



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA
VÍA TOR DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GRECIA MARÍA OLEA BADILLO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN

VOCAL: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

1er. SUPLENTE: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

2° SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARIN

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 103,
CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SUSTENTANTE:

GRECIA MARÍA OLEA BADILLO

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| 2,4-D | 2,4-Diclorofenoxi acético |
| 4E-BP | 4E binding protein |
| AKT/PKB | Protein kinase B |
| C15 | Callo inducido de E15 |
| C23 | Callo inducido de E23 |
| CM | Callo inducido de EM |
| DDP | Días después de la polinización |
| DDS | Días después de la siembra |
| E15 | Embriones inmaduros de 15 DDP |
| E23 | Embriones inmaduros de 23 DDP |
| EM | Embriones maduros de 45 DDP |
| GAP | Proteína activadora de GTPasas |
| IGF | Factor tipo insulina |
| LST8 | Lethal with Sec13 protein 8 |
| PA | Ácido fosfatídico |
| PDK1 | 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-cinasa |
| PLD1 | Fosfolipasa D1 |
| PP2A | Fosfatasa 2A |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 |
| RAPTOR | Regulatory-associated protein of mTOR |
| RICTOR | Rapamycin-insensitive companion of mTOR |
| ROP2 | Rho-like small GTPase 2 |
| S6K | Cinasa de proteína ribosomal S6 |
| S6rp | Proteína ribosomal S6 |
| TAP46 | 2A-phosphatase-associated protein 46 kDa |
| TAV | Translational transactivator/viroplasmin |
| TIR1 | Transport Inhibitor Response 1 |
| TOR | Target of Rapamycin |

| | |
|--------------|---|
| TSC | Tuberous sclerosis complex |
| ULK1 | Unc-51-like autophagy-activating kinase 1 |
| uORF | Marco de lectura abierto río arriba del ORF principal |
| VPS34 | Vacuolar protein sorting 34 |

Índice de Figuras y Tablas

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Conservación de los dominios principales de TOR en diferentes organismos eucariontes. | 12 |
| Figura 2. Procesos regulados por la vía TOR que se encuentran conservados. | 13 |
| Figura 3. Componentes identificados de la vía TOR. | 15 |
| Figura 4. La vía PI3K/Akt/mTOR en mamíferos. | 16 |
| Figura 5. Vía de señalización hipotética de TOR en plantas. | 19 |
| Figura 6. Mecanismo de activación del reinicio de la traducción de mRNAs con uORF a través de TOR. | 21 |
| Figura 7. Morfología de una semilla de maíz madura. | 28 |
| Figura 8. Línea temporal de los eventos fisiológicos y metabólicos que ocurren durante la germinación. | 29 |
| Figura 9. Regulación de la expresión de ZmTOR durante la germinación. | 33 |
| Figura 10. Patrón de expresión de ZmTOR en tejidos de maíz a diferentes estadios de desarrollo y en callo embriogénico y no embriogénico. | 34 |
| Figura 11. Vía de señalización de TOR-S6K en germinación de maíz. | 35 |
| Figura 12. Fenotipo de las semillas de maíz de la raza Chalqueño en tiempos establecidos después de la imbibición. | 46 |
| Figura 13. Integridad y concentración de RNA obtenido. | 47 |
| Figura 14. Prueba del cDNA sintetizado y ausencia de DNA (-RT) en las muestras purificadas de RNA. | 48 |
| Figura 15. Abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR en germinación de maíz. | 50 |
| Figura 16. Cambios en la abundancia de los transcritos de la vía TOR durante la germinación en maíz. | 52 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 17. | Abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR durante la inducción de callos en embriogénesis somática de maíz. | 54 |
| Tabla 1. | Oligonucleótidos empleados en los experimentos de PCR. | 39 |
| Tabla 2. | Programas de síntesis de cDNA, -RT y PCR. | 41 |
| Tabla 3 | Diluciones del cDNA estandarizado para cada gen necesarios para las reacciones de PCR punto final, así como el número de ciclos utilizados | 42 |
| Tabla 4. | Genes que fueron considerados para el análisis de expresión a distintos tiempos de germinación en eje embrionario de maíz. | 44 |
| Tabla 5. | Nivel de expresión de los genes de interés reportados en bases de datos de expresión global en maíz. | 45 |

