperados para estas reacciones se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 2. Condiciones de Temperatura de alineamiento y tiempo de elongación utilizadas en ensayo de RT-PCR.

Transcrito	Temperatura de alineamiento (°C)	Tiempo de elongación (seg)
<i>CYANASA</i>	60	25
<i>βTUBULINA6</i>	60	30
<i>SPO11-1</i>	60	25
<i>SPO11-1B</i>	60	25
<i>SPO11-2</i>	54	25
<i>SPO11-3</i>	60	25
<i>MTOPVIB1</i>	58	25
<i>MTOPVIB2</i>	53	25
<i>PRD1</i>	52	30

5.6 RT-PCR punto final

Para los ensayos de RT-PCR en punto final se realizaron reacciones de PCR con diferentes números de ciclos de amplificación (30, 32, 35 y 37 ciclos), utilizando como molde 1 μ L de cDNA de los dos órganos vegetativos (hoja y raíz) y los dos órganos reproductivos (inflorescencia femenina y masculina). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para los genes de referencia *CYANASA* y *β TUBULINA6* (TUB6) y los genes de interés *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3/RHL2*, *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* y *PRD1* (Tabla 1). Las condiciones de las reacciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 94°C por 5min, seguida de ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de alineamiento (T_m) y 25 seg

o 30 seg a 72°C; finalmente un ciclo 3 min a 72°C. Las condiciones de temperatura de alineamiento y de tiempo de elongación usados para cada transcrito se indican en la Tabla 2.

Para establecer el tiempo de elongación se consideró el tamaño del fragmento esperado en cDNA. En la Figura 8 se muestra un esquema de la organización de los genes de interés antes mencionados en el genoma de maíz. Estos esquemas corresponden a los transcritos canónicos obtenidos de diferentes bases de datos. Se muestra también la ubicación espacial de los oligonucleótidos utilizados en el experimento. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos para *SPO11-1*, uno ubicado en la región 3' y otro en la región 5', específico para el transcrito *SPO11-1B*.

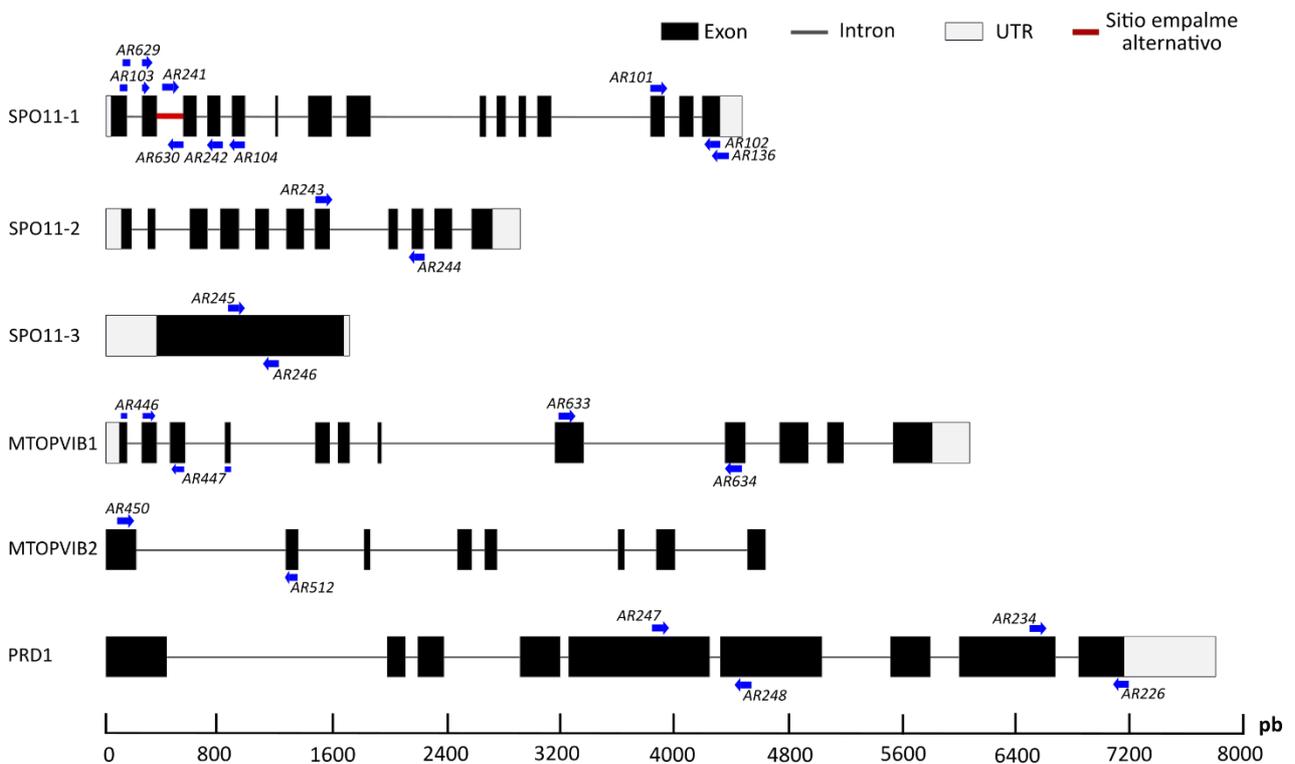


Figura 8. Organización de los genes de maíz *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* y *PRD1*. Se muestra la posición de exones, intrones y secuencias UTR de los transcritos canónicos, los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de RT-PCR y RT-qPCR están indicados con flechas azules.

5.7 RT-qPCR de los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-1B*, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1*.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los transcritos de los genes *SPO11-*

1, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1*. Adicionalmente se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar el transcrito *SPO11-1B*. El gen *CYANASA* se utilizó como gen de referencia, ya que anteriormente se describió como un gen de expresión estable en anteras de maíz (Ma *et al.*, 2007), y para detectar su transcrito se utilizaron los oligonucleótidos AR452 y AR453 (Tabla 1). Los oligonucleótidos están enlistados en la Tabla 1 y su ubicación se muestra en la Figura 8. Todas las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler Nano System (Roche); para detectar los productos de amplificación se utilizó el fluoróforo SYBR Green. Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 μ L con 5 μ L de Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (#K0242 Thermo Scientific), ambos oligonucleótidos a una concentración final de 250 nM, 1 μ L de cDNA templado (50 ng/ μ L) y agua libre de nucleasas; las reacciones se realizaron a una concentración final de 2 mM de MgCl₂ a excepción de las reacciones para el transcrito *MTOPVIB1*, en las cuales se utilizó una concentración final de 3 mM de MgCl₂. Los volúmenes utilizados en las reacciones se señalan en la Tabla 3. El programa de amplificación se indica a continuación: 10 min a 95°C; 45 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C y 30 seg a 72°C; seguido de 10 seg a 95°C y por último una curva de disociación de 60°C a 90°C con incrementos de temperatura de 0.1°C por segundo. Las reacciones se realizaron por triplicado, utilizando tres réplicas biológicas por cada órgano; para el gen *SPO11-2* se utilizaron únicamente dos réplicas técnicas. Los valores obtenidos de Cq (número de ciclos a los cuáles la fluorescencia de la muestra pasa un umbral predeterminado) se utilizaron para cuantificar el porcentaje de abundancia relativa respecto al gen de referencia (*CYANASA*).

Para calcular la eficiencia de los diferentes pares de oligonucleótidos, se utilizaron cuatro diluciones seriales del cDNA sintetizado a partir de la inflorescencia masculina de la planta 1 (Figura 11.1, extracción 3). Para los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-2* y *SPO11-3* la dilución inicial fue de 5.5 ng/ μ L de cDNA, de la cual se realizaron tres diluciones subsecuentes de 1:2, 1:4 y 1:8, como control negativo se utilizó 1 μ L de agua libre de nucleasas. Para los transcritos *SPO11-1B* y *MTOPVIB1* se utilizó una dilución inicial de cDNA de 50 ng/ μ L y tres diluciones subsecuentes de 1:2, 1:4 y 1:8. La eficiencia de amplificación para los pares de oligonucleótidos (E) y el coeficiente de regresión (r^2) fueron calculados

automáticamente con la versión 1.0 del software LigthCycler Nano SW 1.1 (Roche) mediante un análisis de regresión lineal y la pendiente (PENDIENTE) utilizando la fórmula $E=10^{-1/PENDIENTE}$; los resultados se muestran en las Figuras 16 y 17.

Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas de abundancia de transcrito de cada gen entre los cuatro órganos analizados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 6 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Tabla 3. Componentes para las reacciones de RT-qPCR

Reactivos	Volumen	
	2 mM Mg	3 mM Mg
Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 2X	5.0 µL	5.0 µL
Oligonucleótido 1 (10 µM)	0.25 µL	0.15 µL
Oligonucleótido 2 (10 µM)	0.25 µL	0.25 µL
Agua libre de nucleasas	3.5 µL	2.4 µL
cDNA	1.0 µL	1.0 µL
MgCl ₂ (25 mM)	-	0.9 µL

5.8 Clonación de los fragmentos generados por empalme alternativo.

Se realizó una reacción de PCR utilizando los pares de oligonucleótidos AR103 + AR104 y AR243 + AR244 (Tabla 1), para amplificar sobre el cDNA los fragmentos provenientes de los transcritos alternativos de los genes *SPO11-1* y *SPO11-2*, respectivamente. La reacción se realizó con GoTaq® Green Master Mix Promega (No. catálogo M7123) en un volumen final de 30 µL con las siguientes cantidades: 15 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X, 0.5 µL de una dilución 10 µM de cada oligonucleótido, 1 µL de CDNA, 1 µL de DMSO al 100% y 12 µL de agua ultrapura estéril. El programa de la reacción fue el siguiente: 5 min a 94°C seguido de 37 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C y 25 seg a 72°C, por último, se realizó una etapa de elongación final de 3 min a 72°C; el producto de PCR fue almacenado a 4°C. Los productos de PCR fueron integrados en el plásmido pJET 1.2/blunt utilizando el producto CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoScientific No. Catálogo #K1232) con las instrucciones del fabricante. Para realizar la ligación se siguió el protocolo especificado e indicado en la Tabla 4.

Se utilizaron 2 μL del producto de ligación para transformar 50 μL de células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación. La mezcla de las células electrocompetentes y el producto de ligación se preparó en hielo y fue transferida a una cubeta de electroporación de 0.1 mm (Bio-rad 1652089) previamente enfriada. Posteriormente se aplicó un voltaje de 1.8 kV en un electroporador (MicroPulser Electroporator, Bio-rad 1652083). Inmediatamente después se agregaron 450 μL de medio líquido LB (Luria-Bertani), se recuperaron los 500 μL del medio LB con las células transformadas y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y posteriormente se incubó por 1 hr a 37 °C. Después de este tiempo se inocularon 100 μL de las células transformadas en una placa de LB sólido suplementado con el antibiótico carbenicilina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la placa fue incubada a 37°C por 14 hrs. Se seleccionaron colonias transformadas, resistentes a carbenicilina, para realizar reacciones de PCR e identificar colonias transformadas con el vector pJET1.2 portando los fragmentos provenientes de los transcritos alternativos. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 15 μL , utilizando 7.5 μL de GoTaq® Green Master Mix 2X, 0.25 μL de una dilución 10 μM de los oligonucleótidos pJET1.2 Forward y pJET1.2 Reverse, 0.5 μL de DMSO al 100% y 6.5 μL de agua ultrapura estéril, las colonias se tomaron con una punta para micropipeta y se adicionaron a cada tubo donde se realizó la reacción de PCR. Para evidenciar los productos de la amplificación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se seleccionaron colonias que mostraron un perfil positivo en la electroforesis del PCR para la integración del plásmido con las secuencias del transcrito canónico y del transcrito alternativo. Se realizó una extracción de plásmido de las colonias seleccionadas con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), los plásmidos se secuenciaron usando el oligonucleótido pJET1.2 Forward (Tabla 1).

Tabla 4. Protocolo de ligación en plásmido pJET1.2/blunt

Reactivos	Volumen a 10 μL
Amortiguador de la reacción 2X	5.0 μL
Producto de PCR no purificado	2.0 μL
Enzima (DNA Blunting)	0.5 μL
Agua libre de nucleasas	1.5 μL
La reacción de mezció y se incubó a 70°C por 5 min	
Plásmido pJET1.2/blunt (50 ng/ μL)	0.5 μL
T4 ADN ligasa (5 U/ μL)	0.5 μL

6. RESULTADOS

6.1 Análisis bioinformáticos de los genes *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* y *PRD1*.

6.1.1 Las proteínas *MTOPVIB* de maíz presentan motivos conservados.

Las proteínas Topo VIB de arqueas presentan tres dominios principales: el dominio GHLK, el dominio H2T2 (“Helix-2Turn-Helix”) y el dominio transductor. En algunas especies de arquea s se reconoció (Vrielynck *et al.*, 2016). El dominio transductor promueve la interacción entre la subunidad B y la subunidad A de Topo VI; dentro del dominio se identificó el motivo dWxxY y a los aminoácidos involucrados en la interacción de ambas subunidades (Figura A1) (Vrielynck *et al.*, 2016).

En las proteínas *MTOPVIB* de plantas también se identificaron dominios con homología estructural a dominios encontrados en la subunidad Topo VIB de arqueas. El dominio GHLK, el dominio pequeño (SmD), que corresponde al dominio H2TH de arqueas, el dominio transductor y el dominio CTD. Los motivos b1-b4 son característicos de las proteínas *MTOPVIB* de plantas y se encuentran conservados en muchas especies vegetales (Figura 9). Los motivos b1 y b2 se encuentran en el dominio GHLK y tienen similitud con los motivos B1 y B2 de Topo VIB; el motivo B3 de Topo VIB está ausente en las proteínas *MTOPVIB* (Figura A1). Los motivos b3 en el dominio SmD y b4 en el dominio transductor son únicos de plantas (Figura A1 en anexos y Figura 9).

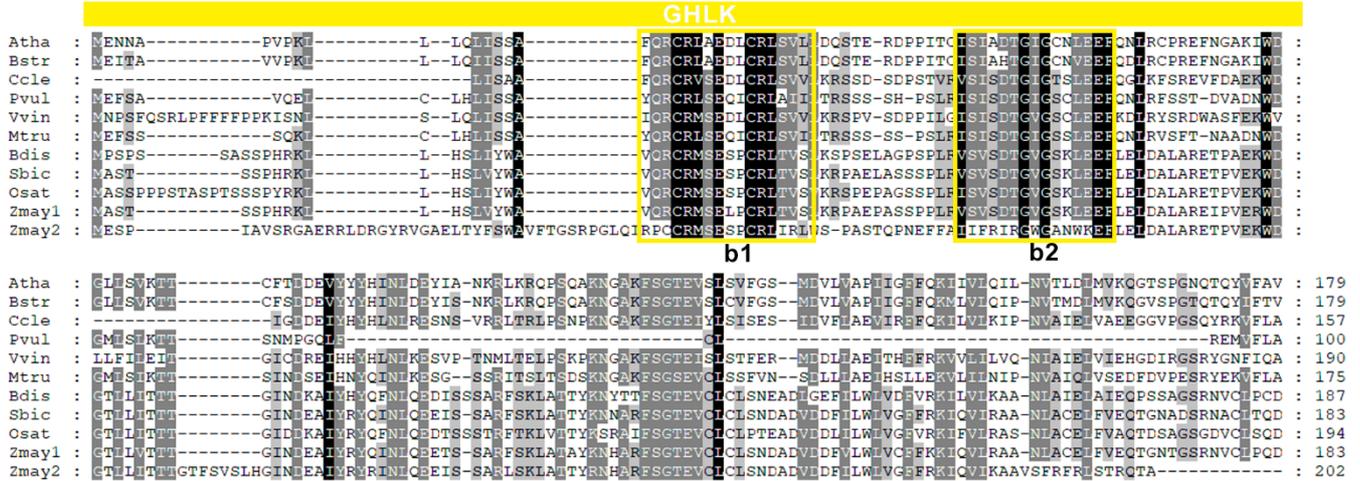
En maíz se identificaron dos proteínas ortólogas a proteínas de la familia *MTOPVIB*/*TOPOVIBL* con diferentes longitudes, 475 aminoácidos (aa) y 331 aa para *MTOPVIB1* y *MTOPVIB2*, respectivamente. *MTOPVIB1* (AFW69414.1) presenta un mayor porcentaje de identidad (36%) con la proteína *MTOPVIB* de *A. thaliana* en un 94% de la secuencia primaria, mientras que *MTOPVIB2* (AFW75826.1) tiene un porcentaje de identidad del 35 % pero en el 42% de la secuencia (Figura 6). Estas proteínas presentan porcentajes de identidad alta con proteínas *MTOPVIB* de plantas (Figura A1). A partir de análisis de la secuencia de las proteínas *MTOPVIB* de maíz, se identificaron los motivos b1 a b4 en la proteína

MTOPVIB1 con un alto grado de similitud (Figura 9). Por otro lado, en la proteína MTOPVIB2 los motivos b1 y b2 contiene pocos aminoácidos conservados, el motivo b3 y el dominio SmD están ausentes y, el motivo b4 presenta mas aminoácidos conservados.

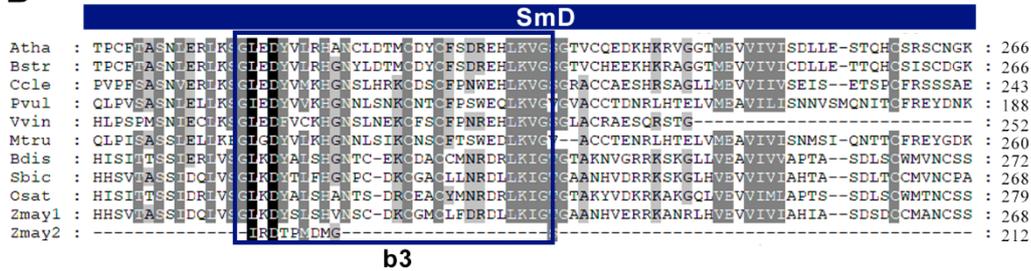
Dentro del dominio transductor se encuentran los motivos dWxxY y b4; el primero contiene un residuo de triptófano (W) estrictamente conservado, este motivo es común para las proteínas MTOPVIB/TOPOVIBL y las proteínas Topo VIB (Vrielynck *et al.*, 2016). El motivo b4 de las proteínas MTOPVIB en plantas coincide con la región de la subunidad B de la topoisomerasa VI de *S. shibatae* que contiene los aminoácidos que promueven la formación del heterotetrámero (A₂B₂) (Vrielynck *et al.*, 2016; Robert *et al.*, 2016b). En *A. thaliana* se demostró que el dominio transductor está involucrado en la interacción con las proteínas SPO11-1 y SPO11-2. El motivo dWxxY está conservado en la proteína MTOPVIB1 y aunque la proteína MTOPVIB2 presenta el residuo de W el motivo está muy poco conservado (Figura A1). El motivo b4 se encuentra muy conservado en MTOPVIB1, mientras que en MTOPVIB2 está presente pero no completamente conservado ya que carece de los primeros aminoácidos YxPDLA y la glicina final (Figura 9). Debido a que la proteína MTOPVIB1 de maíz presenta el motivo b4 con aminoácidos conservados en el sitio de interacción entre las subunidades Topo VIA y Topo VIB de *S. shibatae*, se puede sugerir que esta proteína corresponde a un interactor potencial de las proteínas SPO11-1 y SPO11-2.

Estos resultados indican que la proteína MTOPVB2 corresponde a un ortólogo de las proteínas MTOPVIB/TOPOVIBL, sin embargo cuatro de los motivos característicos están poco conservados, y uno de los dominios está ausente.

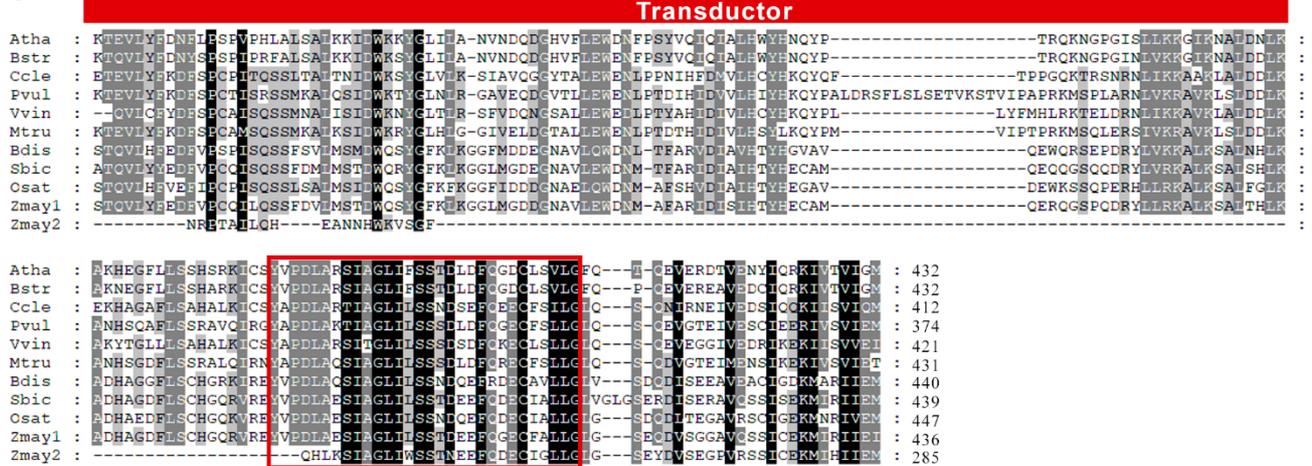
A



B



C



D

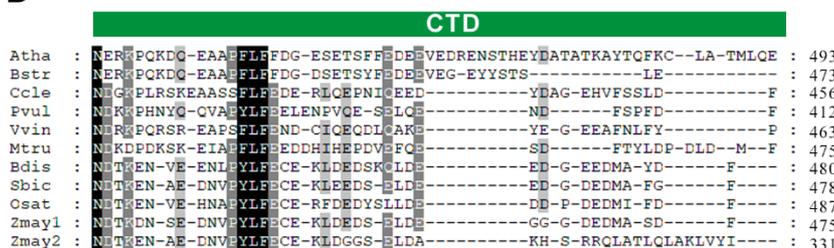


Figura 9. Alineamiento entre proteínas MTOPVIB en plantas. Se alinearon las secuencias de las proteínas MTOPVIB de las plantas Atha: *Arabidopsis thaliana*, Bstr: *Boechera stricta*, Ccle: *Citrus clementina*, Pvul: *Phaseolus vulgaris*, Vvin: *Vitis vinifera*, Mtru: *Medicago truncatula*, Bdis: *Brachypodium distachyon*, Osat: *Oryza sativa*, Sbic: *Sorghum bicolor* y Zmay: *Zea mays*; se incluyeron las secuencias de las dos proteínas hipotéticas de maíz etiquetadas como Zmay1 y

Zmay2 para MTOPVIB1 y MTOPVIB2 respectivamente. Las proteínas MTOPVIB en plantas presentan cuatro dominios, **A)** el dominio GHKL presenta los motivos b1 y b2; **B)** el dominio pequeño (SmD) presenta el motivo conservado b3; **C)** el dominio transductor presenta el motivo b4 y **D)** un dominio carboxilo terminal (CTD) que no presenta motivos conservados. El alineamiento se realizó con el algoritmo T-COFFEE en su configuración predeterminada y se visualizó en el programa GeneDoc. Los dominios se separaron para una mejor visualización, pero el alineamiento muestra las secuencias completas de las proteínas.

6.1.2 MTOPVIB1 es estructuralmente similar a Topo VIB de *S. shibatae*.

El modelo tridimensional de la proteína MTOPVIB1 se generó con base en la estructura de la subunidad Topo VIB de *S. shibatae* obtenida por cristalografía. Los resultados obtenidos en el servidor PHYRE2 mostraron que el 81% del total de aminoácidos se ajustaron al modelo con una confianza del 97.4%. Estos datos indican que la proteína MTOPVIB1 de maíz tiene una similitud alta con Topo VIB de *S. shibatae* a nivel de estructura terciaria, igual que las proteínas MTOPVIB/TOPOVIBL en *A. thaliana* y ratón que presentan homología estructural con Topo VIB (Vrielynck *et al.*, 2016; Robert *et al.*, 2016a). Por otro lado, el modelo obtenido de la secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética MTOPVIB2 tiene poca identidad con la estructura cristalográfica de Topo VIB, y no se puede generar un modelo de MTOPVIB2 utilizando la estructura Topo VIB (Figura A2, en anexos). Se sabe que el dominio transductor de Topo VIB de *S. shibatae* (Figura 10B) está involucrado en la interacción con la subunidad A (Graille *et al.*, 2008); el dominio transductor se compone de alfa hélices las cuales se mantienen también en las proteínas MTOPVIB/TOPOVIBL. Esta estructura secundaria está conservada en MTOPVIB1 de maíz y es donde se localiza el motivo b4 de la proteína (Figura A3, en anexos). La similitud estructural de la proteína de MTOPVIB1 con Topo VIB y las proteínas ortólogas (MTOPVIB/TOPOVIB) sugiere que MTOPVIB1 podría cumplir las funciones meióticas en maíz.

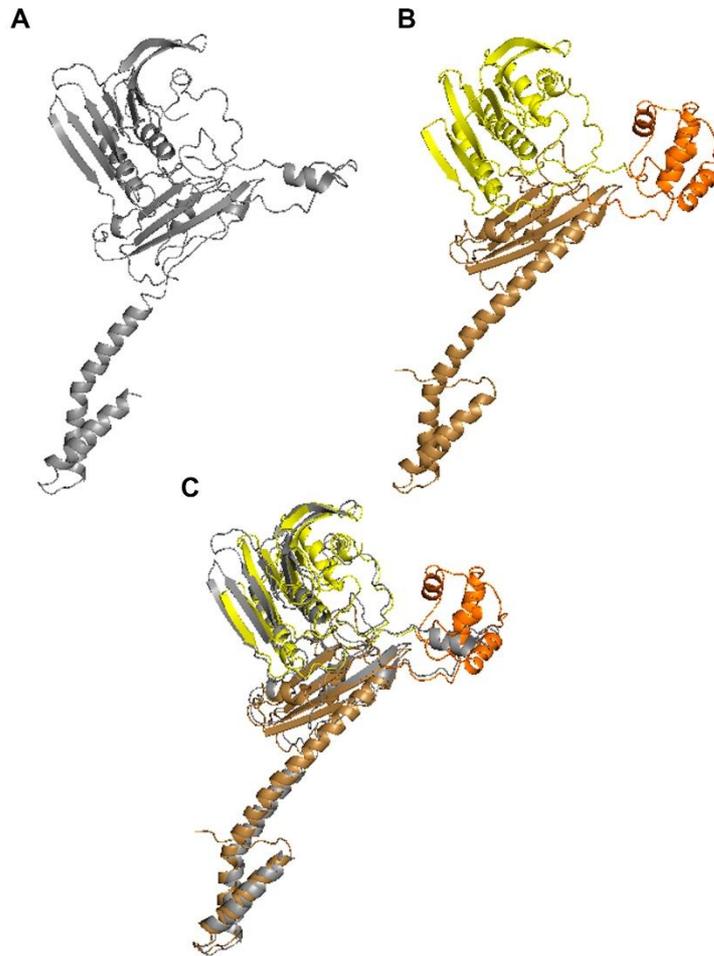


Figura 10. Modelo tridimensional de MTOPVIB1. **A)** La proteína MTOPVIB1 fue modelada en el servidor PHYRE2, utilizando como templado la subunidad B de una proteína DNA topoisomerasa de tipo II de *S. shibatae*. Los resultados arrojados por el servidor PHYRE2 muestran una confianza del modelo de 97.4 % y una cobertura del 81%. **B)** se muestran la subunidad TOPVIB de *S. shibatae*, en la cual se muestra el dominio GHKL (amarillo), el dominio H2TH (naranja) y el dominio transductor (café). **C)** se muestra la superposición entre ambas proteínas.

6.1.3 PRD1 de maíz tiene similitud con las proteínas ortólogas en plantas y animales.

La proteína PRD1 de maíz se identificó como un ortólogo de PRD1 de *A. thaliana* con un porcentaje de identidad del 37% (datos no mostrados). Se demostró que PRD1 de *A. thaliana* está involucrada en una etapa temprana de la recombinación meiótica, ya que las mutantes *PRD1* exhibieron defectos en la formación de RDCs (De Muyt *et al.*, 2007). En mamíferos, MEI1 corresponde al ortólogo de PRD1 y se demostró que *Mei1* está involucrado en el apareamiento y la sinapsis de los cromosomas homólogos (Libby *et al.*, 2002; Libby *et al.*, 2003). Aunque no se identificaron dominios o motivos conservados en dichas proteínas, se reconocieron

regiones con varios aminoácidos conservados (Figura 11). Además, en *A. thaliana* se reportó la interacción entre PRD1 y las proteínas SPO11-1 y MTOPVIB, mediante un ensayo de doble híbrido en levadura (De Muyt *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2017). Todos estos resultados indican que PRD1 es probablemente un componente del recombinosoma temprano. En maíz no existen análisis genéticos que demuestren una asociación entre PRD1 y algún proceso meiótico, pero debido a la similitud que posee con PRD1 de *A. thaliana* se puede inferir que podría ser un miembro del recombinosoma temprano en maíz.

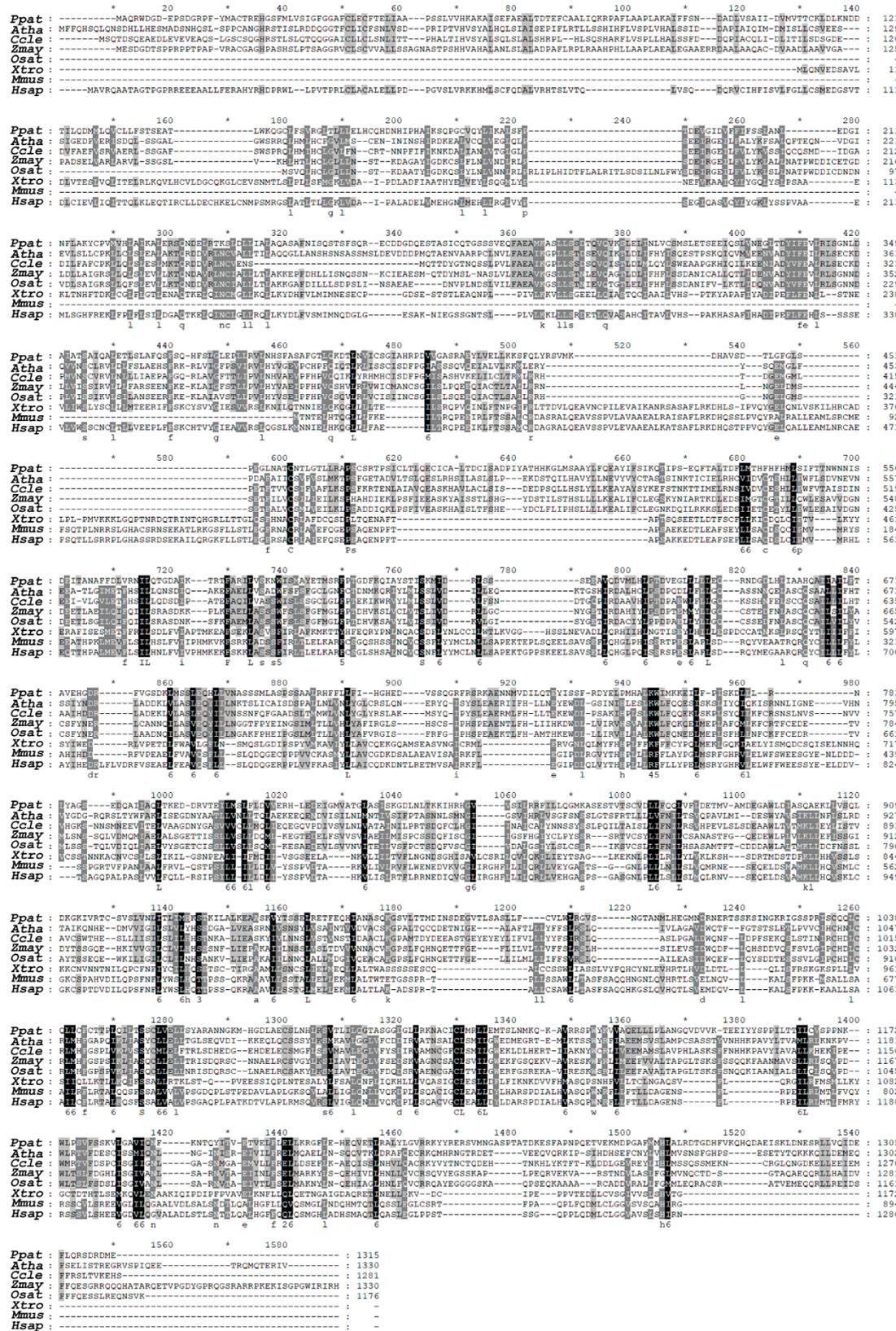


Figura 11. Alineamiento entre proteínas PRD1/MEI1. Se alinearon las secuencias de las proteínas PRD1 de las plantas. Ppat: *Physcomitrella patens*, Atha: *Arabidopsis thaliana*, Ccle: *Citrus clementina*, Zmay: *Zea mays* y Osat: *Oryza sativa* con las proteínas MEI1 de Xtro: *Xenopus tropicalis*, Mmus: *Mus musculus* y Hsap: *Homo sapiens*. El alineamiento se realizó con el algoritmo Clustal Omega y se visualizó en el programa GeneDoc.

6.2 Análisis de la expresión de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOBVIB1*, *MTOBVIB2* y *PRD1*.

6.2.1 La calidad del RNA permite realizar análisis posteriores

Con el objetivo de obtener RNA de buena calidad (buena pureza e integridad) que permita realizar los ensayos de RT-PCR y RT-qPCR se realizaron extracciones utilizando órganos vegetativos y reproductivos. Se realizaron tres extracciones independientes de RNA a partir de hojas (H), raíces (R), inflorescencias femeninas (IF) e inflorescencias masculinas (IM) de distintas plantas; en los resultados se muestran como extracción 1, extracción 2 y extracción 3 en la Tabla 5 y Figura 12. En la extracción 3 se utilizaron tres plantas diferentes (P1, P2, P3). Para determinar la pureza del RNA, se midieron las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm; para las cuales, los valores cercanos a 2.0 indican que las muestras de RNA son puras (Scientific, T. F). Por un lado, la relación de absorbancia 260/280 para las muestras de todas las extracciones fueron cercanas a 2.0, esto indica que no hay contaminación de proteínas en las muestras, las cuales absorben a 280 nm (Scientific, T. F). Por otro lado, los valores de la relación de absorbancia 260/230 obtenidos para la mayoría de las muestras fueron cercanos a 2.0, sin embargo, en algunas otras los valores fueron más bajos (Tabla 5). En la extracción 1 tanto las muestras de RNA de raíz como las de inflorescencias masculinas presentaron valores de 260/230 bajos (entre 1.3 y 1.6). Esto se repitió en las extracciones 2 y 3 de las muestras de raíz, así como también en la inflorescencia femenina de la planta 1 en la extracción 3. La relación de absorbancia 260/230 bajo se puede explicar por la presencia de contaminantes en las muestras, ya sea provenientes del método de extracción utilizado, como residuos de fenol, o contaminantes propios de las muestras como carbohidratos (Wilfinger *et al.*, 1997). Los valores bajos de la relación 260/230 en las muestras, puede ser consecuencia de un alto contenido de carbohidratos, por lo que se propone probar un método alternativo para la extracción de RNA o realizar lavados extras con acetato de sodio 3 M pH 5.2 y etanol al 70%, para optimizar la extracción de RNA de buena calidad en todas las muestras de los diferentes órganos y minimizar la variación entre éstas.

Para evaluar la integridad del RNA extraído de los cuatro órganos de la planta se realizó una electroforesis en un gel desnaturalizante con 1 µg de RNA de cada

muestra; en general en muestras del RNA total de organismos eucariontes en órganos no fotosintéticos se presentan dos bandas definidas que corresponden a RNA de las subunidades 28S y 18S del ribosoma (rRNA) que son los RNAs más abundantes. En un RNA íntegro la relación 28S/18S es cercana a 2 y un decremento de este valor puede ser indicativo de degradación. Actualmente se han desarrollado equipos que pueden medir esta relación con mayor precisión (Fleige y Pfaffl, 2006; Mueller y Schroeder, 2004), pero aún en una electroforesis se puede observar una mayor intensidad en la banda correspondiente a rRNA 28S respecto a la banda de la subunidad 18S y esto puede ser utilizado para evaluar la integridad del RNA, lo cual es importante para los estudios de la expresión génica (Fleige y Pfaffl, 2006; Pérez-Novo *et al.*, 2005). La Figura 12 demostró que en todas las muestras de RNA están presentes las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S: en la mayoría de los casos con la banda de 28S más intensa, lo que indica que el RNA en la muestra correspondiente no exhibe indicios de fuerte degradación. Además, los radios de absorbancia medidos para estas muestras de RNA indican que la mayoría de ellas son puras; por lo tanto, se decidió utilizar las muestras de RNA marcados con un asterisco (Figura 12) para la obtención de cDNA y RT-PCR punto final. Se observó una eficiencia baja en la extracción 3 de RNA para la muestra de raíz de la planta dos, por lo que se obtuvo una concentración muy baja (51.37 ng/ μ L) en un volumen pequeño (30 μ L). Por tal motivo se decidió utilizar solamente 500 ng del RNA para realizar la electroforesis; sin embargo, debido a que el valor del radio 260/230 (1.03) de esta muestra fue muy bajo y a que la cantidad de RNA no fue suficiente, no se sintetizó cDNA a partir de esta muestra de RNA sino que se utilizó otra raíz para la extracción de RNA (datos no mostrados) y los experimentos posteriores.

Tabla 5. Cuantificación y pureza del RNA.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Radio 260/280	Radio 260/230
<i>Extracción 1</i>			
H	899.67	1.98	1.73
R	234.98	1.80	1.56
IF_1	2206.90	1.98	1.99
IF_2	2803.68	1.94	2.07
IF_3	2636.64	1.92	1.98
IM_1	1076.09	1.89	1.47
IM_2	726.15	1.83	1.37
IM_3	666.63	1.83	1.43
<i>Extracción 2</i>			
H_1	344.23	1.91	2.35
H_2	678.23	2.06	2.19
R_1	213.63	1.97	1.37
R_2	192.53	1.95	1.17
IF_1	1331.23	1.98	2.23
IF_2	1005.35	1.97	1.99
IM_1	952.70	1.93	2.09
IM_2	786.13	1.94	2.07
<i>Extracción3</i>			
H_P1	251.75	1.85	2.38
H_P2	400.44	1.85	2.38
H_P3	375.68	1.84	2.28
R_P1	204.93	1.98	2.09
R_P2	51.37	1.86	1.03
R_P3	304.98	1.93	1.34
IF_P1	806.07	1.97	2.22
IF_P2	545.41	2.03	1.55
IF_P3	844.42	1.98	2.16
IM_P1	1121.61	1.99	2.17
IM_P2	1244.81	2.01	2.19
IM_P3	829.74	1.97	2.19

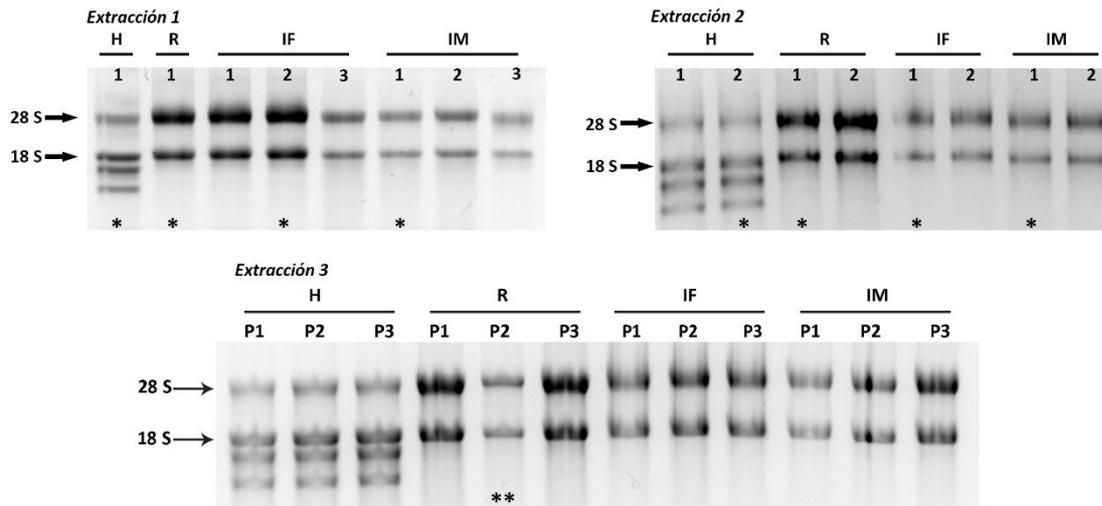


Figura 12. Electroforesis de las muestras de RNA total extraído de órganos de maíz. Se muestra el patrón de las muestras de RNA total en un gel desnaturante en gel de agarosa al 1.2% (peso/volumen). Se empleó 1 µg de RNA de cada muestra. En cada carril se observan las dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S; en las muestras de hojas se observan bandas adicionales correspondientes a rRNA provenientes de los cloroplastos.

* Muestras seleccionadas para la elaboración de cDNA.

** De la muestra R_P2 se utilizaron únicamente 500 ng para la electroforesis debido a la limitación en la cantidad de RNA.

6.2.2 Estandarización de las reacciones de amplificación para el análisis de expresión por RT-PCR.

La mayoría de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron para amplificar fragmentos de diferente tamaño al utilizar como molde gDNA o cDNA, con excepción de los oligonucleótidos para *MTOPVIB1*. Con el objetivo de establecer las condiciones de PCR para los ensayos de RT-PCR se amplificaron los fragmentos de los genes *CYANASA*, *βTUBULINA6*, *SPO11-1* (sobre éste se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar específicamente la isoforma *SPO11-1B*), *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB2* y *PRD1* (Tabla 6), utilizando como molde gDNA. Los fragmentos obtenidos (Figura 13), corresponden a los tamaños esperados al utilizar como molde gDNA para la mayoría de los genes, con excepción de *SPO11-2*, ya que en nuestros primeros análisis se observó una banda muy tenue (datos no mostrados). Para optimizar la eficiencia de amplificación de *SPO11-2*, se realizaron varias reacciones de PCR utilizando un gradiente de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos desde 48°C a 55°C. En la Figura 14 se observa una banda específica y del tamaño esperado para la mayoría de las temperaturas probadas, pero la intensidad de la banda solo

aumenta en la condición de 53.6°C; en base a estos resultados se utilizará una temperatura de alineamiento de 54°C para este fragmento en particular en los ensayos de RT-PCR.

Los resultados presentados en las figuras 13 y 14 indican que las condiciones probadas para generar fragmentos específicos de cada uno de los genes que se van a estudiar, incluyendo la temperatura de alineamiento probada en cada caso, son funcionales y por lo tanto serán utilizadas en los ensayos de RT-PCR

Tabla 6. Tamaño de fragmentos esperados en ensayo RT-PCR

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño esperado, cDNA	Tamaño esperado, gDNA
<i>CYANASA</i>	AR452, AR453	170 pb	170 pb
<i>βTUBULINA6</i>	AR327, AR328	501 pb	614 pb
<i>SPO11-1</i>	AR101, AR102	244 pb	722 pb
<i>SPO11-1B</i>	AR241, AR242	232 pb	304pb
<i>SPO11-2</i>	AR243, AR244	196 pb	693 pb
<i>SPO11-3</i>	AR245, AR246	235 bp	235 pb
<i>MTOPVIB1</i>	AR446, AR447	218 pb	NO
<i>MTOPVIB2</i>	AR450, AR512	213 pb	1274 pb
<i>PRD1*</i>	AR247, AR248	500 pb	587 pb
<i>PRD1**</i>	AR234, AR226	429 pb	602 pb

La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la Tabla 2 y la posición de ellos en la secuencia de ADN o RNA se muestra en la Figura 8.

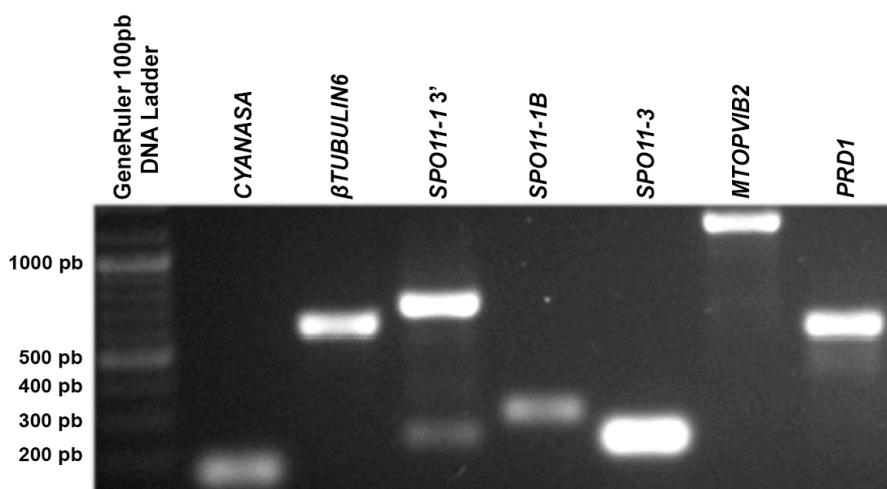


Figura 13. Amplificación por PCR de fragmentos únicos de diferentes genes a partir de gDNA de maíz. Se muestran las bandas correspondientes a los productos amplificados por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. *CYANASA*, 170 pb; *βTUBULINA6*, 614 pb; *SPO11-1*, 722 pb; *SPO11-1B*, 304 pb; *SPO11-3*, 235 pb; *MTOPVIB2*, 1274 pb y *PRD1*, 587 pb o 602 pb.