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| 1. Agradecimientos | 9 |
| 2. Resumen | 10 |
| 3. Introducción | 11 |
| 3.1 Señalización por Target of Rapamycin (TOR)..... | 11 |
| 3.1.1 Regulación río arriba de TOR | 14 |
| 3.1.2 Complejo TOR | 21 |
| 3.1.3 Efectores río debajo de TOR | 23 |
| 3.2 El maíz | 25 |
| 3.2.1 Estructura de la semilla | 26 |
| 3.3 Germinación..... | 28 |
| 3.4 Inducción de callos embriogénicos de maíz..... | 30 |
| 4. Antecedentes..... | 32 |
| 5. Justificación | 36 |
| 6. Hipótesis | 37 |
| 7. Objetivos..... | 37 |
| 7.1 Objetivo general | 37 |
| 7.2 Objetivos particulares..... | 37 |
| 8. 4. Metodología | 38 |
| 4.1 Material vegetal..... | 38 |
| 8.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos | 38 |
| 8.3 Extracción y purificación de RNA | 40 |
| 8.4 Reacción de inverso transcripción y PCR | 40 |
| 9. Resultados..... | 43 |
| 9.1. Análisis <i>in silico</i> de genes de la vía TOR en maíz..... | 43 |
| 9.2. Estandarización del proceso de extracción del RNA de ejes embrionarios | 45 |
| 9.3. Expresión de los componentes de la vía TOR a nivel de transcrito durante la germinación y establecimiento de la plántula | 48 |
| 9.4 Análisis de la expresión de los componentes de la vía TOR durante la inducción de embriogénesis somática en maíz..... | 53 |
| 10. Discusión de resultados | 56 |
| 11. Conclusiones | 63 |

| | | |
|------|--|----|
| 12. | Perspectivas | 64 |
| 13. | Referencias | 65 |
| 14. | Anexos | 75 |
| 14.1 | Anexo 1. Análisis de expresión en EFP Browser de maíz..... | 75 |
| 14.2 | Anexo 2. Análisis del gen para LST8 en maíz..... | 76 |

1. Agradecimientos

Se agradece el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT) proyecto IN214118, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto CB-238439 y al Programa de Apoyo a Investigación y Posgrado de la Facultad de Química UNAM (PAIP) proyecto 5000-9118.

2. Resumen

El proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas, y de cualquier organismo eucarionte, conlleva una estricta regulación transcripcional y traduccional para controlar la expresión de genes específicos en respuesta a señales externas. Estos procesos dependen de funciones celulares básicas que están altamente conservadas entre los eucariontes, como la ruta de señalización mediada por la proteína *Target of Rapamycin* (TOR, inhibido por la rapamicina).

TOR es una cinasa ubicada como regulador central de varias cascadas de señalización del metabolismo celular, y tiene un papel relevante en diversos procesos dentro del crecimiento, desarrollo y percepción de señales ambientales en organismos multicelulares.

En plantas la vía TOR ha sido principalmente explorada en *Arabidopsis thaliana* y no se ha esclarecido el rol de todos sus componentes. En el caso de maíz, no se han explorado los niveles de expresión de la mayoría de los elementos de la vía, siendo que su rol primordial en etapas tempranas de crecimiento de la plántula ha sido reportado. Este proyecto abordó el análisis *in silico* de diferentes genes codificantes e integrantes de la señalización por TOR en maíz, y su expresión durante la germinación (maíz Chalqueño) e inducción de callos embriogénicos (maíz Tuxpeño). El sistema de inducción de callos embriogénicos de maíz en respuesta a elevadas concentraciones de la auxina sintética 2,4-Diclorofenoxi acético (2,4-D), se utilizó para evaluar posibles cambios en la acumulación de transcritos en respuesta a estímulos externos.

Los componentes de la ruta TOR se buscaron en el genoma de maíz disponible en Phytozome, seleccionando las secuencias con mayor homología a las reportadas para *Arabidopsis thaliana* y con rol establecido para la vía en plantas o animales. Los resultados indicaron que la abundancia de transcritos *PDK1*, *ROP2*, *ROP4*, *TOR* y *S6K* se incrementan durante la germinación, *PTEN*, *RAPTOR* y *LST8* mantienen niveles constantes y *VPS34* disminuye. La mayor parte de estos transcritos disminuye su abundancia en callos inducidos respecto a embriones inmaduros de 15 y 23 días.