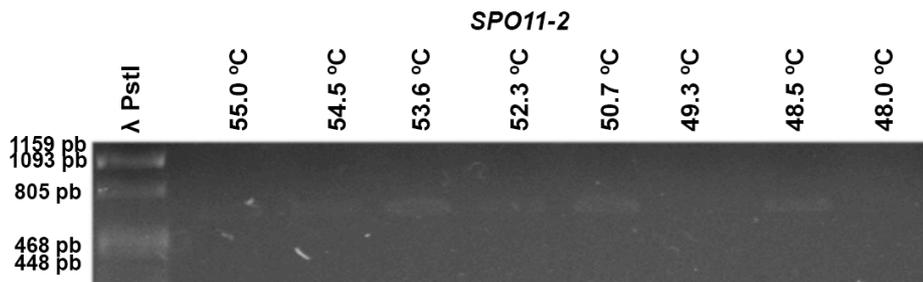


Figura 14. Amplificación por PCR sobre gDNA de *SPO11-2*. Reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para *SPO11-2*. Las reacciones se realizaron a diferentes temperaturas de alineamiento.

Los oligonucleótidos (AR446 y AR447) para *MTOPVIB1* se diseñaron en el solapamiento de dos exones en el mRNA maduro (Figura 8), por lo que, no se espera que se amplifique un fragmento a partir de gDNA. Para establecer las condiciones de amplificación del fragmento de *MTOPVIB1* se utilizó cDNA de hoja, raíz, inflorescencia femenina y masculina como molde, así como también dos controles, uno utilizando gDNA y otro control negativo sin DNA molde. En la Figura 15 se muestra que los oligonucleótidos para *MTOPVIB1* funcionan bajo las condiciones utilizadas (Tabla 2) ya que se amplificó un solo fragmento del tamaño esperado en cDNA de raíz, inflorescencia femenina y masculina, mientras que en ambos controles no hubo amplificación. Los resultados indican que los oligonucleótidos son funcionales en las condiciones utilizadas y serán las mismas para los ensayos de RT-PCR.

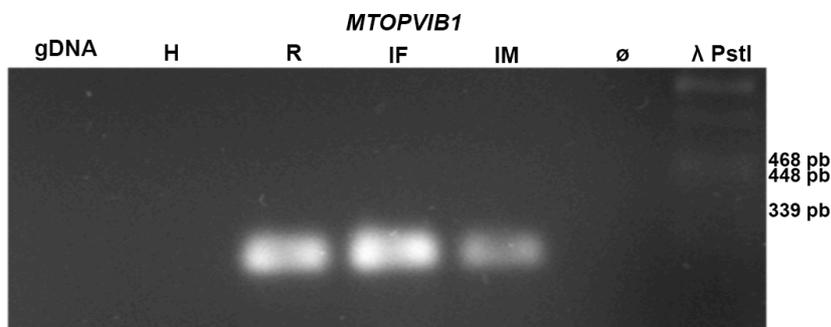


Figura 15. Fragmentos de *MTOPVIB1* obtenidos por PCR a partir de gDNA y cDNA. La reacción de PCR se hizo con oligonucleótidos específicos para este gen; se utilizó gDNA y cDNA de los distintos órganos (H, hoja; R, raíz; IF, inflorescencia femenina e IM, inflorescencia masculina) como molde, adicionalmente se incluyó un control negativo (ø, sin DNA molde).

6.2.3 *SPO11-1* produce al menos dos transcritos.

En las bases de datos MaizeGDB, Gramene y NCBI existen distintas predicciones de posibles transcritos para el gen *SPO11-1* (Figura A5, en anexos), dentro de las cuales se identificó un transcrito canónico nombrado como *SPO11-1A*, el cual contiene quince exones y catorce intrones y codifica para una proteína de 383 aa. En muchos de los transcritos predichos por las bases de datos se incluye al intrón dos como parte de la secuencia codificante (CDS, por sus siglas en inglés); uno de estos transcritos mantiene al intrón dos en la CDS y el resto de los exones permanecen iguales a los del transcrito A, este transcrito fue nombrado como *SPO11-1B*. La generación de estos dos transcritos podría ocurrir en la célula mediante un mecanismo de “splicing” alternativo del mRNA, como ha sido descrito anteriormente para *Spo11* de ratón y humano (Bellani *et al.*, 2010; Romanienko y Camerini-Otero, 1999); la retención del intrón dos en la isoforma B de maíz adiciona 43 aa, en fase con el resto de la proteína, río arriba de la tirosina catalítica de la proteína (Figura 4 y Figura 16A).

En un alineamiento (Figura 4, recuadro negro) se mostró que los aminoácidos introducidos en *SPO11-1B* por la retención del intrón dos en el transcrito, coinciden con una región extra, localizada también en *SPO11β* de ratón y humano aunque están poco conservados. Para determinar si los transcritos *SPO11-1A* y *SPO11-1B* se expresan en los órganos de maíz analizados en este trabajo (hoja, raíz, inflorescencias femenina y masculina), se realizó un análisis por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos AR103 y AR104, el primero está ubicado en los exones 1/2 y el segundo en el exón 5 (Figura 16A). Con este par de oligonucleótidos se detectaron ambos transcritos y se diferenciaron por el tamaño del producto de amplificación. En la Figura 16B se observa la presencia de ambos transcritos de *SPO11* en los cuatro órganos analizados. Debido a la posición de los oligonucleótidos usados, lo que se observa es la amplificación de fragmentos de la región 5', por lo que sería importante obtener la secuencia completa de ambos transcritos ya que como se observó en otras especies, es posible encontrar transcritos con más de un evento de “splicing” alternativo (Sprink y Hartung, 2014).

Para corroborar que las bandas observadas en el ensayo de RT-PCR (Figura 16B) provenían de los transcritos A y B, los fragmentos de PCR se clonaron y secuenciaron. Los resultados de la secuenciación confirmaron la retención del intrón 2 en el transcrito B.

Es importante mencionar que la organización de *SPO11-1* está conservada entre *A. thaliana*, maíz y otras especies de plantas; en las cuales se distinguieron quince exones y 14 intrones (Sprink y Hartung, 2014), aunque en *A. thaliana* se identificó un intrón extra en la región del 3' UTR (Hartung y Puchta, 2000). En *Arabidopsis* se encontraron dos transcritos *SPO11-1* con la retención del intrón dos; el primero se detectó en flores y tallos y la retención de dicho intrón fue el único evento de “splicing” alternativo. El segundo transcrito se detectó en semillas y presentó además la retención del intrón doce (Hartung y Puchta, 2000; Sprink y Hartung, 2014). No obstante, en *Arabidopsis* la retención del intrón dos provoca que se forme un PTC, lo que resultaría en proteínas hipotéticas más cortas. En contraste, en maíz la retención del intrón dos mantiene el marco de lectura de la proteína hasta el codón de paro del exon quince.

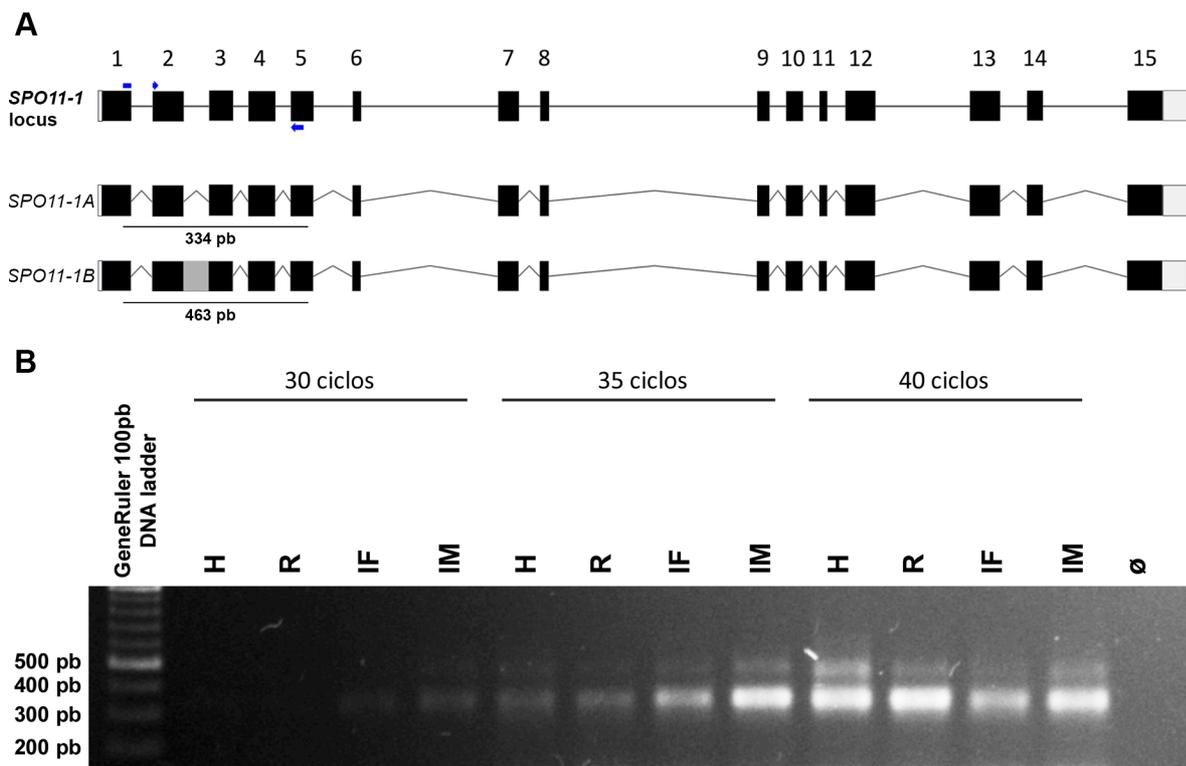


Figura 16. Análisis por RT-PCR de los transcritos de *SPO11-1* en cuatro diferentes tejidos de maíz de la línea B73. A) Esquema de la organización del locus *SPO11-1* y de los transcritos alternativos, denominados como A y B para el transcrito corto y el transcrito largo respectivamente. En el esquema se indica la localización de la tirosina (Y) catalítica en el exón cuatro. **B)** Fragmentos

correspondientes a los dos transcritos alternativos de *SPO11-1* amplificados por RT-PCR con los oligonucleótidos indicados (flechas azules). Las reacciones de PCR se realizaron con 30, 35 y 40 ciclos de amplificación con cDNA de cuatro órganos de la planta, hoja (H), raíz (R), inflorescencia femenina (IF) e inflorescencia masculina (IM); se incluyó un control negativo sin templado (⊖).

6.2.4 La expresión de los genes de referencia y los genes de interés varía entre réplicas biológicas.

Para evaluar la expresión de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* y *PRD1* en órganos somáticos y reproductivos de maíz, se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen, monitoreando la amplificación en diferentes números de ciclos. Se realizaron tres experimentos independientes (tres réplicas biológicas). El resultado de uno de ellos, representativo de las réplicas realizadas, se muestra en la Figura 17, los resultados de los otros dos experimentos se muestran en la sección de anexos (Figuras A11 y A12). Se probaron los transcritos *CYANASA* y *βTUBULINA6*, ya que en estudios previos se usaron como referencia (Ma *et al.*, 2007; Nan *et al.*, 2011; Skibbe *et al.*, 2012). *βTUBULINA6* mostró resultados poco consistentes entre las réplicas biológicas y entre los órganos utilizados, por lo que no se utilizó como un gen de referencia en este trabajo (Figuras 17, A11 y A12). Por otro lado, la expresión del gen *CYANASA* se mantiene constante en las diferentes réplicas biológicas de los cuatro órganos analizados; por ende, se puede utilizar este gen de referencia para ensayos de RT-PCR, así como también para ensayos de RT-qPCR, como se reportó previamente (Ma *et al.*, 2007; Nan *et al.*, 2011).

Los ensayos de RT-PCR permitieron observar la presencia de los transcritos en los órganos incluidos en este estudio y cambios en la expresión que se corroboraron por un método cuantitativo, aunque también se observaron variaciones entre réplicas biológicas para algunos de los genes analizados.

6.2.5 Los genes *SPO11* en maíz se expresan en los órganos vegetativos y reproductivos.

De los tres genes *SPO11* en maíz, *SPO11-3* parece tener un mayor nivel de expresión que *SPO11-1* y *SPO11-2*, ya que la banda amplificada a partir de su transcrito es visible claramente desde los 30 ciclos de amplificación en las tres réplicas biológicas y para todos los órganos. Los transcritos de *SPO11-1* y *SPO11-2* se observan con menor intensidad en los ciclos 30 y 32 (Figura 17, A11 y A12).

Esta observación es consistente en los diferentes experimentos realizados, sin embargo, puede ser que los oligonucleótidos para este transcrito son más eficientes.

Como se mencionó anteriormente, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos para amplificar los transcritos de *SPO11-1*. Con el primer par de oligonucleótidos se amplifican los transcritos *SPO11-1A* y *SPO11-1B* (etiquetado como *SPO11-1* en las figuras), porque se ubican en el extremo 3'. En cambio, con el segundo par se amplifica únicamente el transcrito *SPO11-1B*. En todas las réplicas biológicas se observó que la banda proveniente de ambos transcritos *SPO11-1* es más intensa que la banda amplificada del transcrito B. A partir de estos resultados podríamos sugerir que el transcrito A es mayormente expresado sin embargo, es necesario realizar un análisis de RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR), con el cual se pueda medir la cantidad de cada transcrito.

Al igual que los transcritos de *SPO11-1*, *SPO11-2* se expresa en los cuatro órganos analizados; este resultado es consistente en las réplicas biológicas (Figuras 17, A10 y A11). En todos los experimentos se observó una banda extra de aproximadamente 300 pb, que no corresponde al tamaño esperado para el transcrito canónico (196 pb, Tabla 6). Además, la posibilidad de que la banda provenga de una amplificación a partir de gDNA se descartó porque en este caso el tamaño del fragmento sería de 693 pb. Los oligonucleótidos utilizados están ubicados en los exones siete y nueve (Figura 8), separados por el intrón siete de 386 pb y el intrón ocho de 92 pb. La retención del intrón ocho en un transcrito alternativo puede explicar la aparición de la banda extra. No obstante, existe la posibilidad de que la banda de 300 pb sea una amplificación inespecífica; para descartar esta posibilidad se clonaron y secuenciaron los dos fragmentos obtenidos en el ensayo de RT-PCR, los resultados se muestran a continuación.

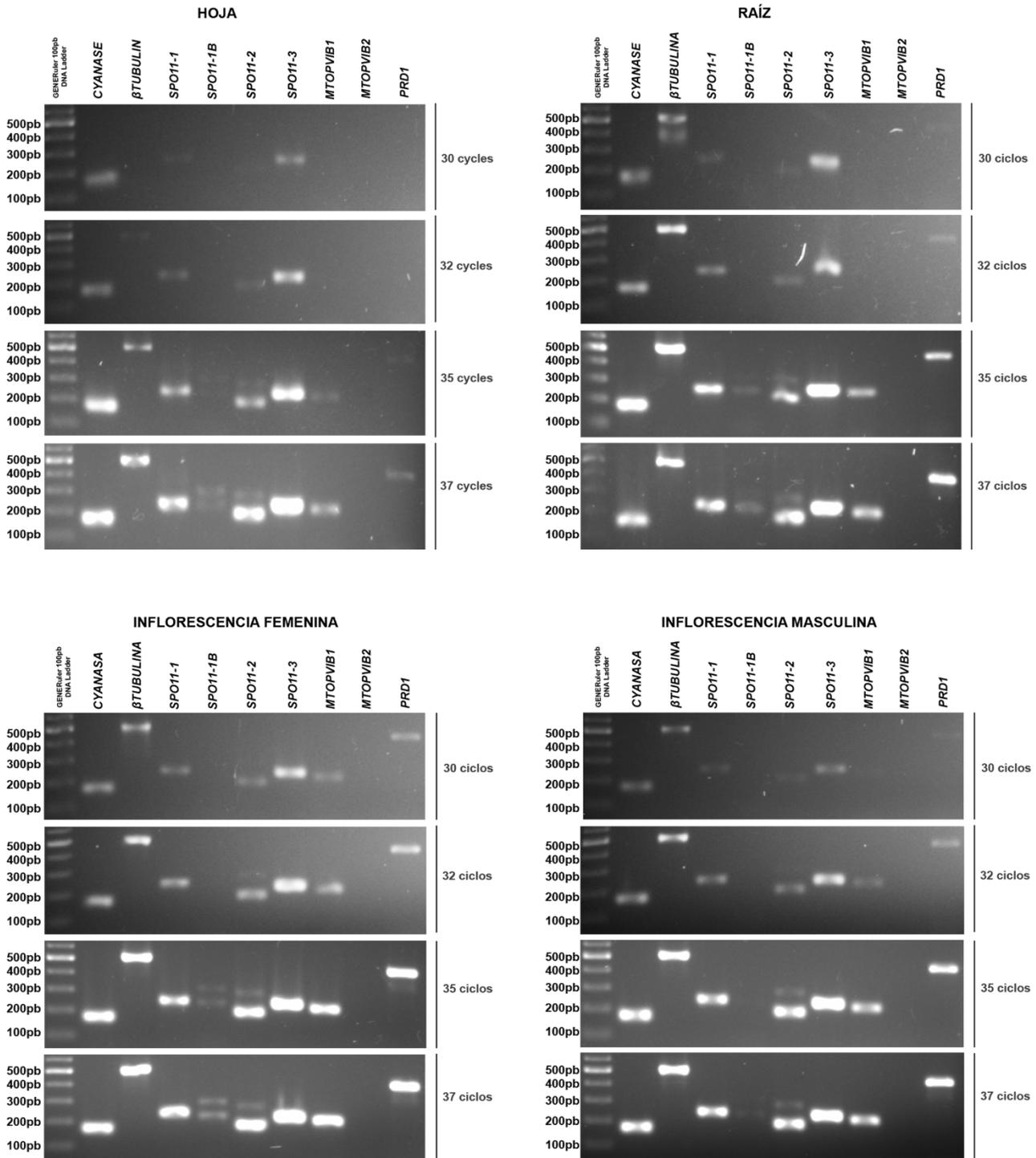


Figura 17. Análisis de expresión por RT-PCR en diferentes órganos de la línea B73 de maíz. Los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1*, *MTOPVIB2* y *PRD1* se amplificaron por PCR con una variación en el número de ciclos en la reacción de PCR. Los transcritos de los genes *CYANASA* y *βTUBULINA6* se utilizaron como genes de referencia. En la figura se muestran los resultados obtenidos en un segundo ensayo de RT-PCR utilizando a las plantas No. 3 (P3) de la tercera extracción de RNA.

6.2.6. Un mecanismo de “splicing” alternativo del mRNA genera dos transcritos de *SPO11-2*

En los ensayos de RT-PCR se detectó una banda adicional al utilizar los oligonucleótidos AR243 y AR244 para amplificar el transcrito *SPO11-2*. Esta banda tiene una diferencia de alrededor de 100 pb respecto a la banda esperada para el transcrito canónico. Una posibilidad para explicar la amplificación de este fragmento es que provenga de un transcrito generado por “splicing” alternativo. Con el fin de corroborar esta hipótesis se clonaron y secuenciaron ambas bandas obtenidas. La secuencia obtenida se alineó con la de *SPO11-2*. Los datos de secuenciación mostraron que el fragmento de alrededor de 300 pb (Figura 18A, carriles 31-35 y 37) corresponden al transcrito canónico de *SPO11-2*, nombrado como *SPO11-2A*. Mientras que el fragmento de alrededor de 400 pb (Figura 18A, carril 36) corresponde a un transcrito alternativo de *SPO11-2*, el cual se genera por la retención del intrón ocho, este transcrito se nombró *SPO11-2B* (Figura 18B), con lo cual se confirmó la hipótesis. La generación de un transcrito alternativo con la retención del intrón 8 resulta en la formación de un PTC y codifica para una proteína incompleta de 280 aa.

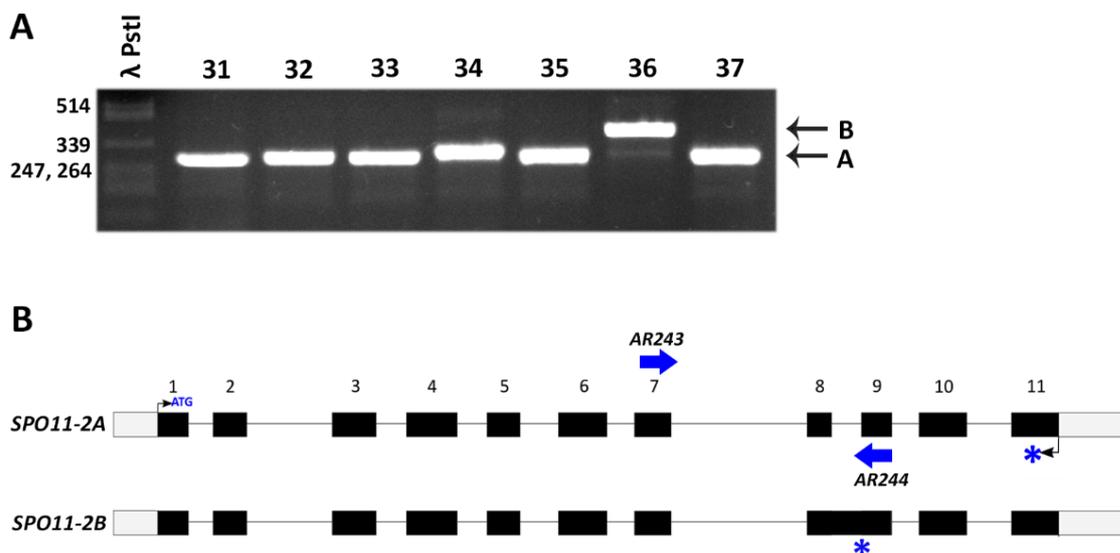


Figura 18. Identificación de transcritos provenientes de eventos del “splicing” alternativo del gen *SPO11-2*. **A)** Productos de PCR en colonia para seleccionar aquellas en las que se integró en un plásmido el transcrito canónico (A, flecha negra) o el posible transcrito alternativo. El carril marcado con el número 36 muestra el fragmento amplificado que correspondería al transcrito alternativo. Los carriles marcados con los números 31-35 y 37 muestran el fragmento amplificado correspondiente al transcrito canónico. **B)** Los resultados de la secuenciación confirmaron que el plásmido extraído de la colonia 31 integró la secuencia del transcrito canónico (*SPO11-2A*) y que el plásmido 36 integró un transcrito alternativo con la retención del intrón 8 (*SPO11-2B*). Los asteriscos azules representan codones de paro, y las flechas azules la posición de los oligonucleótidos

utilizados.