3. Introducción

Las plantas son organismos sésiles que presentan complejos mecanismos de respuesta a señales externas, de desarrollo y retos ambientales. Los mecanismos de señalización en respuesta a nutrientes y energía constituyen las vías fundamentales por las que se regulan procesos tales como el crecimiento y desarrollo de cualquier organismo, esto a través de una estricta regulación transcripcional y traduccional.

Estas vías de señalización dependen de funciones celulares básicas que están altamente conservadas entre los eucariontes, se cree que cada organismo ha utilizado estas similitudes durante su proceso de evolución y las han adaptado a sus necesidades específicas, como lo han hecho las plantas. Un elemento que se ha demostrado que comparten entre sí la mayor parte de los organismos eucariontes y que tiene una gran importancia en el desarrollo de estos organismos multicelulares, es la presencia de una cinasa denominada TOR (*Target of Rapamycin*) que define una vía de señalización intracelular. Esta ruta, denominada TOR, ha sido ampliamente estudiada en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, pero se conoce poco en otras especies que son de interés agrícola, como el maíz.

3.1 Señalización por Target of Rapamycin (TOR)

TOR pertenece a la familia de cinasas PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa), que fosforilan residuos de Serina/Treonina en proteínas blanco específicas. Su estructura proteica presenta dominios conservados en organismos eucariontes incluyendo animales, levaduras y plantas (Figura 1). En el extremo N-terminal la proteína presenta repeticiones en tándem de aproximadamente 40 aminoácidos llamados HEAT (*Huntington, elongation factor 3, la subunidad de PP2A y TOR1*) cuya función es mediar las interacciones proteína-proteína y las asociaciones con membrana. El dominio FAT (FRAP-ATM-TTRAP), de aproximadamente 500 aminoácidos, junto con el dominio FATC en el extremo C-terminal modula la actividad del dominio cinasa. Este último se encuentra flanqueado por el dominio FRB (FKBP-rapamycin-binding) y FATC. (Rexin et al., 2015; Romero Aguilar, 2018; Shi et al., 2018).

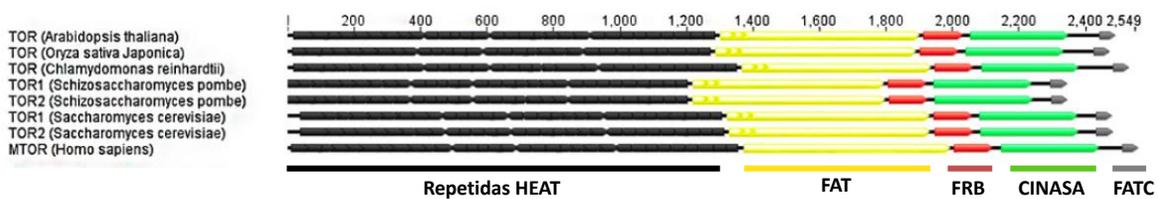


Figura 1. Conservación de los dominios principales de TOR en diferentes organismos eucariotes. Modificado de Rexin et al., 2015.

El nombre de TOR, por el acrónimo en inglés (Target Of Rapamicyin), hace referencia al antibiótico rapamicina, proveniente de *Streptomyces hygroscopicus* el cual dio paso al descubrimiento de esta cinasa cuando se realizaban pruebas en levaduras para identificar mutantes resistentes al compuesto (Dobrenel et al., 2016).

El uso de la Rapamicina como inhibidor de TOR permitió aclarar varios aspectos de la función de esta cinasa en levaduras y mamíferos, así como dilucidar la acción de los diferentes complejos que forma. Entre algunos de estos descubrimientos se encuentra la presencia de dos complejos proteicos, TORC1 y TORC2, presentes en levadura y mamíferos, de los cuales sólo TORC1 es sensible a Rapamicina. La diferencia estructural de estos complejos, radica en la presencia de una proteína reguladora llamada Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) en el complejo TORC1, mientras que en TORC2 se identificó otra proteína denominada Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) (Loewith et al., 2002; Wullschleger et al., 2006). Cada uno de estos complejos responde a estímulos diferentes por lo que, a su vez, cumplen funciones distintas en los organismos, estas diferencias son explicadas más adelante, en la sección 3.1.2.