6.2.7 *MTOPVIB1* se expresa en órganos vegetativos y reproductivos, mientras que *MTOPVIB2* no se expresa en los órganos analizados.

En el 2016 se identificaron proteínas del tipo *MTOPVIB/TOPOVIBL* en plantas y animales, las cuales corresponden a un homólogo estructural de la subunidad B de la topoisomerasa VI de la arquea *S. shibatae*, estas proteínas junto con las proteínas Spo11 forman el núcleo catalítico del complejo en el recombinosoma temprano (Vrielynck *et al.*, 2016; Robert *et al.*, 2016b). En maíz se identificaron dos genes *MTOPVIB*. Nuestros resultados demuestran que *MTOPVIB1* se expresa tanto en órganos vegetativos como en órganos reproductivos; la presencia del transcrito se observó en las inflorescencias desde el ciclo 30, mientras que en hoja y raíz se observó a partir del ciclo 35, esto sugiere que la abundancia del transcrito es mayor en órganos reproductivos (Figura 17 y A12). Por el contrario, no se detectó la presencia del transcrito *MTOPVIB2* en ninguno de los órganos analizados en los ensayos de RT-PCR (Figura 17 y A11), incluso al utilizar un programa de PCR con 45 y 50 ciclos de amplificación (Figura A4). Aún con estos resultados, no se puede descartar que *MTOPVIB2* se exprese en otros órganos o tejidos de la planta en una etapa específica del desarrollo. Podemos señalar también la posibilidad de que el nivel de expresión de *MTOPVIB2* sea muy bajo y por ello no se detectó el transcrito con el método utilizado.

Los datos muestran que la expresión de *MTOPVIB1* no es exclusiva de los órganos reproductivos, igual a lo que sucede con los genes *SPO11*, sin embargo, sugieren una expresión diferencial entre órganos vegetativos y reproductivos.

6.2.8 *PRD1* se expresa en órganos vegetativos y reproductivos.

Para evaluar la expresión de *PRD1* se emplearon los oligonucleótidos (AR234 y AR226, Tabla 2), ya que en un primer intento se utilizó un par de oligonucleótidos (AR247 y AR248) con el cual no se observaron resultados claros (Figura A11). Con este segundo par de oligonucleótidos se pudieron amplificar fragmentos de *PRD1* en gDNA y en cDNA de las inflorescencias femenina y masculina (Figura 19). Además se pudo comprobar también la presencia del transcrito *PRD1* en los órganos vegetativos (Figura 17 y A12). La intensidad de la banda del cDNA de *PRD1* varía entre los órganos vegetativos y los reproductivos (Figura A12). En hoja y raíz la banda comienza a ser visible a los 35 y 32 ciclos respectivamente,

mientras que en la inflorescencia femenina y masculina es visible desde los 30 ciclos. Los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR sugieren que hay un enriquecimiento de la abundancia del transcrito *PRD1* en órganos reproductivos y un análisis cuantitativo serviría para corroborar los datos obtenidos.

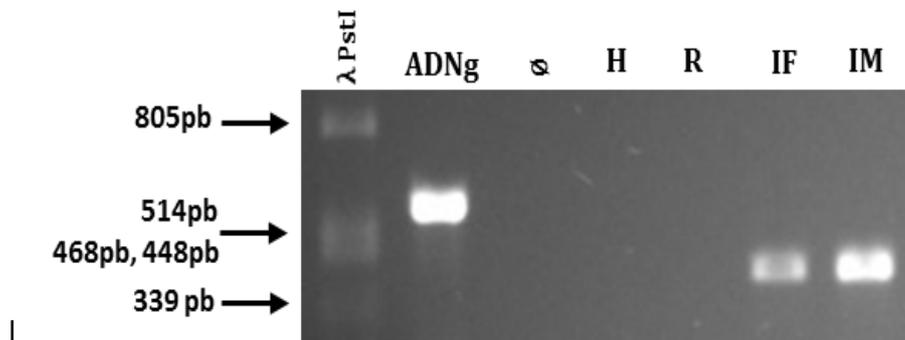


Figura 19. Fragmentos de *PRD1* amplificados por PCR a partir de gDNA y RT-PCR. Se muestran los productos obtenidos a partir de la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para *PRD1*. En el control negativo sin templado no se observa producto de amplificación(Ⓢ). H: hoja, R: raíz, IF: inflorescencia femenina, IM: inflorescencia masculina. El PCR se llevó a cabo con 45 ciclos de desnaturalización (94°C), alineamiento (52°C) y extensión (72°C) utilizando 30 seg en cada etapa.

Los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR mostraron que la expresión de los genes analizados, a excepción de *MTOPVIB2*, no es exclusiva de los órganos reproductivos. Sin embargo, los resultados indican que la abundancia varía entre órganos vegetativos y reproductivos. Para evaluar si existe un tipo de regulación transcripcional diferencias de los genes *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1* se realizó un ensayo de RT-qPCR en los cuatro órganos utilizados.

6.2.9 Los oligonucleótidos para el transcrito de referencia *CYANASA* son eficientes para realizar un ensayo de RT-qPCR.

Para evaluar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos AR452 y AR453, para el transcrito de referencia *CYANASA*, se realizaron tres repeticiones de la curva de eficiencia. Los valores de Cq (número de ciclos a los cuáles la fluorescencia de la muestra pasa un umbral determinado) fueron de 25 a 29 para las diluciones 1, 1:2, 1:4, y 1:8 en las tres replicas técnicas. Los datos obtenidos en la primera réplica de la curva de eficiencia se ajustaron a un modelo de correlación lineal. De esta réplica se obtuvo el mayor coeficiente de correlación (r^2) de 0.9968 (Figura 20). Los Cq de las réplicas técnicas dos y tres de la curva estándar para

CYANASA no mostraron un aumento secuencial a concentraciones más bajas de cDNA, por lo que el valor de la eficiencia obtenida para primera réplica (1.915) será utilizada para el ensayo de RT-qPCR.

Se observó que los oligonucleótidos para CYANASA mostraron un valor alto en la eficiencia y funcionaron correctamente en las diluciones empleadas de cDNA. Tal como se había mostrado en estudios previos (Ma *et al.*, 2007; Nan *et al.*, 2011), los oligonucleótidos son útiles para experimentos posteriores y el gen CYANASA puede ser usado como el gen de referencia en experimentos de RT-qPCR; además, las curvas de disociación muestran que se amplifica un producto único.

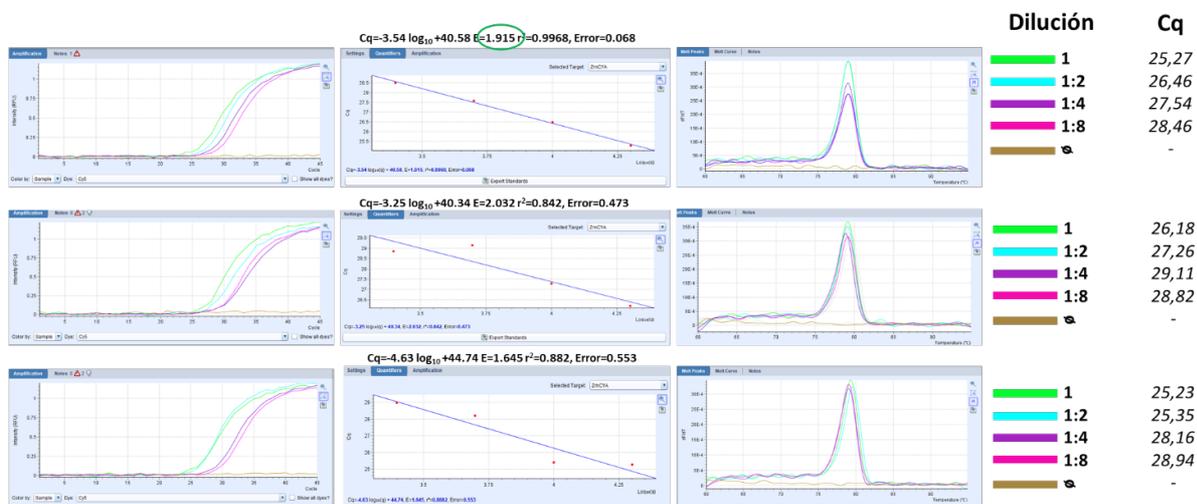


Figura 20. Análisis de la eficiencia de amplificación para el transcrito CYANASA. En la figura se muestran las curvas estándar generadas con cDNA de inflorescencia masculina. La concentración inicial fue de 5.5 ng de RNA/rxn. Las gráficas de la izquierda muestran la intensidad de fluorescencia en el eje y, y los ciclos de amplificación en el eje x. En el centro se muestra la regresión lineal de las curvas estándar, con los valores de r^2 y de eficiencia. En la derecha se muestran las curvas de disociación de los productos de amplificación.

6.2.10 Los oligonucleótidos para los transcritos SPO11-1, SPO11-1B, SPO11-2, SPO11-3 y MTOPVIB1 son eficientes para un ensayo de RT-qPCR y generan productos únicos.

Para evaluar la eficiencia de los oligonucleótidos para amplificar fragmentos de los transcritos SPO11-1, SPO11-1B, SPO11-2, SPO11-3 y MTOPVIB1, se hicieron ensayos de RT-qPCR con cuatro diluciones seriales del cDNA 1, 1:2, 1:4 y 1:8. Cada experimento se hizo por duplicado, se usó un control negativo sin DNA molde para cada réplica. Se obtuvieron eficiencias de amplificación aceptables (entre 1.8 y 2.0) con los oligonucleótidos utilizados para SPO11-1, SPO11-2 y

SPO11-3, ya que los valores de Cq fueron aumentando de manera consecutiva en las diluciones, sin embargo, las dos réplicas de las curvas estándar mostraron valores distintos para la eficiencia de los oligonucleótidos y el coeficiente de correlación, causado por errores técnicos. Los mejores valores de eficiencia para *SPO11-1*, *SPO11-2* y *SPO11-3* fueron de 1.876 con una r^2 de 0.96 (Error= 0.251), 1.871 con una r^2 de 0.9774 (Error= 0.188) y 1.843 con una r^2 de 0.9547 (Error= 0.276), respectivamente; el producto de amplificación fue específico para cada uno de los transcritos, como se puede observar en las curvas de disociación (Figura 21). Los datos indican que los oligonucleótidos pueden ser empleados para realizar los análisis cuantitativos, no obstante, sería conveniente realizar una réplica extra para los tres casos. Para evaluar la expresión del transcrito *SPO11-1B* se utilizaron los oligonucleótidos AR629 y AR630 (Tabla 1, Figura 8) los cuales amplifican de manera específica esta variante de “splicing” del gen *SPO11-1*. Se realizaron dos repeticiones de las curvas de eficiencia de las cuales el mejor valor de la eficiencia fue de 1.815 y una r^2 de 0.9799 (Error= 0.186), la curva de disociación muestra que la amplificación resultó en la formación de un único producto por lo que los oligonucleótidos pueden ser utilizados para analizar la expresión del transcrito *SPO11-1B* (Figura 21).

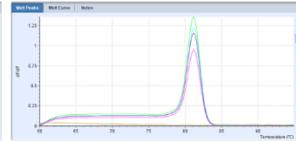
Para el transcrito *MTOPVIB1* se realizaron dos repeticiones de las curvas de eficiencia utilizando oligonucleótidos AR633 y AR634 (Tabla 1 y Figura 8); los resultados muestran que las dos curvas de eficiencia generaron valores altos de eficiencia (1.935 y 1.994) y de coeficiente de regresión (0.9988 y 0.9923). Adicionalmente la curva de disociación muestra que la amplificación corresponde a un solo producto (Figura 21), los oligonucleótidos son eficientes para realizar el análisis cuantitativo.

El valor de eficiencia más alto obtenido para cada par de oligonucleótidos será utilizado para el análisis de datos se utilizará el valor más alto de eficiencia de los oligonucleótidos (1.994) (Figura A13, en anexos).

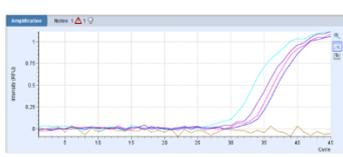
SPO11-1



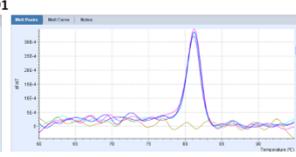
$Cq = -3.66 \log_{10} + 42.83$ $E = 1.876$ $r^2 = 0.96$, Error=0.251



Dilución	Cq
1	29,35
1:2	30,10
1:4	31,00
1:8	32,72
Control	-

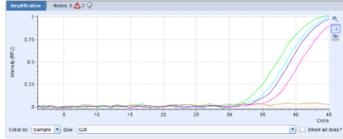


$Cq = -4.15 \log_{10} + 45.19$ $E = 1.742$ $r^2 = 0.9274$, Error=0.391

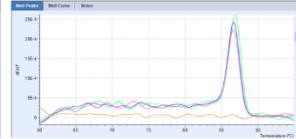


1	29,24
1:2	31,41
1:4	32,43
1:8	33,07
Control	-

SPO11-1B



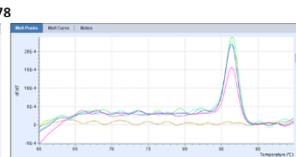
$Cq = -3.86 \log_{10} + 50.85$ $E = 1.815$ $r^2 = 0.9799$, Error=0.186



1	32,63
1:2	34,07
1:4	34,74
1:8	36,32
Control	-

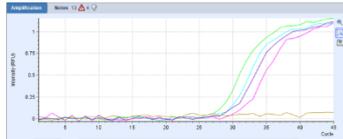


$Cq = -7.33 \log_{10} + 67.42$ $E = 1.369$ $r^2 = 0.9638$, Error=0.478

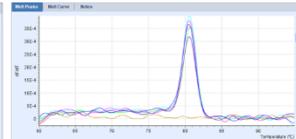


1	33,44
1:2	34,75
1:4	36,87
1:8	40,09
Control	-

SPO11-2



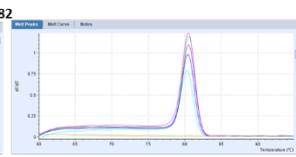
$Cq = -3.68 \log_{10} + 43.04$ $E = 1.871$ $r^2 = 0.9774$, Error=0.188



1	27,15
1:2	28,58
1:4	29,18
1:8	30,64
Control	-

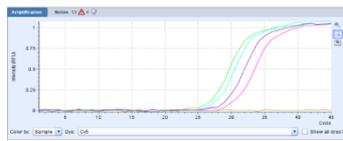


$Cq = -4.26 \log_{10} + 46.23$ $E = 1.716$ $r^2 = 0.8985$, Error=0.482

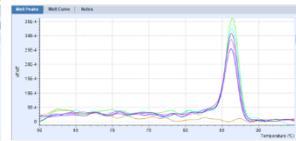


1	27,50
1:2	29,96
1:4	30,07
1:8	31,74
Control	-

SPO11-3



$Cq = -4.13 \log_{10} + 43.51$ $E = 1.76$ $r^2 = 0.9093$, Error=0.145



1	25,90
1:2	26,79
1:4	28,16
1:8	29,59
Control	-



$Cq = -3.77 \log_{10} + 42.42$ $E = 1.843$ $r^2 = 0.9547$, Error=0.276

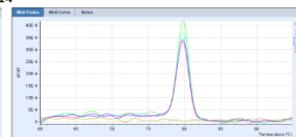


1	26,25
1:2	27,10
1:4	28,93
1:8	29,42
Control	-

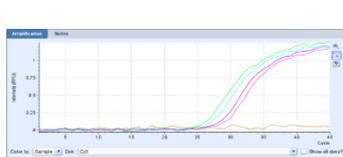
MTOPIVIB1



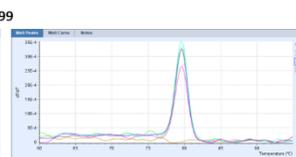
$Cq = -3.49 \log_{10} + 41.57$ $E = 1.935$ $r^2 = 0.9988$, Error=0.014



1	25,17
1:2	26,23
1:4	27,25
1:8	28,33
Control	-



$Cq = -3.34 \log_{10} + 41.02$ $E = 1.994$ $r^2 = 0.9923$, Error=0.099



1	25,34
1:2	26,26
1:4	27,51
1:8	28,27
Control	-

Figura 21. Análisis de la eficiencia de amplificación para los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-1B*, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1*. En la figura se observan las curvas estándar generadas con cDNA de inflorescencia masculina. Para *SPO11-2* y *SPO11-3* la concentración inicial fue de 5,5 ng de RNA/rxn mientras que para *SPO11-1B* y *MTOPV1* la concentración inicial fue de 50 ng de RNA/rxn. Las gráficas de la izquierda muestran la intensidad de fluorescencia en el eje y y los ciclos de amplificación en el eje x. En el centro se muestra la regresión lineal de las curvas estándar, con los valores de r^2 , error y eficiencia (E). En la derecha se muestran las curvas de disociación de los productos de amplificación. Los mejores valores de eficiencia están señalados con los círculos verdes.

6.2.11 La abundancia de los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-1B*, *SPO11-2* y *MTOPVIB1* está enriquecida en los órganos reproductivos.

Con los experimentos de RT-PCR de punto final se confirmó la presencia de los transcritos canónicos de los tres genes *SPO11*, *MTOPVIB1* y *PRD1*, así como también del transcrito *SPO11-1B* en hoja, raíz y las inflorescencias femenina y masculina, lo cual es evidencia de que estos genes son transcripcionalmente activos y que la expresión no es exclusiva de los órganos reproductivos. Los resultados sugirieron una diferencia en la abundancia de transcritos de los genes analizados entre órganos vegetativos y reproductivos. Para corroborar la diferencia en la abundancia de los transcritos entre los órganos vegetativos y reproductivos de forma precisa, se realizó un ensayo cuantitativo (RT-qPCR). Los resultados del RT-qPCR (Figura 22), muestran un enriquecimiento evidente de la abundancia de los transcritos *SPO11-1* y *SPO11-2* en los órganos reproductivos respecto a los órganos vegetativos con una relación de la abundancia mayor a 6. A su vez, *SPO11-3* mostró una relación menor a 3.5; además este transcrito registró el porcentaje más alto de abundancia relativa en los órganos vegetativos (Figura 22F).

La relación de la abundancia relativa promedio de los órganos reproductivos respecto a los vegetativos para los transcritos *SPO11-1* y *SPO11-2* es de 6.3 y 7.7 (Figura 22F); esta relación disminuye a 2 en el caso de *SPO11-3*. Los datos indican que el aumento en la expresión de los genes *SPO11-1* y *SPO11-2* durante la meiosis es mayor que para *SPO11-3*. Los resultados obtenidos el análisis cuantitativo y en los ensayos de RT-PCR de punto final son congruentes. En la Figura 17 se observa que la banda de los transcritos *SPO11-1* y *SPO11-2* es visible a los 32 ciclos en hoja y raíz, mientras que en los órganos reproductivos

aparece con mayor intensidad a partir de los 30 ciclos. Por otro lado, se observó la banda del transcrito *SPO11-3* en hoja y raíz desde los 30 ciclos.

El ensayo RT-PCR de punto final confirmó la presencia del transcrito *SPO11-1B* en los cuatro órganos analizados. Este ensayo sugirió que dicho transcrito es menos abundante, ya que se observó una menor intensidad de la banda *SPO11-1B*, respecto a la banda proveniente de los transcritos *SPO11-1A* y *SPO11-1B* (anotada como *SPO11-1* en la Figura 17). Este fenómeno se repitió al realizar el ensayo utilizando otro par de oligonucleótidos, los cuales amplifican ambos transcritos (Figura 16). Las observaciones anteriores se comprobaron con los datos del ensayo de RT-qPCR, ya que el porcentaje de abundancia relativa de *SPO11-1B* es notablemente más bajo comparado con el porcentaje de abundancia de *SPO11-1* (los oligonucleótidos usados en este ensayo amplifican ambos transcritos A y B) (Figura 22A, C y E). Con estos resultados se puede inferir que el transcrito canónico *SPO11-1A* se expresa más que el transcrito alternativo *SPO11-1B*. Sin embargo, es importante mencionar que *SPO11-1B* también presentó un enriquecimiento en los órganos reproductivos..

En otras especies vegetales se describieron mecanismos de “splicing” alternativo en los genes *SPO11*, este es el caso para *A. thaliana* en donde se reportó la producción de un transcrito alternativo de *SPO11-1* con la retención del intrón dos en plántulas, tallos y flores. Este mecanismo es similar al que conlleva a la formación del transcrito *SPO11-1B* de maíz. No obstante, en *A. thaliana* la retención del intrón dos produce un PTC que probablemente produciría una proteína trunca (Hartung y Puchta, 2000; Sprink y Hartung, 2014); además, no se conoce con exactitud la función de este transcrito alternativo. En maíz, la retención del intrón dos en el transcrito *SPO11-1B* mantiene el marco de lectura lo que adicionaría 43 aminoácidos y generaría una proteína más grande que la codificada por el transcrito canónico. *SPO11-1B* podría estar involucrada en procesos meióticos, pero es necesario realizar experimentos adicionales para esclarecer esta hipótesis.

Al igual que los transcritos de los genes *SPO11-1* y *SPO11-2*, la expresión de *MTOPVIB1* no está limitada a los órganos reproductivos, contrario a lo que se observó en ratón en donde la expresión de su ortólogo *top6bl* parece tener una expresión específica en los órganos reproductivos masculinos (Robert et al.

2016a). Los datos obtenidos en los ensayos de RT-qPCR mostraron que la expresión de *MTOPVIB1* en los órganos vegetativos es considerablemente menor a la expresión en los órganos reproductivos, se obtuvo una relación de expresión de más de 40 en los órganos reproductivos respecto a los órganos vegetativos (Figura 22D y F). También se observó que la expresión de *MTOPVIB1* es más baja en comparación con la expresión de los transcritos canónicos de los genes *SPO11* (Figura 22) en órganos reproductivos. Los porcentajes de abundancia relativa de *MTOPVIB1* en los órganos vegetativos son de menos del 1% y en órganos reproductivos de entre el 10% y 13%(ver Figura A13). La expresión de *MTOPVIB1* está más restringida en los órganos reproductivos en comparación con la de los genes *SPO11*, ya que los porcentajes de abundancia relativa de estos últimos en mayor a 30%. No se ha reportado una conexión entre la regulación del recombinosoma temprano y la expresión de los genes que codifican para proteínas que lo constituyen, sin embargo, se podría sugerir una posible regulación transcripcional diferencial del complejo por componentes adicionales a *SPO11*, como es el caso de *MTOPVIB1* y posiblemente de *PRD1*.

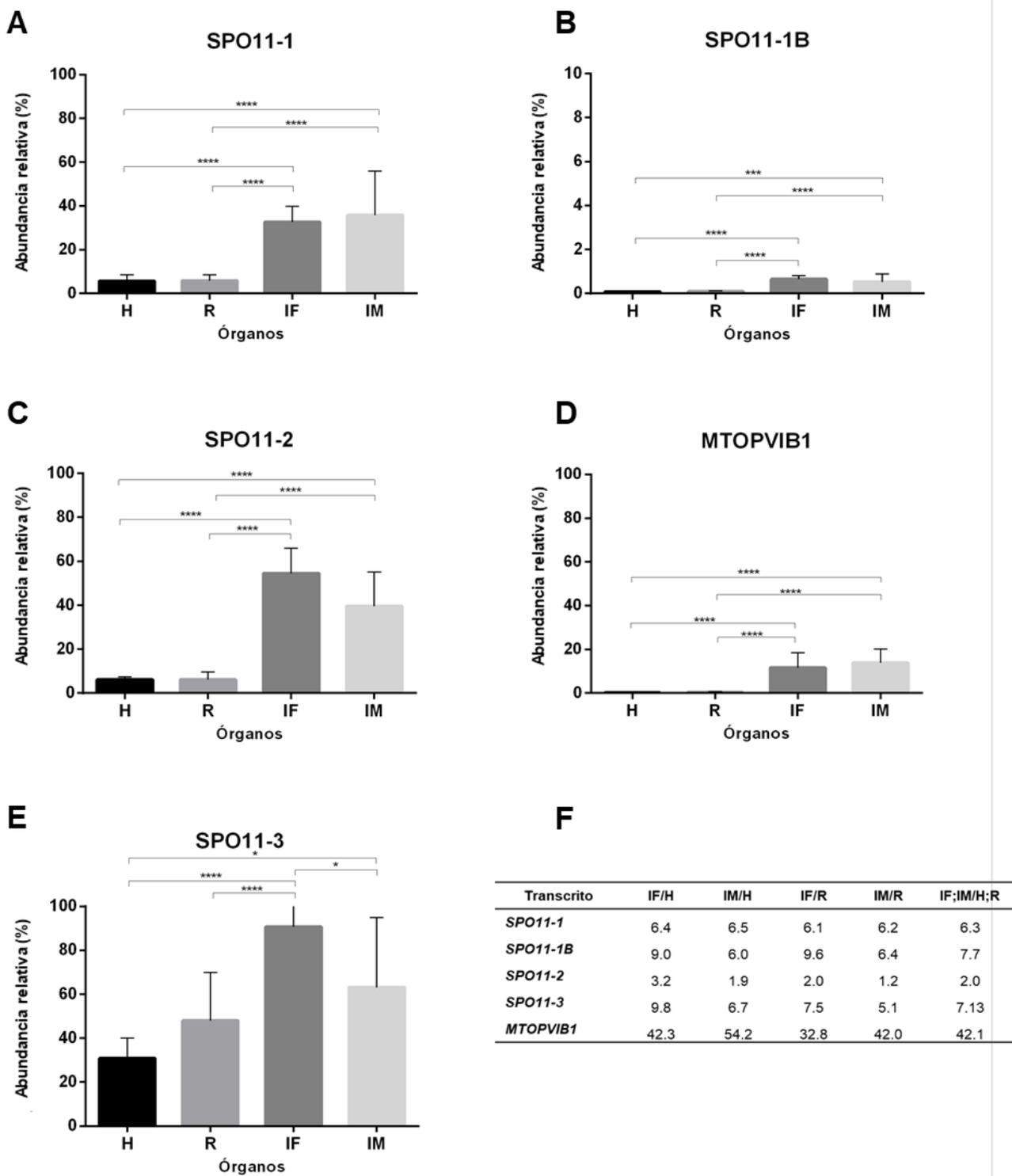


Figura 22. RT-qPCR de los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-1B*, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1* en cuatro órganos de maíz de la línea B73. A-E) Abundancia relativa (%) de los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-1B*, *SPO11-2*, *SPO11-3* y *MTOPVIB1* respecto al transcrito del gen de referencia *CYANASA* en los órganos analizados. Debido a que la expresión del transcrito de *SPO11-1B* es muy baja, se utilizó un rango de 0 - 10 % de la expresión/*CYANASA*. Las barras representan la desviación estándar y los asteriscos muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los órganos ($p > 0.05$). F) Abundancia relativa (%) de los transcritos de genes analizados en un órgano respecto a otro (ejemplo IF/H; Inflorescencia Femenina respecto a Hoja) y de los órganos reproductivos respecto a los órganos vegetativos (IF;IM/H;R), para éste último se utilizaron los promedios de los órganos reproductivos y vegetativos.

7. DISCUSIÓN

En las bases de datos para maíz existen múltiples predicciones de transcritos para cada uno de los genes estudiados en este trabajo, muchas de éstas predicciones provienen de algoritmos computacionales que identifican marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) y delimitan a los exones de cada transcrito. El objetivo de este trabajo fue determinar los transcritos canónicos y evaluar si se expresan normalmente en la planta. Para realizar la anotación de los transcritos canónicos de los genes *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1*, *MTOPVB2* y *PRD1* se analizaron los diferentes transcritos obtenidos en tres bases de datos: NCBI, Gramene y MaizeGDB, las cuales incluyen la información de la versión cuatro del genoma de maíz liberada recientemente (Jiao *et al.*, 2017). La selección de los transcritos canónicos para cada gen se realizó tomando como referencia las secuencias de aminoácidos predichas por los transcritos y su similitud con proteínas ortólogas, sobre todo de especies de plantas como *A. thaliana*, *O. sativa* y *S. bicolor* (datos no mostrados). Para algunos de los genes analizados solamente se cuenta con una anotación en la versión 4 del genoma, es el caso de *SPO11-3* y *MTOPVB2*; para estos genes se trabajó con esta anotación. El gen *MTOPVIB2* es un homólogo de *MTOPVIB1* y cabe mencionar que en otros genomas vegetales se identificó solamente un gen que codifica para proteínas MTOPIVIB (Vrielynck *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016) . Aunque se encontraron varios transcritos alternativos de los genes, no sabemos si todos ellos se expresan o corresponden únicamente a predicciones computacionales erróneas.

Las proteínas de la familia MTOPIVIB/TOPOVIBL se describieron en *A. thaliana*, *M. musculus* y *O. sativa* (Vrielynck *et al.*, 2016; Robert *et al.*, 2016a ; Fu *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016) y se asociaron a la formación de RDCs. Con la información recabada de las proteínas MTOPIVIB/TOPOVIBL y su función en conjunto con las proteínas SPO11 se propuso que las RDCs son catalizadas por un complejo similar a la topoisomerasa de tipo II de *S. shibatae* (TopoVI). De forma interesante, en maíz se han identificados dos genes parálogos que codifican para proteínas de esta familia (Figura 6), los cuales parecen provenir de un evento de duplicación. Un alineamiento de nivel de secuencia de aminoácidos muestra que la proteína MTOPIVIB1 presenta motivos conservados, los cuales se identificaron y describieron en la proteína MTOPIVIB de *A. thaliana* (Vrielynck *et al.*, 2016), *O.*

sativa (Fu *et al.*, 2016) y en otras proteínas de la familia MTOPVIB de plantas (Figura 9 y Figura A1). Por otro lado, la proteína MTOPVIB2 conserva solamente algunos aminoácidos de los motivos b1 y b2 dentro del dominio GHKL y carece de los motivos b3 del SmD y dWxxY del dominio transductor. Además, el motivo b4 del dominio transductor está poco conservado, contrario a lo que sucede con MTOPVIB1. Estos motivos son importantes para la función de las proteínas, en MTOPVIB2 estos motivos están incompletos o ausentes por lo que podría no ser funcional. Adicionalmente, al generar modelos tridimensionales de ambas proteínas se observa que únicamente MTOPVIB1 presenta similitud con la estructura de Topo VIB de *S. shibatae* (Figura 10). En el modelo tridimensional de la proteína MTOPVIB1 se puede observar que los motivos b1-b4 se localizan en los dominios correspondientes (Figura A2) y en estructuras secundarias conservadas (Figura 10 y A2), el motivo b4 forma una alfa hélice en el dominio transductor, el cual está involucrado en la interacción con SPO11 (Vrielynck *et al.*, 2016; Robert *et al.*, 2016a). En cambio, MTOPVIB2 no tiene similitud con la misma (Figura A2), ésta se modeló con base en la estructura cristalizada de un dominio SH2 de la proteína de señalización CHN2 (Human Beta2-Chimaerin).

Los datos obtenidos del análisis bioinformáticos muestran que *MTOPVIB1* codifica para una proteína que mantiene la estructura de las proteínas del tipo, además conserva todos los motivos característicos. Se sugiere que *MTOPVIB1* podría tener las funciones meióticas observadas en las proteínas de la familia MTOPVIB/TOPOVIBL. Por otro lado, el gen parálogo *MTOPVIB2* codifica para una proteína que perdió muchos de los aminoácidos de los motivos conservados e incluso dos motivos están ausentes. Por tal motivo, no encontró similitud estructural entre MTOPVIB2 y las proteínas ortólogas; el grado de conservación a nivel de secuencia primaria también es bajo respecto a otras proteínas de la misma familia e incluso con MTOPVIB1.

Los pseudogenes se describieron como genes parálogos defectuosos que han perdido la capacidad de generar RNA o proteína funcional (Xiao *et al.*, 2016) y se han identificado en muchos genomas. Aunque se había considerado que eran entidades sin ninguna actividad, ahora se sabe que algunos pseudogenes pueden ser activos y participar en procesos de regulación (Sasidharan & Gerstein, 2008). En los ensayos de RT-PCR realizados en este trabajo no pudimos detectar el

transcrito de *MTOPVIB2* en órganos vegetativos (hoja y raíz) ni en órganos reproductivos (inflorescencias femenina y masculina) (Figura 17, A3 y A11), lo que sugiere que se puede tratar de un pseudogen; no obstante, existe la posibilidad de que la expresión del gen se lleve a cabo a niveles muy bajos, en otros órganos no analizados, en una etapa de desarrollo específica, o incluso, en condiciones particulares como de estrés. Con los resultados de este trabajo, se propone que *MTOPVIB2* puede ser un pseudogen, esta idea se apoya por el hecho de que la proteína parece haber perdido muchos de los motivos conservados que se requieren para la funcionalidad de las proteínas de la familia MTOPVIB/TOPOVIBL.

La formación de las RDCs está altamente regulada a nivel espacial y temporal, y está restringida a una estrecha ventana de tiempo durante la profase I de la meiosis (Lam y Keeney 2015). En algunos organismos como *S. cerevisiae* la expresión de Spo11 se lleva a cabo principalmente en células que están en división meiótica, mientras que en otros organismos se ha encontrado el transcrito de Spo11 en células no meióticas, sin embargo, en estos casos no se ha identificado una proteína funcional (Keeney, 2007). Se propuso que una forma de regular la formación de las RDCs es mediante la regulación de la transcripción de Spo11 y otros genes involucrados en el proceso (Lam y Keeney, 2015), lo anterior es una razón por la cual evaluamos la expresión de los genes que codifican para proteínas SPO11 y MTOPVIB, así como también para una probable proteína accesoria del recombinosoma temprano, PRD1.

Nuestros resultados muestran que los genes analizados en este trabajo, a excepción de *MTOPVIB2*, se expresan tanto en órganos vegetativos como en órganos reproductivos de las plantas de maíz. Inicialmente determinamos que el transcrito *PRD1* se expresaba de manera específica en órganos reproductivos (Figura 17), sin embargo, posteriormente el transcrito de este gen fue detectado también en hoja y raíz en otras réplicas biológicas analizadas, lo cual sugiere la expresión del gen varía entre las plantas de maíz, aun cuando estas crecieron en las mismas condiciones. Además, podemos concluir que ninguno de los genes analizados tiene una expresión específica en órganos reproductivos. No obstante, los resultados de RT-qPCR muestran que existe expresión diferencial de los genes *SPO11* y *MTOPVIB1* entre los órganos vegetativos y reproductivos ya que la abundancia de los transcritos fue mayor en órganos reproductivos.

Los resultados obtenidos en el análisis de RT-qPCR para los genes *SPO11*, mostraron que existe una mayor acumulación de los transcritos *SPO11-1* y *SPO11-2* en los órganos reproductivos. Cabe mencionar que los análisis de expresión se realizaron con órganos reproductivos en etapas tempranas de la meiosis, lo cual se puede predecir por el tamaño de los órganos. Por lo tanto, podemos atribuir el aumento en la expresión de estos genes a la presencia de células meióticas en los órganos reproductivos. Los ensayos de RT-PCR de punto final demostraron que los genes analizados se expresan también en órganos vegetativos, con lo que se podría pensar que la regulación del recombinosoma no ocurre a nivel transcripcional. Sin embargo, los ensayos cuantitativos hicieron cambiar esta visión. La cantidad de transcritos en el momento exacto que son requeridos podría ser una forma de regulación; nuestros datos soportan esta idea ya que en las inflorescencias se observa un incremento significativo en la abundancia de los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-2* y *MTOPVIB1*.

En *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) se observó un aumento considerable en la expresión de una gran cantidad de genes en células en distintas etapas la meiosis, respecto a células en etapa vegetativa. Dicho incremento en la transcripción se asoció a la actividad en cascada de diferentes factores de transcripción, los cuales provocan un cambio en el programa de expresión a nivel global en la célula. Los genes identificados en el estudio, se agruparon en distintos procesos de la meiosis de acuerdo a su función, incluyendo la recombinación (por ejemplo *rad51*, *dmc1* y *mus81*) (Mata, Lyne, Burns, & Bähler, 2002). El aumento en la expresión de un gran número de genes durante la meiosis se ha observado también en *S. cerevisiae* (Chu *et al.*, 1998). Sorprendentemente, un estudio reciente (Cheng *et al.*, 2018) mostró que la abundancia de transcritos de varios genes en las células meióticas tiene una correlación pobre con la abundancia de la proteína correspondiente. En dicho trabajo se observaron varios casos de genes sin una correlación mRNA:proteína. La escasa correlación se asoció a un mecanismo de regulación transcripcional muy peculiar, mediado por la generación de transcritos alternativos más largos que el transcrito canónico los cuales son formados por la transcripción de regiones 5' río arriba del codón de inicio, estos transcritos alternativos se traducen con poca eficiencia, lo que resulta en una menor cantidad de proteína con respecto a los niveles de transcritos de las células

(Cheng *et al.*, 2018). El ejemplo anterior muestra un tipo de regulación transcripcional que tiene un efecto en la cantidad final de proteínas que están presentes en células que se encuentran en el proceso de división meiótica.

Un análisis transcriptómico y proteómico en maíz demostró que la correlación entre los niveles de mRNA y de proteínas es débil. En estos análisis se encontró que la cantidad de transcritos es mayor que la cantidad de proteínas en 23 tejidos, incluyendo órganos vegetativos y reproductivos (Walley *et al.*, 2016). Por otro lado, un análisis de secuenciación masiva de mRNA proveniente de células aisladas de anteras de maíz en diferentes etapas de la profase meiótica I mostró un incremento global en los niveles de expresión génica durante la progresión de la meiosis y un rápido rearrreglo del transcriptoma justo antes del apareamiento de los cromosomas (Nelms, 2018); estos datos son consistentes con los datos descritos para maíz, *S. pombe* y *S. cerevisiae*, así como también con nuestros resultados que presentaron un incremento en la expresión de los genes *SPO11* en los órganos reproductivos de maíz. Especificar que es muy importante determinar los niveles de proteína de los transcritos estudiados en este trabajo para completar el escenario.

Recientemente se publicó un trabajo que muestra la regulación transcripcional durante la meiosis del gen *PRD2* en *Arabidopsis*, mediada por un patrón de metilación de DNA introducido por una vía de metilación *de novo* (Walker *et al.*, 2018); la metilación del DNA puede ser reprogramada durante el desarrollo para regular la expresión del gen *PRD2*, homólogo de *Mei4* de levadura y mamíferos, que codifica para una proteína que ha sido ampliamente estudiada y que forma parte de un subcomplejo proteínico conocido como RMM (Rec115, Mer2, Mei4), el cual contribuye al reclutamiento de Spo11 hacia los sitios de formación de RDCs (Maleki *et al.*, 2007; Panizza *et al.*, 2011; Tessé *et al.*, 2017). En el estudio de Walker *et al.* (2018) observaron que mutantes con una alteración en el patrón de metilación del gen *PRD2* presentan errores en el mecanismo de “splicing” del transcrito, lo que resulta en la formación de un transcrito maduro con la retención de un intrón. La retención de dicho intrón produce un PTC, la formación de este transcrito provoca defectos durante la meiosis y la producción de las células sexuales desbalanceadas. La funcionalidad de *PRD2* asociada a la formación de transcritos alternativos abre un nuevo panorama de la regulación de la meiosis.

En distintas especies de plantas como *B. rapa*, *C. papaya*, *O. sativa* y *P. patens* se observó que los genes *SPO11-1* y *SPO11-2* exhiben mecanismos de “splicing” alternativo que generan distintos transcritos (Sprink y Hartung, 2014). El estudio realizado por Sprink y Hartung en el 2014 mostró que el mecanismo más frecuente de “splicing” alternativo observado en estos transcritos se lleva a cabo por la retención de intrones y que generalmente resulta en la formación de codones de paro prematuros (PTC), con los que se producirían proteínas incompletas. De esta manera, la formación de transcritos alternativos en los genes *SPO11* parece ser un mecanismo conservado en plantas y puede ser una forma de regulación de estos genes como sucede con *PRD2* en *Arabidopsis*. También se reportó un mecanismo de “splicing” alternativo por retención de intrones en el gen que codifica para la recombinasa DMC1 en varias especies como *A. thaliana* y en humano (Hartung *et al.*, 2002b), por lo que parece que este mecanismo está distribuido en varios genes involucrados en la recombinación meiótica. Tomando en consideración los resultados reportados en varias especies, se puede pensar que existe una regulación de los componentes meióticos a nivel post-transcripcional y sigue siendo importante analizar este aspecto.

Anteriormente se habían detectado dos transcritos alternativos de *SPO11-1* (A y B), como resultado de la retención del intrón dos, ambos transcritos mantienen el marco de lectura de la proteína hasta el codón de paro del exón 15. Además, la proteína hipotética codificada por *SPO11-1B*, adiciona 43 aminoácidos, que coinciden con una región extra propia de los transcritos largos de ratón y humano (Figura 4). Los bioinformáticos sugieren que ambos transcritos podrían ser funcionales. Sin embargo, no se pudo amplificar el transcrito *SPO11-1B* completo (Figura A14) por lo que aún queda en duda si las células producen el transcrito y si se traduce. En los ensayos de RT-PCR presentados en este trabajo se detectó una banda adicional al realizar el experimento con los oligonucleótidos específicos para *SPO11-2*, la cual resultó ser producto de un transcrito alternativo generado por la retención del intrón 8. La retención de este intrón se identificó también en otras especies vegetales, y en todos estos transcritos, incluyendo el de maíz, se producen PTCs (Sprink y Hartung, 2014). En maíz identificamos al menos dos transcritos alternativos para los genes *SPO11-1* y *SPO11-2*. Para *SPO11-1* el transcrito alternativo detectado (*SPO11-1B*) forma parte de las predicciones en las

bases de datos, pero para *SPO11-2* no fue el caso. Muchas de las predicciones de transcritos que se incluyen en las bases de datos mantienen el marco de lectura abierto por lo que dentro de estas predicciones no se encontraron transcritos con retención de intrones que formen PTCs. Debido a que en otras especies se han encontrado varios transcritos alternativos para estos genes y muchos de ellos son producidos por la retención de intrones, es probable que para maíz también se estén produciendo más de dos transcritos de estos genes que no han sido incorporados en las bases de datos. Dentro de los transcritos alternativos de los genes *SPO11* de otras especies vegetales, se identificaron algunos que podrían generar proteínas funcionales ya que el marco de lectura se mantiene en fase, de forma similar a lo que ocurre con el transcrito *SPO11-1B*. Existe la posibilidad de que este transcrito se traduzca y pueda tener alguna función en la meiosis ya que se tiene el antecedente de ratón donde los dos diferentes transcritos de *Spo11* generan isoformas de la proteína con funciones diferentes en la meiosis (Kauppi *et al.*, 2011). En ratón la generación de la isoforma *SPO11 α* tiene un papel esencial en la meiosis masculina, ya que participa en la recombinación de los cromosomas sexuales XY. Una hipótesis es que la proteína *SPO11-1B* en maíz tengan una función particular en la meiosis femenina o masculina. Nuestros resultados de RT-qPCR no mostraron diferencias significativas en la abundancia del transcrito entre las inflorescencias femenina y masculina. Estos datos sugieren que *SPO11-1B* podría no estar regulando aspectos sexo-específicos de la meiosis en maíz, sin embargo, no se descarta alguna función de esta isoforma en la recombinación.

En plantas se ha propuesto que la generación de los transcritos alternativos en los genes meióticos puede ser un mecanismo de regulación mediado por la vía NMD (“nonsense-mediated mRNA decay”, en inglés), en eucariontes esta vía está involucrada en la rápida eliminación de transcritos aberrantes que contienen PTCs (Chiba y Green, 2009), adicionalmente se ha observado que transcritos con regiones 3' UTR largas o las cuales incluyen intrones también pueden promover la activación de la vía NMD (Kertész *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* para ambos genes *SPO11* se identificaron tanto transcritos que presentan intrones dentro de las regiones 3' UTR, como transcritos que generan PTCs (Hartung y Puchta, 2000; Sprink y Hartung, 2014), estos datos sugieren que la expresión de los genes *SPO11* puede estar regulada por una vía de control de calidad de transcrito.