En general, TOR integra señales de nutrientes, energía, hormonas, factores de crecimiento y condiciones ambientales para controlar la proliferación, el crecimiento y el metabolismo en diversos organismos multicelulares. Se ubica como regulador central en varias cascadas de señalización del metabolismo celular, también modula funciones como autofagia, síntesis de proteínas, ciclo celular, respuesta a estrés, entre otras. Dado que cada organismo tiene sus respuestas propias a distintos estímulos endógenos y exógenos, las funciones de TOR también se han especializado y diferenciado (Shi et al., 2018). Por ejemplo, en animales la

señalización por TOR está involucrada en la biogénesis de lisosomas y ensamblaje del proteasoma, mientras que en plantas participa en la formación de pared celular y metabolismo secundario. Entre las funciones conservadas en todos los organismos se encuentra la regulación de crecimiento y proliferación durante el desarrollo (Figura 2). En plantas, TOR es requerido para el crecimiento de raíz y hojas, en la activación de meristemos, floración, asimilación de nitrógeno, entre varias otras actividades (Shi et al., 2018).

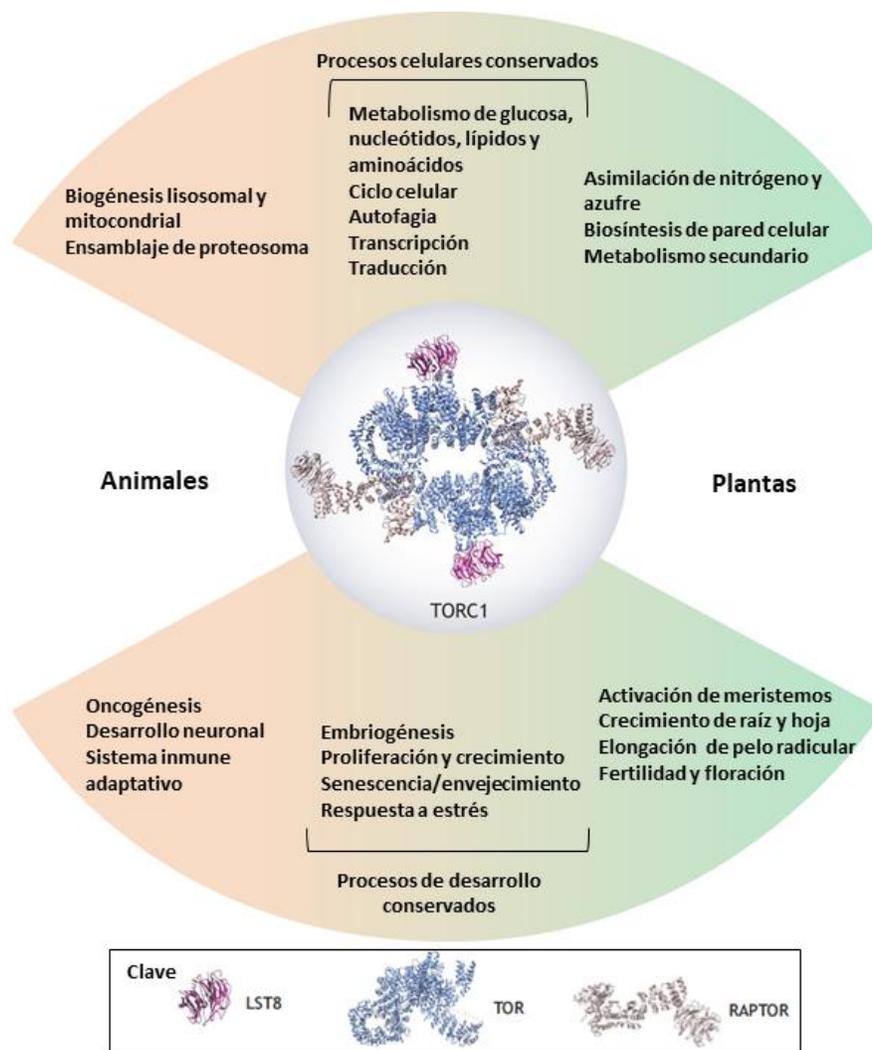


Figura 2. Procesos regulados por la vía TOR que se encuentran conservados. Aquellos procesos conservados entre plantas y animales se encuentran en el centro de la imagen, también se señalan aquellos procesos especializados sólo en plantas o animales. Modificado de Shi et al., 2018.

En mamíferos, se han caracterizado con detalle diversos componentes que forman parte de las rutas de señalización en las que TOR está involucrado. Debido a las funciones esenciales de TOR para el metabolismo, en los últimos años ha aumentado el interés por establecer la conservación o no de estos componentes en otros organismos eucariontes incluyendo las plantas.