Nuestros datos de RT-qPCR mostraron un aumento significativo en la expresión en los transcritos de los genes *SPO11-1*, *SPO11-2* y *MTOPVIB1* en órganos reproductivos. Los datos obtenidos para estos genes concuerdan con los datos de un incremento en la expresión global durante la meiosis reportados en las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae*, así como también en maíz. El estudio realizado por Nelms y Walbot (2019) mostró que existen dos eventos principales donde ocurre un rearrreglo del transcriptoma en las células meióticas masculinas de maíz, uno de ellos sucede al inicio del leptoteno, que coincide con el momento donde se forman las RDCs, y el otro sucede al término del leptoteno e inicio del cigoteno. Los datos obtenidos del análisis cuantitativo arrojaron resultados interesantes, aún cuando la abundancia del transcrito *SPO11-1B* fue muy bajo en los cuatro órganos analizados, se observó un enriquecimiento en los órganos reproductivos, lo que podría sugerir que el transcrito podría formarse como parte de un mecanismo de regulación del recombinosoma temprano. Y también indica que los transcritos alternativos están sujetos al cambio en la expresión de los genes meióticos durante la meiosis. Por otro lado, se detectó un porcentaje de abundancia muy alto del transcrito *MTOPVIB1* en los órganos reproductivos respecto a los órganos vegetativos, con una relación de 42 (Figura 22F); estos datos sugieren que existen señales que incrementen considerablemente de la expresión de *MTOPVIB1* durante la meiosis. El aumento de la abundancia de *MTOPVIB1* en las inflorescencias, es mayor que para *SPO11-1* y *SPO11-2*. Además, el porcentaje de abundancia de dicho transcrito en los órganos vegetativos fue muy baja, de menos del 1% (Figura 22F), comparado con los porcentajes de abundancia de los transcritos de los genes *SPO11* en órganos vegetativos. Estos datos pueden sugerir que la proteína derivada del gen *MTOPVIB1* podría ser uno de los componentes del recombinosoma temprano con un tipo de regulación más fina y que podría darle la especificidad al complejo. En otros estudios se ha observado que la proteína MTOPIVIB de *A. thaliana* y TOPOVIBL de ratón se localiza en foci a lo largo de la cromatina durante el leptoteno (Robert *et al.*, 2016a; Vrielynck *et al.*, 2016). Mientras que para las proteínas SPO11 no se ha descrito un patrón específico de localización, sino que se ubican en toda la cromatina (Grelon *et al.*, 2001). Estos datos apoyan la hipótesis de que MTOPIVIB1 podría ser un factor importante para la especificidad de localización del recombinosoma temprano.

Los resultados mostrados en el presente trabajo corresponden a un análisis de expresión, sin embargo, no sabemos si estos transcritos son traducidos y si las proteínas están presentes en los cuatro órganos analizados. Cabe mencionar que en *A. thaliana* se han identificado varias proteínas accesorias como PRD1, PRD2, PRD3 y DFO (Lambing *et al.*, 2017), que tienen homólogos en maíz y otras plantas, por tal motivo no podemos descartar la posibilidad de que exista una regulación a nivel transcripcional por alguno de estos otros posibles miembros del recombinosoma temprano, así como también una regulación del complejo en otro nivel, por ejemplo a nivel traduccional o postraduccional o bien mediante las interacciones entre las proteínas del complejo. Aunque no se obtuvo un análisis cuantitativo de *PRD1*, los datos de RT-PCR sugieren que el gen tiene un nivel de expresión bajo en los órganos vegetativos; por tal motivo sugerimos que PRD1 puede ser un componente importante en la regulación del complejo. Cada una de las proteínas del complejo son necesarias para su funcionalidad y la ausencia de algún componente podría comprometer la formación del mismo, por lo tanto, no se descarta que exista un componente que regule la actividad del complejo.

8. CONCLUSIONES

- Los genes analizados están presentes en órganos vegetativos y reproductivos, sin embargo, existe un enriquecimiento en la abundancia de los transcritos analizados, a excepción de *MTOPVIB2*, en los órganos reproductivos. Los datos sugieren que hay un mecanismo de regulación transcripcional diferencial en los órganos reproductivos que podrían modular la actividad del recombinosoma temprano.
-
- *SPO11-1* y *SPO11-2* presentan mecanismos de “splicing” alternativo que resultan en la formación de al menos dos transcritos. Ambos transcritos de *SPO11-1* y *SPO11-1* se presentan en órganos vegetativos y reproductivos.
-
- La abundancia del transcrito *SPO11-1B* es baja, pero si se detectó un enriquecimiento en los órganos reproductivos. No se encontró una diferencia en la abundancia entre inflorescencias femenina y masculina, lo que sugiere que *SPO11-1B* no regula aspectos sexo-específicos de la meiosis
-
- Se identificaron dos genes que codifican para proteínas de la familia *MTOPVIB/TOPOVIBL*, *MTOPVIB1* presenta los cuatro motivos conservados (b1-b4) de las proteínas ortólogas de plantas y comparte homología estructural con *Topo VIB* de *S. shibatae*. *MTOPVIB2* presenta pocos aminoácidos conservados de los motivos b1, b2 y b4, y el motivo b3 está ausente; además, no se detectó la expresión del gen *MTOPVIB2* en ninguno de los órganos analizados. Los resultados sugieren que *MTOPVIB2* es un pseudogen y que *MTOPVIB1* participa en la recombinación meiótica.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar si los transcritos alternativos de los genes *SPO11-1*, *SPO11-2*, *MTOPVIB1* y *PRD1*, predichos en las bases de datos, se expresan durante la meiosis. Para esto se propone analizar bases de datos de secuenciación de RNA (RNA-seq en inglés).
- Determinar si existe un enriquecimiento del transcrito *PRD1* en las inflorescencias femenina y masculina respecto a órganos vegetativos mediante un ensayo de RT-qPCR, ya que es un componente del recombinosoma temprano que podría dar mayor especificidad al complejo mediante un mecanismo de regulación transcripcional.
- Analizar la participación del transcrito *SPO11-1B* durante la profase I de la meiosis. Se propone realizar análisis cuantitativos de expresión en anteras de varias etapas de desarrollo, en las cuales se puede predecir la fase de la meiosis en la que se encuentran.
- Evaluar la presencia de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1* y *PRD1* en hojas, raíz e inflorescencias femeninas y masculinas mediante ensayos tipo Western con anticuerpos específicos. Esto con el fin de comprender el mecanismo de regulación del recombinosoma temprano.
- Determinar la interacción entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1* y *PRD1* utilizando la técnica de doble híbrido en levadura (Y2H, siglas en inglés) y la técnica de co-inmunoprecipitación. Esto con el objetivo de establecer las interacciones que puedan tener un efecto en la regulación del recombinosoma temprano.
- Evaluar la función de *SPO11-1*, *SPO11-2*, *MTOPVIB1* y *PRD1* por medio de ensayos de inmunolocalización en meiocitos de anteras durante las distintas etapas de la profase I.

- Clonar la secuencia codificante (CDS) de MTOPVIB1 para corroborar que corresponda con la anotación del transcrito canónico y con la secuencia de aminoácidos de la proteína que fue analizada en este trabajo. Así como realizar un análisis de interacción proteína-proteína entre MTOPVIB1 y las proteínas SPO11; y realizar un análisis donde se evalúe la función del motivo b4 en la interacción con las proteínas SPO11.

10. REFERENCIAS

Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). The cell cycle. En *Molecular Biology of the Cell* (6th ed., pp. 1004-1010). New York, US: Garland Science.

Andorf, C. M., Cannon, E. K., Portwood, J. L., Gardiner, J. M., Harper, L. C., Schaeffer, M. L., ... & Huerta, M. (2015). MaizeGDB update: new tools, data and interface for the maize model organism database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1195-D1201.

Bellani, M. A., Boateng, K. A., McLeod, D., & Camerini-Otero, R. D. (2010). The expression profile of the major mouse SPO11 isoforms indicates that SPO11 β introduces double strand breaks and suggests that SPO11 α has an additional role in prophase in both spermatocytes and oocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 30(18), 4391-4403.

Berchowitz, L. E., Francis, K. E., Bey, A. L., & Copenhaver, G. P. (2007). The role of *AtMUS81* in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genetics*, 3(8), 1355-1364.

Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A., & Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, 386, 414-417.

Bergerat, A., Gadelle, D., & Forterre, P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eukaryal features. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27663-27669.

Borde, V., & de Massy, B. (2013). Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis: setting up communication between DNA and the chromosome structure. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(2), 147-155.

Brown, M. S., & Bishop, D. K. (2014). DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a016659.

Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 369-413.

Cheng, Z., Otto, G. M., Powers, E. N., Keskin, A., Mertins, P., Carr, S. A., ... & Brar, G. A. (2018). Pervasive, coordinated protein-level changes driven by transcript isoform switching during meiosis. *Cell*, 172(5), 910-923.

Chiba, Y., & Green, P. J. (2009). mRNA degradation machinery in plants. *Journal of Plant Biology*, 52(2), 114-124.

Choi, K., Zhao, X., Tock, A. J., Lambing, C., Underwood, C. J., Hardcastle, T. J., ... & Ziolkowski, P. A. (2018). Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in *Arabidopsis thaliana* transposons and gene regulatory regions. *Genome Research*, 28(4), 532-546.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., & Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*, 282(5389), 699-705.

Corbett, K. D., & Berger, J. M. (2003). Structure of the topoisomerase VI-B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution. *The EMBO Journal*, 22(1), 151-163.

Corbett, K. D., & Berger, J. M. (2004). Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33(1), 95-118.

De Muyt, A., Pereira, L., Vezon, D., Chelysheva, L., Gendrot, G., Chambon, A., ... & Grelon, M. (2009). A high throughput genetic screen identifies new early meiotic recombination functions in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 5(9), e1000654.

De Muyt, A., Vezon, D., Gendrot, G., Gallois, J. L., Stevens, R., & Grelon, M. (2007). AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 26(18), 4126-4137.

Dernburg, A. F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., & Villeneuve, A. M. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell*, 94(3), 387-398.

Diaz, R. L., Alcid, A. D., Berger, J. M., & Keeney, S. (2002). Identification of residues in yeast Spo11p critical for meiotic DNA double-strand break formation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1106-1115.

Egel, R. (2007). Meiotic crossing-over and disjunction: overt and hidden layers of description and control. En *Recombination and Meiosis* (pp. 1-30). Berlin, Heidelberg: Springer.

Esposito, M. S., & Esposito, R. E. (1969). The genetic control of sporulation in *Saccharomyces* I. The isolation of temperature-sensitive sporulation-deficient mutants. *Genetics*, 61(1), 79-89.

Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 126-139.

Fu, M., Wang, C., Xue, F., Higgins, J., Chen, M., Zhang, D., & Liang, W. (2016). The DNA topoisomerase VI-B Subunit OsMTOPIVIB is essential for meiotic recombination initiation in Rice. *Molecular Plant*, 9(11), 1539-1541.

Graille, M., Cladière, L., Durand, D., Lecointe, F., Gadelle, D., Quevillon-Cheruel, S., ... & Van Tilbeurgh, H. (2008). Crystal structure of an intact type II DNA topoisomerase: insights into DNA transfer mechanisms. *Structure*, 16(3), 360-370.

Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., & Pelletier, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *The EMBO Journal*, 20(3), 589-600.

Hartung, F., & Puchta, H. (2000). Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 28(7), 1548-1554.

Hartung, F., & Puchta, H. (2001). Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene*, 271(1), 81-86.

Hartung, F., Angelis, K. J., Meister, A., Schubert, I., Melzer, M., & Puchta, H. (2002a). An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Current Biology*, 12(20), 1787-1791.

Hartung, F., Blattner, F. R., & Puchta, H. (2002b). Intron gain and loss in the evolution of the conserved eukaryotic recombination machinery. *Nucleic Acids Research*, 30(23), 5175-5181.

He, Y., Wang, M., Dukowic-Schulze, S., Zhou, A., Tiang, C. L., Shilo, S., ... & Buckler, E. S. (2017). Genomic features shaping the landscape of meiotic

double-strand-break hotspots in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(46), 12231-12236.

Higgins, J. D., Buckling, E. F., Franklin, F. C. H., & Jones, G. H. (2008). Expression and functional analysis of *AtMUS81* in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *The Plant Journal*, 54(1), 152-162.

Jain, M., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2006). Overexpression of putative topoisomerase 6 genes from rice confers stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *The FEBS Journal*, 273(23), 5245-5260.

Ji, J., Tang, D., Shen, Y., Xue, Z., Wang, H., Shi, W., ... & Cheng, Z. (2016). P31comet, a member of the synaptonemal complex, participates in meiotic DSB formation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(38), 10577-10582.

Jiao, Y., Peluso, P., Shi, J., Liang, T., Stitzer, M. C., Wang, B., ... & Guill, K. (2017). Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature*, 546(7659), 524.

Kauppi, L., Barchi, M., Baudat, F., Romanienko, P. J., Keeney, S., & Jasin, M. (2011). Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science*, 331(6019), 916-920.

Keeney, S. (2007). Spo11 and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. En *Recombination and Meiosis* (pp. 81-123). Berlin, Heidelberg: Springer.

Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, 88(3), 375-384.

Keeney, S., Lange, J., & Mohibullah, N. (2014). Self-organization of meiotic recombination initiation: general principles and molecular pathways. *Annual Review of Genetics*, 48, 187-214.

Kertesz, S., Kerenyi, Z., Merai, Z., Bartos, I., Palfy, T., Barta, E., & Silhavy, D. (2006). Both introns and long 3'-UTRs operate as *cis*-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6147-6157.

Klein, U., Esposito, G., Baudat, F., Keeney, S., & Jasin, M. (2002). Mice deficient for the type II topoisomerase-like DNA transesterase Spo11 show normal immunoglobulin somatic hypermutation and class switching. *European Journal of Immunology*, 32(2), 316-321.

Lam, I., & Keeney, S. (2015). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016634.

Lambing, C., Franklin, F. C. H., & Wang, C. J. R. (2017). Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. *Plant Physiology*, 173(3), 1530-1542.

Libby, B. J., De La Fuente, R., O'Brien, M. J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., ... & Schimenti, J. C. (2002). The mouse meiotic mutation *Mei1* disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Developmental Biology*, 242(2), 174-187.

Libby, B. J., Reinholdt, L. G., & Schimenti, J. C. (2003). Positional cloning and characterization of *Mei1*, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15706-15711.

Lin, Y., & Smith, G. R. (1994). Transient, meiosis-induced expression of the *rec6* and *rec12* genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 136(3), 769-779.

Ma, J., Duncan, D., Morrow, D. J., Fernandes, J., & Walbot, V. (2007). Transcriptome profiling of maize anthers using genetic ablation to analyze pre-meiotic and tapetal cell types. *The Plant Journal*, 50(4), 637-648.

Maleki, S., Neale, M. J., Arora, C., Henderson, K. A., & Keeney, S. (2007). Interactions between *Mei4*, *Rec114*, and other proteins required for meiotic DNA double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*, 116(5), 471-486.

Malik, S. B., Ramesh, M. A., Hulstrand, A. M., & Logsdon Jr, J. M. (2007). Protist homologs of the meiotic *Spo11* gene and topoisomerase VI reveal an evolutionary history of gene duplication and lineage-specific loss. *Molecular Biology and Evolution*, 24(12), 2827-2841.

Mata, J., Lyne, R., Burns, G., & Bähler, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature genetics*, 32(1), 143.

Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2004). RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. *Agilent application note, publication*, 1, 1-8.

Nan, G. L., Ronceret, A., Wang, R. C., Fernandes, J. F., Cande, W. Z., & Walbot, V. (2011). Global transcriptome analysis of two *amei1* alleles in maize anthers: defining steps in meiotic entry and progression through prophase I. *BMC Plant Biology*, 11(1), 120.

Nelms, B. (2018). Mapping the archesporial cell to meiocyte progression using single-cell RNA-Seq. *60th Annual Maize Genetics Conference* (p. 46).

Nelms, B., & Walbot, V. (2019). Defining the developmental program leading to meiosis in maize. *Science*, 364(6435), 52-56.

Nichols, M. D., DeAngelis, K., Keck, J. L., & Berger, J. M. (1999). Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO Journal*, 18(21), 6177-6188.

Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H. G., Tischfield, S. E., ... & Hochwagen, A. (2011). A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell*, 144(5), 719-731.

Panizza, S., Mendoza, M. A., Berlinger, M., Huang, L., Nicolas, A., Shirahige, K., & Klein, F. (2011). Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. *Cell*, 146(3), 372-383.

Pâques, F., & Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(2), 349-404.

Pérez-Novo, C. A., Claeys, C., Speleman, F., Van Cauwenberge, P., Bachert, C., & Vandesompele, J. (2005). Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques*, 39(1), 52-56.

Petronczki, M., Siomos, M. F., & Nasmyth, K. (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112(4), 423-440.

Ramesh, M. A., Malik, S. B., & Logsdon Jr, J. M. (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes: evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology*, 15(2), 185-191.

Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Guichard, V., ... & de Massy, B. (2016a). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science*, 351(6276), 943-949.

Robert, T., Vrielynck, N., Mézard, C., de Massy, B., & Grelon, M. (2016b). A new light on the meiotic DSB catalytic complex. In *Seminars in cell & Developmental Biology* (Vol. 54, pp. 165-176). Academic Press.

Romanienko, P. J., & Camerini-Otero, R. D. (1999). Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics*, 61(2), 156-169.

Romanienko, P. J., & Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell*, 6(5), 975-987.

Ronceret, A., Golubovskaya, I., Ku, J., Lee, D., Timofejeva, L., Gomez-Angoa, A. K., ... Wang, R. C. (2018). The dynamic association of SPO11-1 with conformational changes of meiotic axial elements in maize. *En prensa*,

Sasidharan, R., & Gerstein, M. (2008). Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature*, 453(7196), 729.

Skibbe, D. S., Fernandes, J. F., & Walbot, V. (2012). Mu killer-mediated and spontaneous silencing of *Zea mays* mutator family transposable elements define distinctive paths of epigenetic inactivation. *Frontiers in Plant Science*, 3, 212.

Smagulova, F., Gregoret, I. V., Brick, K., Khil, P., Camerini-Otero, R. D., & Petukhova, G. V. (2011). Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature*, 472(7343), 375.

Sprink, T., & Hartung, F. (2014). The splicing fate of plant SPO11 genes. *Frontiers in Plant Science*, 5, 214.

Stacey, N. J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., ... & Sugimoto-Shirasu, K. (2006). *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *The Plant Journal*, 48(2), 206-216.

Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N. J., Corsar, J., Roberts, K., & McCann, M. C. (2002). DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 12(20), 1782-1786.

Tang, Y., Yin, Z., Zeng, Y., Zhang, Q., Chen, L., He, Y., ... & Zhang, X. (2017). MTOPVIB interacts with AtPRD1 and plays important roles in formation of meiotic DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 7(1), 10007.

Tello-Ruiz, M. K., Stein, J., Wei, S., Preece, J., Olson, A., Naithani, S., ... & Kumari, S. (2015). Gramene 2016: comparative plant genomics and pathway resources. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1133-D1140.

Tessé, S., Bourbon, H. M., Debuchy, R., Budin, K., Dubois, E., Liangran, Z., ... & Espagne, E. (2017). Asy2/Mer2: an evolutionarily conserved mediator of meiotic recombination, pairing, and global chromosome compaction. *Genes & Development*, 31(18), 1880-1893.

Scientific, T. F. 260/280 and 260/230 Ratios. 2008: 2.

Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., ... & Grelon, M. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science*, 351(6276), 939-943.

Walker, J., Gao, H., Zhang, J., Aldridge, B., Vickers, M., Higgins, J. D., & Feng, X. (2018). Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, 50(1), 130.

Walley, J. W., Sartor, R. C., Shen, Z., Schmitz, R. J., Wu, K. J., Urich, M. A., ... & Briggs, S. P. (2016). Integration of omic networks in a developmental atlas of maize. *Science*, 353(6301), 814-818.

Wang, J. C. (1996). DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 635-692.

Wang, Y., Cheng, Z., & Ma, H. (2013). Meiosis: interactions between homologous chromosomes. *Cell Biology*, 1-34.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008). Homologous Recombination at the Molecular Level. *The Molecular Biology of the Gen* (seventh, pp. 341–176). Pearson.

Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3), 474-481.

Xiao, J., Sekhwal, M., Li, P., Ragupathy, R., Cloutier, S., Wang, X., & You, F. (2016). Pseudogenes and their genome-wide prediction in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1991.

Xue, Z., Li, Y., Zhang, L., Shi, W., Zhang, C., Feng, M., ... & Cheng, Z. (2016). OsMTOPVIB promotes meiotic DNA double-strand break formation in rice. *Molecular Plant*, 9(11), 1535-1538.

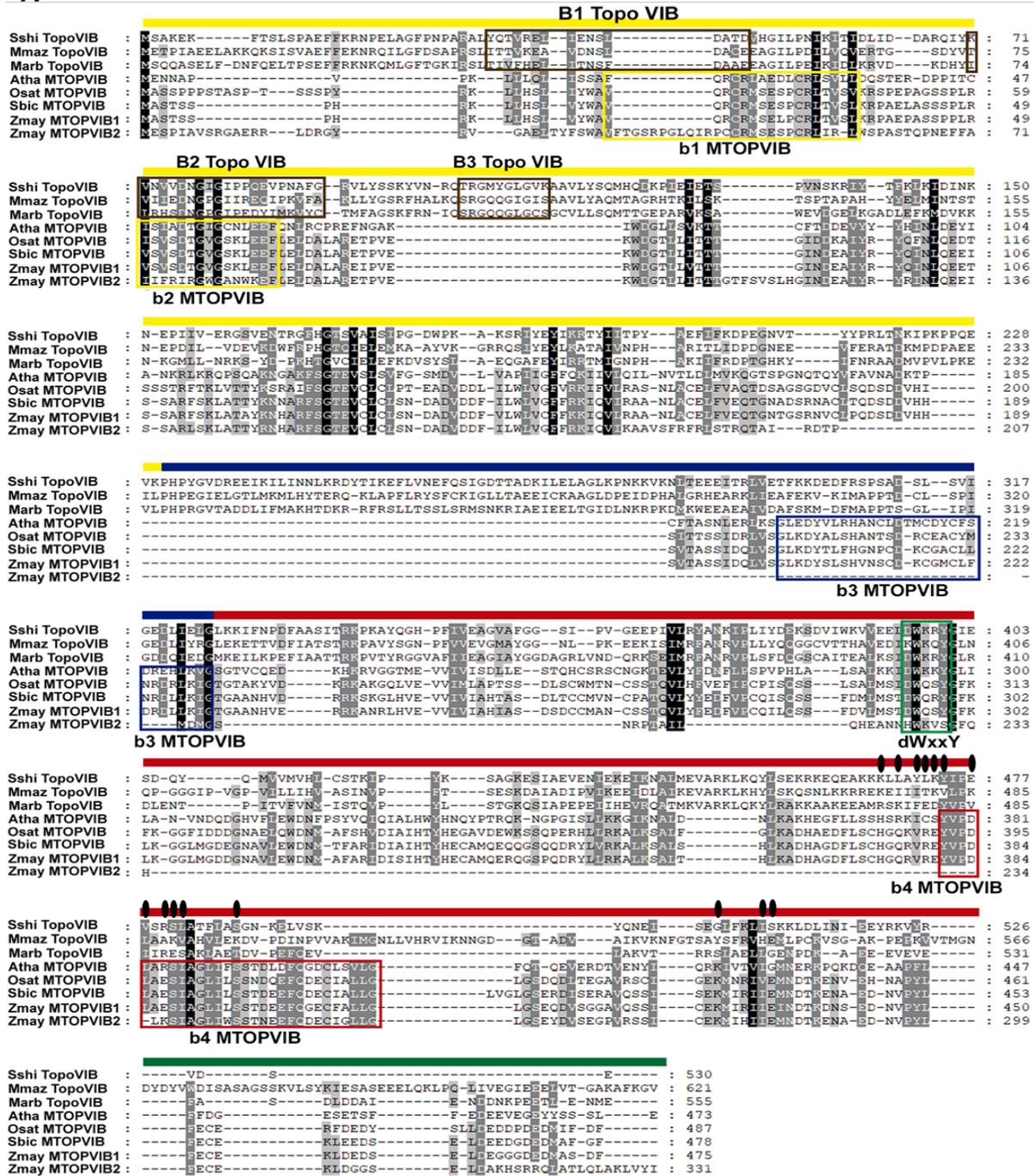
Yin, Y., Cheong, H., Friedrichsen, D., Zhao, Y., Hu, J., Mora-Garcia, S., & Chory, J. (2002). A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 10191-10196.

Zickler, D., & Kleckner, N. (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), a016626.

11. ANEXOS

11.1 Análisis bioinformáticos de las proteínas MTOPVIB1 y MTOPVIB2.

A



B

	Ssh	Mmaz	Marb	Atha	Osat	Sbic	Zmay_1	Zmay_2
Ssh_TopVIB	100							
Mmaz_TopVIB	28.2	100						
Marb_TopVIB	30.8	30.7	100					
Atha_MTOPVIB	10.6	9.6	11.8	100				
Osat_MTOPVIB	11.5	9.6	11	35.7	100			
Sbic_MTOPVIB	12.6	10.5	11.1	34.9	70.8	100		
Zmay_MTOPVIB1	11.8	10.2	11.2	36	69.4	86.8	100	
Zmay_MTOPVIB2	5.8	5.5	5.6	17.2	30.5	36.2	34.3	100

Figura A1. Alineamiento entre proteínas MTOPVIB de plantas y proteínas Topo VIB de arqueas. A) Las proteínas de este grupo presentan dominios conservados: el dominio GHKL (barra amarilla), el dominio SmD de plantas o H2T2 de arqueas (barra azul), el dominio transductor (barra roja) y un dominio extra en el extremo carboxilo terminal (barra verde). Dentro de los dominios se identifican motivos conservados que definen a dichos dominios proteínicos. Los motivos b1, b2, b3, y b4 son característicos de las proteínas MTOPVIB de plantas. Los motivos B1, B2 y B3 son característicos de las proteínas Topo VIB de arqueas. El motivo dWxxY del dominio transductor es común para las proteínas de arqueas y plantas. Los círculos negros señalan a los aminoácidos involucrados en la interacción entre las subunidades A y B del complejo de la topoisomerasa VI en la arquea *Sulfolobus shibatae* (Sshi). El alineamiento fue realizado en el servidor T-COFFEE y visualizado en el programa GeneDoc. Sshi: *S. shibatae*, Mmaz: *Methanosarcina mazei*, Marb: *Methanobrevibacter arboriphilus*, Atha: *Arabidopsis thaliana*, Osat: *O. sativa*, Sbic: *Sorghum bicolor*, Zmay: *Zea mays*, **B)** La tabla muestra los valores del porcentaje de identidad entre las proteínas incluidas en el alineamiento.

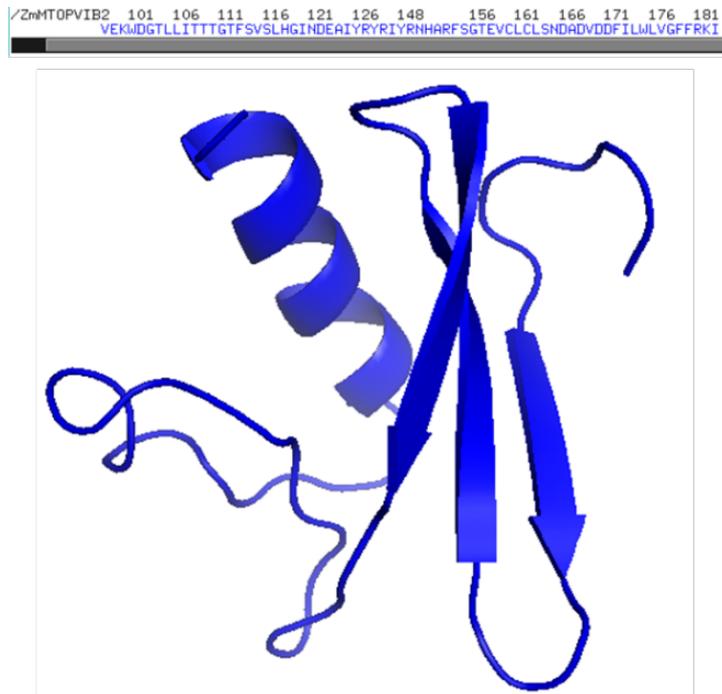


Figura A2. Modelo tridimensional de la proteína MTOPVIB2. La proteína ZnMTOPVIB2 (331aa) se modeló en el servidor PHYRE 2 y se visualizó en el programa PyMOL.

A. ZmMTOPIVIB1

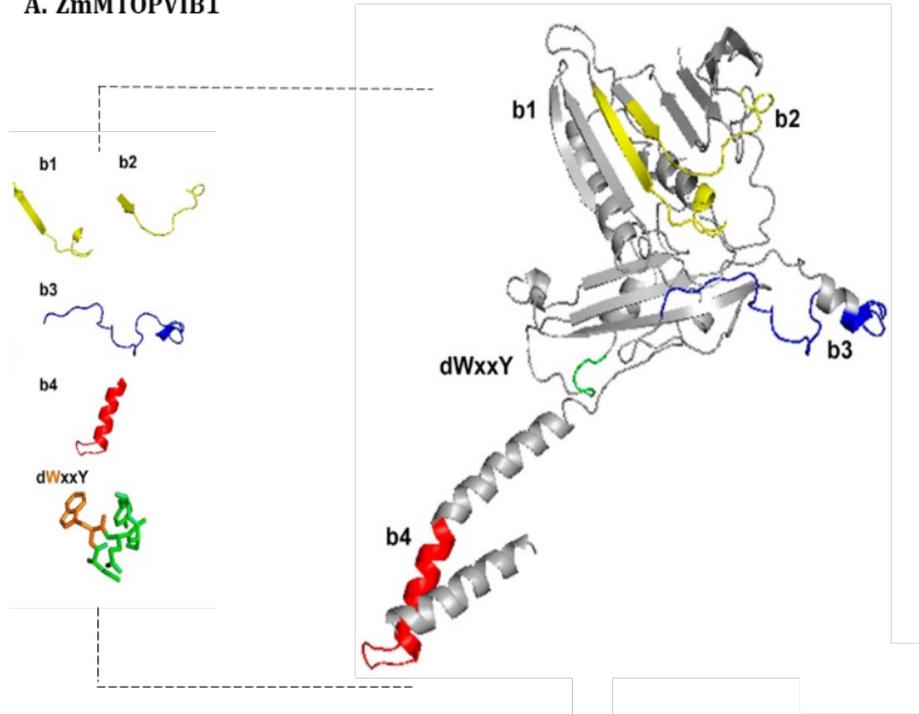


Figura A3. Modelo tridimensional de MTOPIVIB1 y la localización de los motivos conservados. La proteína se modeló en el servidor PHYRE 2 y se visualizó en el programa PyMOL, en donde se generaron las imágenes. En amarillo se muestran los motivos b1 y b2, en azul el motivo b3, en rojo el motivo b4 y en verde el motivo dWxxY.

11.1.2 RT-PCR del transcrito *MTOPIVIB2*.

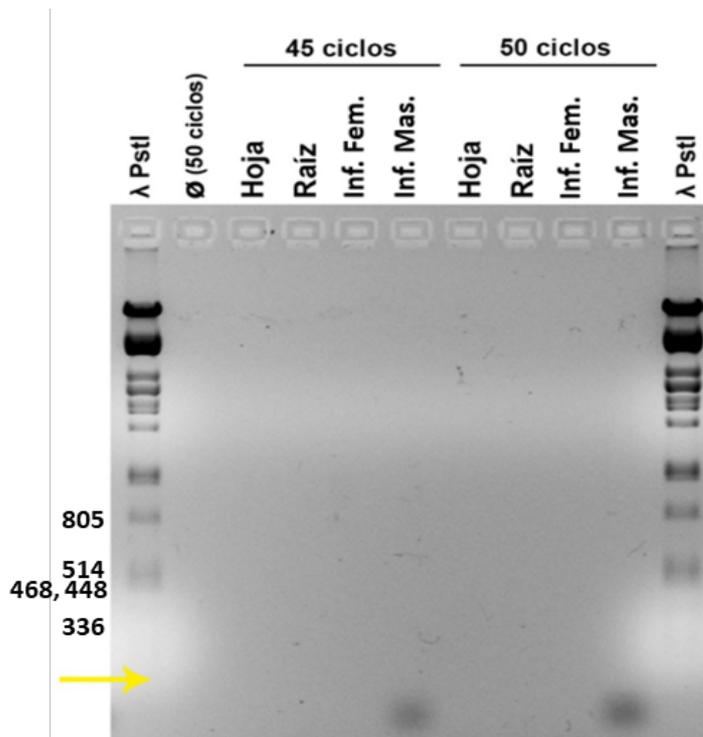


Figura A4. Ensayo de RT-PCR en cuatro órganos de maíz para *MTOPVIB2*. Se realizó un programa de PCR con 45 y 50 ciclos de amplificación en cDNA de cuatro órganos de maíz, en los cuales el transcrito no se detectó.

11.3 Anotación de *SPO11*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOFVIB1*, *MTOFVIB2* y *PRD1*.

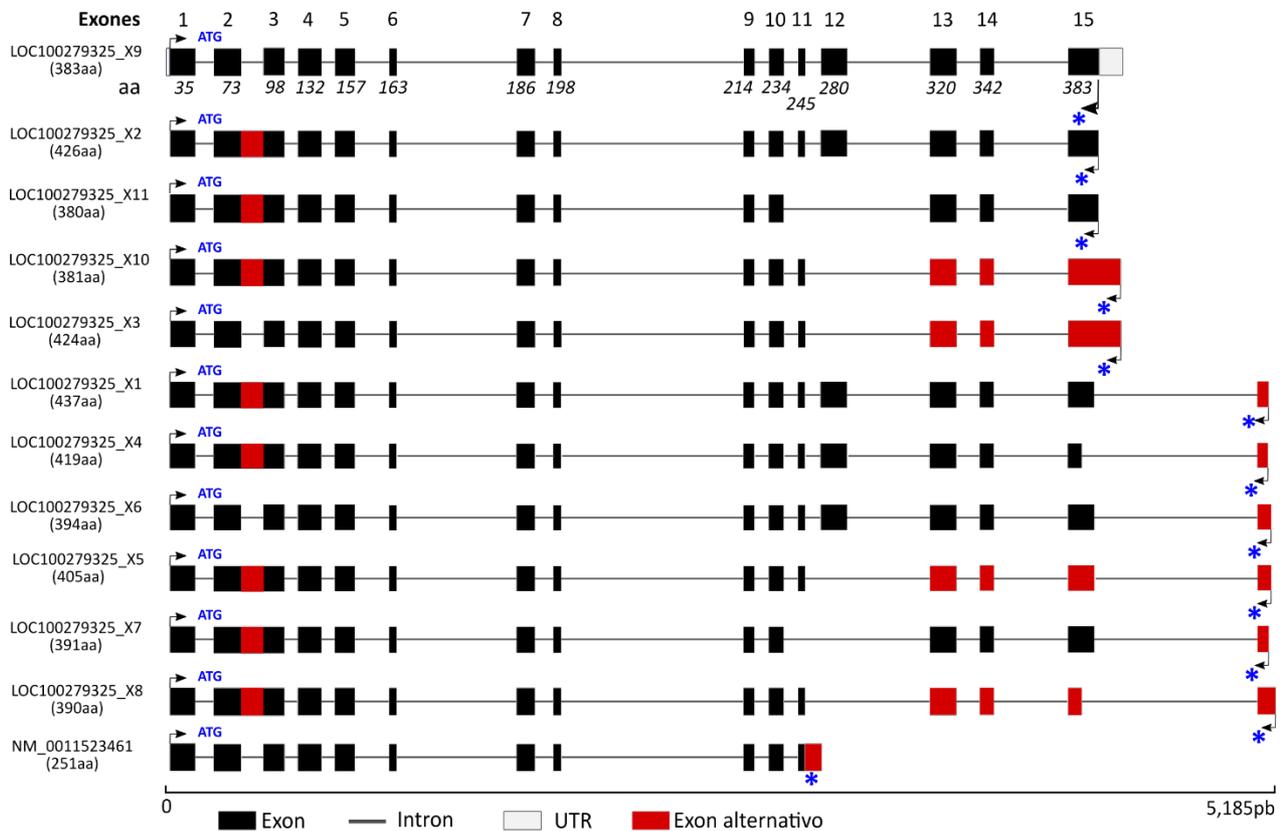


Figura A5. Modelos de la organización de los transcritos de *SPO11-1* descritos en la versión cuatro del genoma. Se analizaron los transcritos predichos para la versión cuatro del genoma de maíz contenidos en la base de datos NCBI (LOC100279325). El transcrito LOC100279325_X9 corresponde al transcrito canónico y codifica para una proteína de 383 aa, el transcrito se nombró como *SPO11-1A*, el transcrito LOC100279325_X2 se nombró como *SPO11-1B*; los aminoácidos están distribuidos en quince exones, el último número que forma parte de cada exón se muestra escrito debajo del mismo. En los rectángulos negros se muestran los exones, en líneas los intrones, en rectángulos grises las secuencias UTRs y con rectángulos rojos se muestran exones alternativos, los cuales codifican para una serie de aminoácidos diferentes a los del transcrito canónico; con las flechas se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (*) de la traducción.

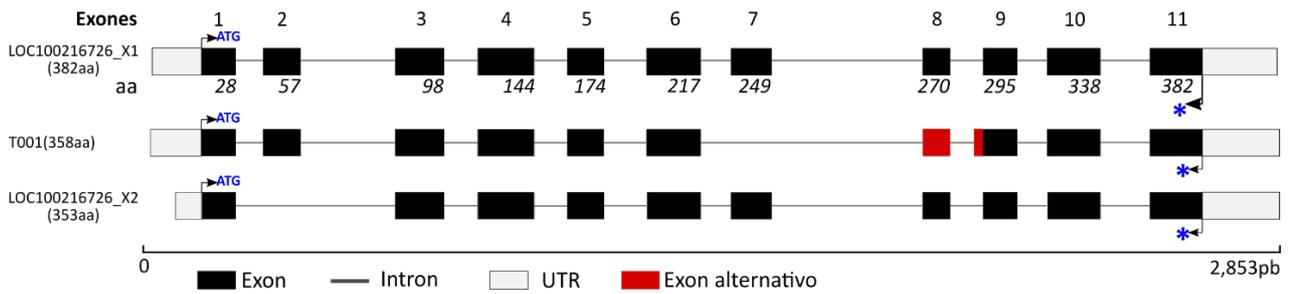


Figura A6. Modelos de la organización de los transcritos de *SPO11-2* descritos en la versión cuatro del genoma. Se analizaron los transcritos predichos para la versión cuatro del genoma de maíz contenidos en la base de datos Gramene (Zm00001d049550) y NCBI (LOC100216726). El transcrito LOC100216726_X1 corresponde al transcrito canónico y codifica para una proteína de 382 aa la cual presenta un mayor grado de similitud con proteínas homólogas; los aminoácidos están distribuidos en once exones, el último número que forma parte de cada exón se muestra escrito debajo del mismo. En los rectángulos negros se muestran los exones, en líneas los intrones, en rectángulos grises las secuencias UTRs y con rectángulos rojos se muestran exones alternativos, los cuales codifican para una serie de aminoácidos diferentes a los del transcrito canónico; con las flechas se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (*) de la traducción.

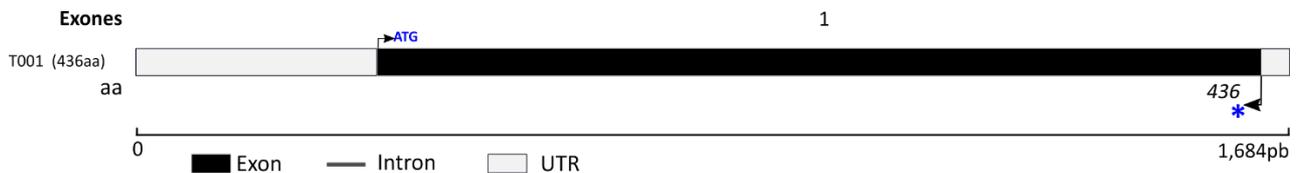


Figura A7. Modelos de la organización de los transcritos de *SPO11-3* descrito en la versión cuatro del genoma. Se analizaron los transcritos predichos para la versión cuatro del genoma de maíz contenidos en la base de datos MaizeGDB (GRMZM2G052581) y Gramene (Zm00001d028705). En las bases de datos solamente se encuentra la información para un transcrito, el cual se designó como transcrito canónico (T001), el cual codifica para una proteína de 436 aa; los aminoácidos están ubicados en un solo exón. En los rectángulos negros se muestran los exones, en líneas los intrones, en rectángulos grises las secuencias UTRs, obtenidas de la versión 3 del genoma; con las flechas se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (*) de la traducción.

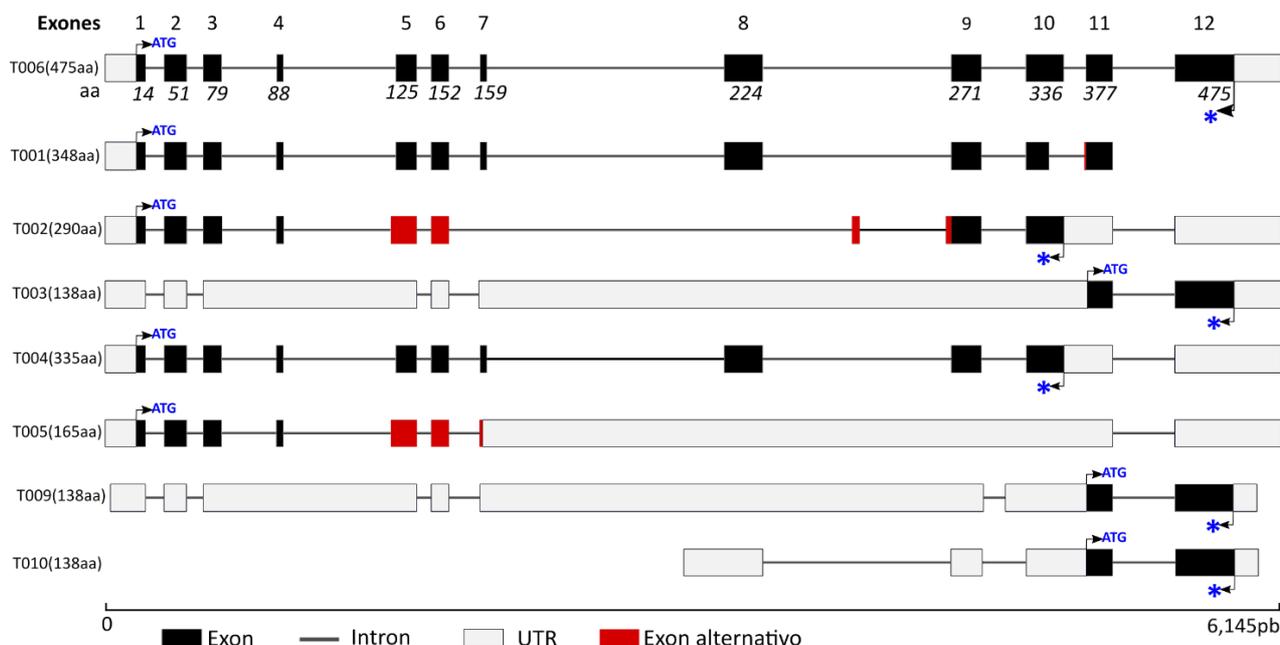


Figura A8. Modelos de la organización de los transcritos de *MTOPVIB1* descritos en la versión cuatro del genoma. Se analizaron los transcritos predichos para la versión cuatro del genoma de maíz contenidos en la base de datos MaizeGDB (GRMZM2G439198) y Gramene (Zm00001d014728). El transcrito T006 corresponde al transcrito canónico y codifica para una proteína de 475 aa la cual presenta un mayor grado de similitud con proteínas homólogas; los aminoácidos están distribuidos en doce exones, el último número que forma parte de cada exón se muestra escrito debajo del mismo. En los rectángulos negros se muestran los exones, en líneas los intrones, en rectángulos grises las secuencias UTRs y con rectángulos rojos se muestran exones alternativos, los cuales codifican para una serie de aminoácidos diferentes a los del transcrito canónico; con las flechas se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (*) de la traducción.

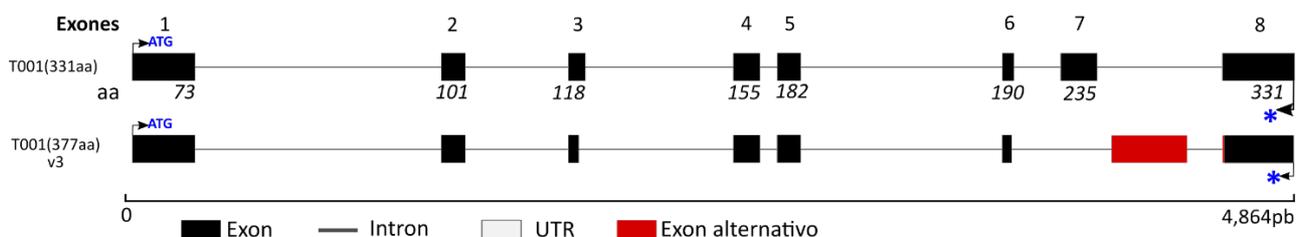


Figura A9. Modelos de la organización de los transcritos de *mMTOPVIB2* descritos en la versión cuatro y la versión tres del genoma. Se analizaron los transcritos predichos para la versión cuatro y para la versión tres del genoma de maíz contenidos en la base de datos MaizeGDB (AC200287.4_FG006) y Gramene (Zm00001d036446). El transcrito T001 corresponde al transcrito canónico y codifica para una proteína de 331 aa, la información de este transcrito viene de la versión 4; los aminoácidos están distribuidos en ocho exones, el último número que forma parte de cada exón se muestra escrito debajo del mismo. En los rectángulos negros se muestran los exones, en líneas los intrones, en rectángulos grises las secuencias UTRs y con rectángulos rojos se muestran exones alternativos, los cuales codifican para una serie de aminoácidos diferentes a los del transcrito canónico; con las flechas se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (*) de la traducción.

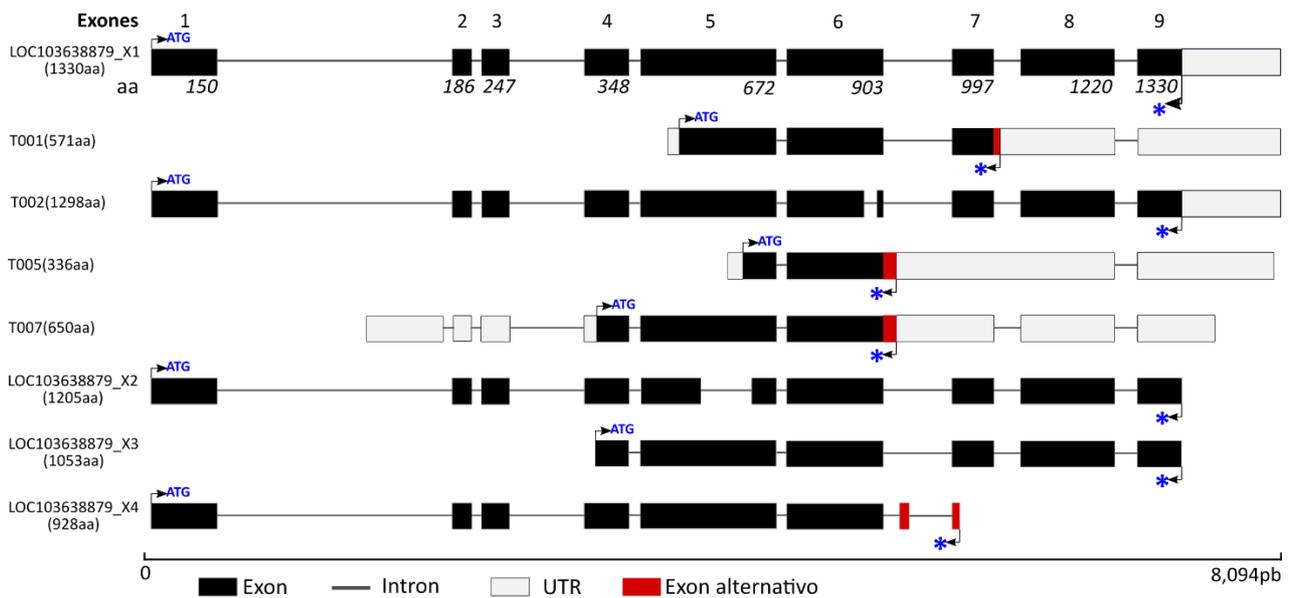


Figura A10. Modelos de la organización de los transcritos de *PRD1* descritos en la versión cuatro del genoma. Se analizaron los transcritos predichos para la versión cuatro del genoma de maíz contenidos en la base de datos MaizeGDB (GRMZM2G439198), Gramene (Zm00001d014728) y NCBI (LOC103638879). El transcrito LOC103638879_X1 corresponde al transcrito canónico y codifica para una proteína de 1330 aa la cual presenta un mayor grado de similitud con proteínas homólogas; los aminoácidos están distribuidos en doce exones, el último número que forma parte de cada exon se muestra escrito debajo del mismo. En los rectángulos negros se muestran los exones, en líneas los intrones, en rectángulos grises las secuencias UTRs y con rectángulos rojos se muestran exones alternativos, los cuales codifican para una serie de aminoácidos diferentes a los del transcrito canónico; con las flechas se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (*) de la traducción.

11.4 Réplicas del ensayo de RT-PCR.

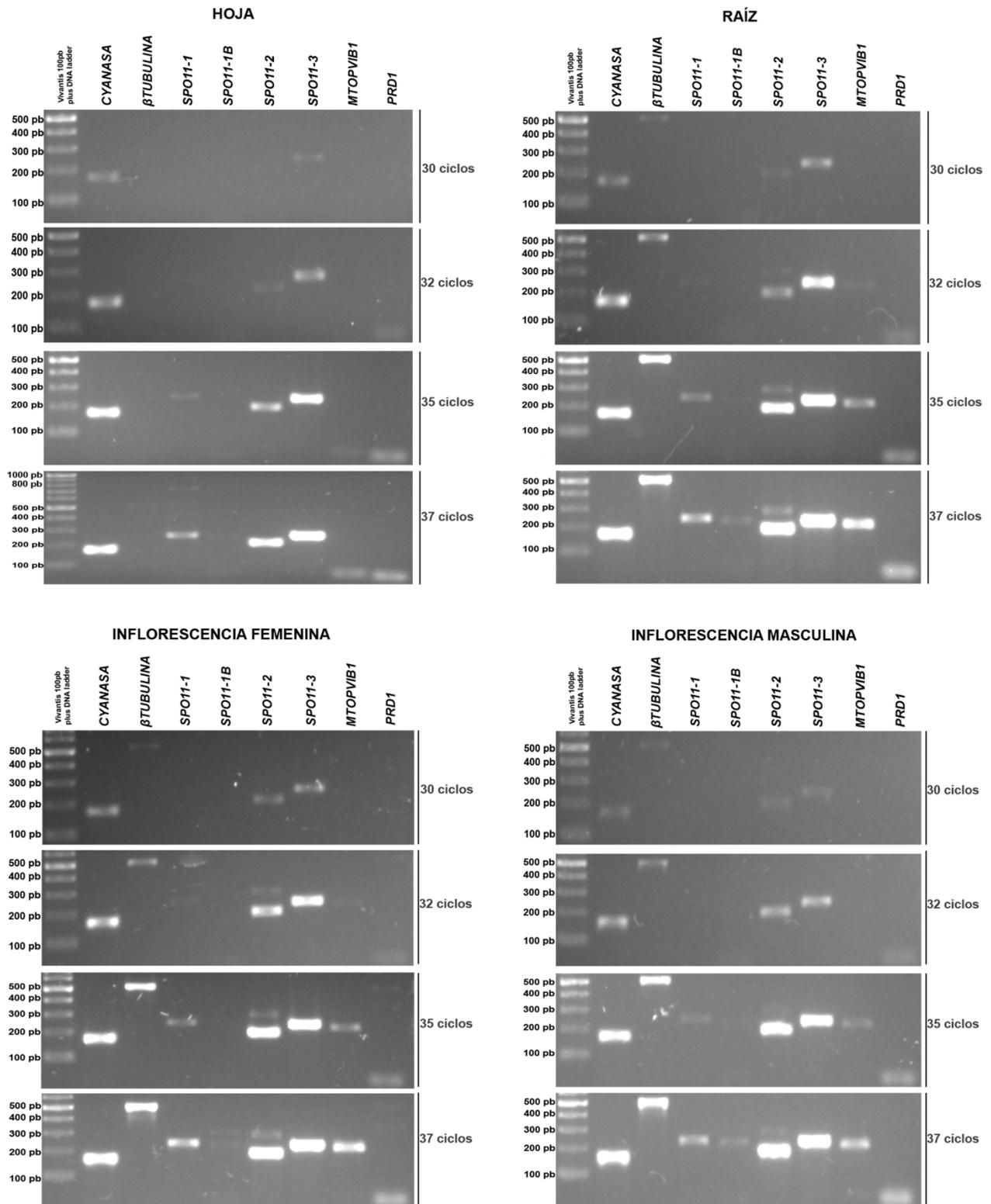


Figura A11. Análisis de RT-PCR a partir de RNA de diferentes órganos de la línea B73 de maíz. Los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1* y *PRD1* se amplificaron con una variación en el número de ciclos en la reacción de PCR. Los transcritos *CYANASA* y β *TUBULINA6* se utilizaron como referencia. En la figura se muestran los resultados obtenidos en el primer experimento, realizado a partir de la primera extracción de RNA.

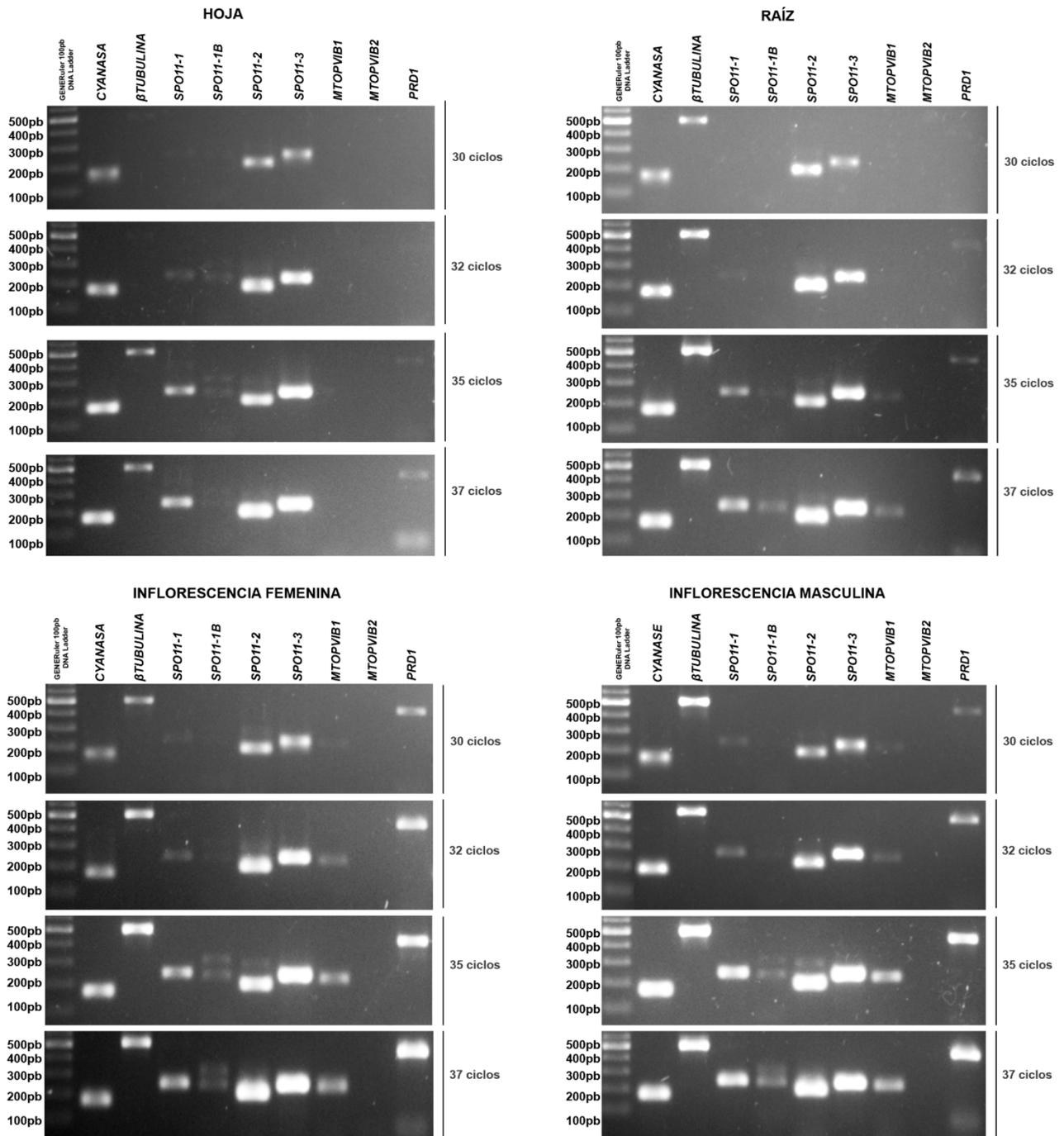


Figura A12. Análisis de RT-PCR a partir de RNA de diferentes órganos de la línea B73 de maíz. Los transcritos *SPO11-1*, *SPO11-2*, *SPO11-3*, *MTOPVIB1* y *PRD1* se amplificaron con una variación en el número de ciclos en la reacción de PCR. Los transcritos *CYANASA* y *βTUBULINA6* se utilizaron como referencia. En la figura se muestran los resultados obtenidos en el primer experimento, realizado a partir de la primera extracción de RNA.

11.4 Análisis de datos para el ensayo de RT-qPCR.

A

RB/RT	CYANASE				SPO11-1				SPO11-1B				SPO11-2		
	Cq1	Cq2	Cq3	PROMEDIO	Cq1	Cq2	Cq3	PROMEDIO	Cq1	Cq2	Cq3	PROMEDIO	Cq1	Cq2	PROMEDIO
H1	22.789	22.383	22.758	22.643	27.749	28.171	25.899	27.273	34.302	34.716	34.576	34.531	26.903	27.112	27.008
H2	22.118	21.47	21.983	21.857	26.570	27.652	26.629	26.950	33.833	34.931	35.001	34.588	26.644	26.577	26.611
H3	22.677	22.83	23.574	23.027	27.173	27.607	27.825	27.535	35.440	35.956	34.574	35.323	27.230	27.311	27.271
R1	23.338	23.208	23.674	23.407	28.316	28.488	27.645	28.150	35.291	34.831	35.651	35.258	27.255	27.411	27.333
R2	23.583	23.142	23.168	23.298	27.614	28.287	28.002	27.968	34.524	35.219	34.932	34.892	28.899	29.212	29.056
R3	21.787	22.222	22.816	22.275	26.725	26.982	26.708	26.805	33.893	34.536	34.487	34.305	26.724	26.671	26.698
IF1	23.527	24.304	24.822	24.218	25.032	25.837	25.672	25.514	32.157	31.921	32.040	32.039	24.540	24.640	24.590
IF2	22.541	22.796	23.115	22.817	24.694	24.943	25.236	24.958	31.350	31.890	31.356	31.532	23.925	24.032	23.979
IF3	22.637	23.038	23.684	23.120	24.886	25.268	25.250	25.135	31.579	32.783	32.030	32.131	24.493	24.651	24.572
IM1	22.528	23.05	23.598	23.059	25.121	25.413	25.714	25.416	31.550	32.102	31.522	31.725	24.759	24.835	24.797
IM2	23.596	24.058	24.508	24.054	25.217	24.307	25.779	25.101	33.192	33.317	33.327	33.279	25.390	25.631	25.511
IM3	23.891	24.377	25.735	24.668	26.690	26.833	26.905	26.809	33.793	34.554	34.128	34.158	26.216	26.241	26.229
NTC	33.116	34.634	-	-	-	-	-	36.279	-	-	-	-	30.008	30.862	-
RB/RT	SPO11-3				MTOPIV1										
	Cq1	Cq2	Cq3	PROMEDIO	Cq1	Cq2	Cq3	PROMEDIO							
H1	24.617	24.496	24.060	24.391	30.598	30.956	31.818	31.124							
H2	24.661	24.466	24.486	24.538	31.019	31.017	31.390	31.142							
H3	25.061	24.820	24.642	24.841	31.367	31.817	31.937	31.707							
R1	25.704	25.700	25.518	25.641	31.102	30.909	31.698	31.236							
R2	24.038	23.973	23.670	23.894	33.991	37.681	33.357	35.010							
R3	23.726	23.631	23.632	23.663	29.714	30.117	30.736	30.189							
IF1	23.852	23.836	23.681	23.790	27.641	27.628	28.567	27.945							
IF2	23.337	23.357	23.279	23.324	25.676	25.527	26.080	25.761							
IF3	23.613	23.561	23.486	23.553	26.536	26.523	26.804	26.621							
IM1	23.936	23.977	23.812	23.908	26.343	25.978	26.556	26.292							
IM2	24.885	24.861	24.595	24.780	26.767	26.402	26.887	26.685							
IM3	26.057	26.134	25.716	25.969	27.649	27.820	28.116	27.862							
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-							

B

RB	SPO11-1 (E=1,876)		SPO11-1B (E=1,815)		SPO11-2 (E=1,871)		SPO11-3 (E=1,843)		MTOPIV1 (E=1,994)	
	$\Delta Cq(\text{INT-REF})$	$100/E^{\Delta Cq}$								
H1	4.630	5.433	11.888	0.084	4.364	6.496	1.748	34.352	8.481	0.287
H2	5.093	4.058	12.731	0.051	4.754	5.090	2.681	19.418	9.285	0.165
H3	4.508	5.865	12.296	0.066	4.244	7.006	1.814	32.987	8.680	0.250
R1	4.743	5.059	11.851	0.086	3.926	8.546	2.234	25.516	7.830	0.450
R2	4.670	5.297	11.594	0.100	5.758	2.713	0.596	69.462	11.712	0.031
R3	4.530	5.784	12.030	0.077	4.423	6.263	1.388	42.801	7.914	0.425
IF1	1.296	44.248	7.822	0.944	0.372	79.195	-0.428	129.911	3.728	7.634
IF2	2.140	26.013	8.715	0.555	1.161	48.314	0.507	73.346	2.944	13.113
IF3	2.015	28.147	9.011	0.465	1.452	40.259	0.434	76.710	3.501	8.924
IM1	2.357	22.693	8.666	0.571	1.738	33.655	0.850	59.483	3.234	10.735
IM2	1.047	51.752	9.225	0.409	1.457	40.154	0.726	64.144	2.631	16.268
IM3	2.142	25.991	9.491	0.349	1.561	37.613	1.301	45.130	3.194	11.033

C

	SPO11-1		SPO11-1B		SPO11-2		SPO11-3		MTOPIV1	
	PROMEDIO RB	DESVEST								
H	5.119	0.943	0.067	0.017	6.197	0.992	28.919	8.256	0.234	0.063
R	5.380	0.370	0.087	0.012	5.840	2.939	45.926	22.139	0.302	0.235
IF	32.803	9.969	0.655	0.255	55.923	20.553	93.322	31.731	9.890	2.865
IM	33.479	15.911	0.443	0.115	37.140	3.275	56.252	9.910	12.678	3.112

Figura A13. Análisis de datos obtenidos en el ensayo de RT-qPCR de los transcritos SPO11-1, SPO11-1B, SPO11-2, SPO11-3, MTOPIV1. Se utilizaron 50 ng de cDNA de cada muestra para realizar las reacciones para el ensayo de RT-qPCR, de cada órgano analizado se hicieron tres réplicas técnicas de tres réplicas biológicas más un control negativo sin ADN molde (NTC); para SPO11-2 se realizaron únicamente dos réplicas técnicas. **A)** En la tabla se muestran los Cq's obtenidos en cada réplica técnica (RP) y en cada réplica biológica (RB), y el promedio de las réplicas técnicas; por fallas en el experimento se obtuvo amplificación en algunos controles negativos, sin embargo, debido a que los Cq's en estos casos es muy alto, se consideraron como 0. **B)** En las columnas etiquetadas como $\Delta Cq(\text{INT-REF})$, se muestran las diferencias de Cq entre el promedio de los valores para el transcrito de interés y el transcrito de referencia (CYANASA); el porcentaje de expresión de los genes de interés se calculó con la fórmula $100/E^{\Delta Cq}$, donde E corresponde al valor de eficiencia de cada par de oligonucleótidos para los genes SPO11 y ΔCq corresponde a los valores de la columna $\Delta Cq(\text{INT-REF})$. **C)** Se calculó el promedio y la desviación estándar del porcentaje de expresión con los valores de las réplicas biológicas, estos valores fueron utilizados para elaborar las gráficas.

11.6 Amplificación de los transcritos completos *SPO11-1*, *SPO11-2* y *MTOPVIB1*.

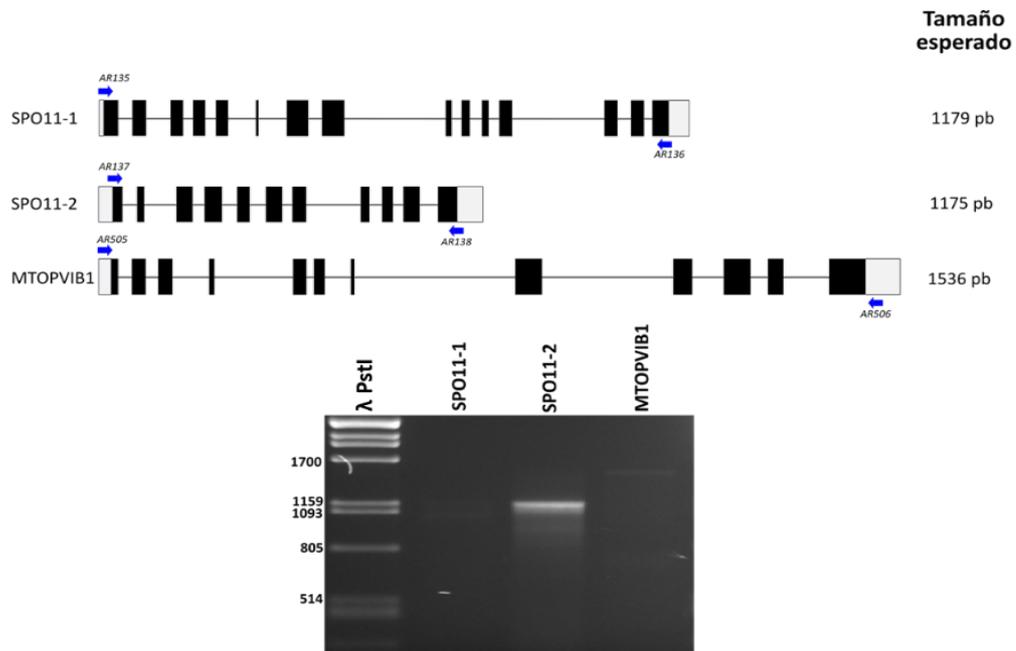


Figura A14. Amplificación de los transcritos completos *SPO11-1*, *SPO11-2* y *MTOPVIB1*. Se realizó un PCR oligonucleótidos específicos de cada gen (flechas azules) para amplificar los transcritos completos *SPO11-1*, *SPO11-2* y *MTOPVIB1* desde el codón de inicio (ATG) hasta el codón de termino. En la figura se muestran los esquemas de los genes, la posición de los oligonucleótidos utilizados, el tamaño esperado para los transcritos completos y la electroforesis de los fragmentos obtenidos, los cuales corresponden con el tamaño esperado.