El avance que se ha hecho en cuanto al conocimiento de esta vía específicamente en plantas aún es limitado, queda pobremente explorada la señalización y mecanismos en los que TOR participa, específicamente aquellos componentes de la vía que, homologando con la vía en mamíferos, ayudan al crecimiento y desarrollo del organismo. A continuación, se hará una descripción y comparación de los componentes en mamíferos respecto a los que se han descrito en plantas y que tienen esta función en crecimiento y desarrollo.

3.1.1 Regulación río arriba de TOR

Los organismos multicelulares tienen diferentes mecanismos para regular la respuesta a estímulos externos tales como factores de crecimiento (como el factor tipo insulina, IGF), aminoácidos, hormonas, etc. Ante la presencia de algún estímulo, se activan vías de señalización dentro de las células para coordinar actividades como el crecimiento, la proliferación y la diferenciación, entre otros.

Si consideramos a TOR como el componente central dentro de estas vías, podemos encontrar distintos elementos que sensan las señales ambientales y las integran para generar una respuesta que es transducida hacia TOR regulando así su actividad, estos elementos son considerados como reguladores río arriba

A su vez, TOR actúa como regulador sobre otras proteínas que se encuentran “río debajo” de él, estas proteínas sensan la señalización de TOR para así estimular distintos procesos biológicos.

En la Figura 3, se resume la identificación de componentes río arriba de TOR (reguladores de TORC) como PI3K, VPS34, PTEN, PDK, entre otros; también a los interactores en complejos TOR (componentes de TORC) y proteínas que dependen

de la actividad de los complejos TOR (blancos de TORC) en humano, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, el alga *C. reinhardtii* (evolutivamente cercana a plantas) y la planta modelo *A. thaliana*. Se puede observar la ausencia de RICTOR, quien forma parte de TORC2, tanto en el alga como en la planta, por lo que se considera que sólo TORC1 funciona en las plantas. También llama la atención la ausencia de una cinasa PI3K de clase 1, TSC1 (harmatina), TSC2 (tuberina) y Rheb en levaduras, algas y plantas, siendo estos reguladores clave en la actividad de TOR en mamíferos. Tampoco se ha demostrado, hasta el momento, la presencia de las proteínas canónicas 4E-BP (*4E binding protein*) en levaduras y plantas, siendo que éstas se han descrito como blancos importantes de TOR en mamíferos.

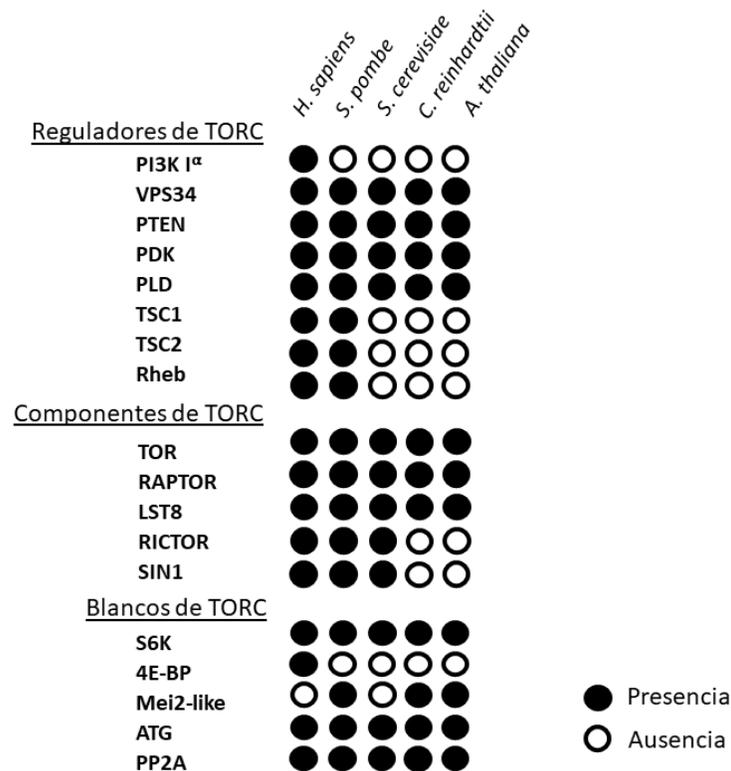


Figura 3. Componentes identificados de la vía TOR. Representación esquemática de los componentes identificados de la vía TOR en *Homo sapiens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Rexin et al., 2015.

La vía PI3K-AKT es una de las mejor descritas en animales (Figura 4). Las cinasas de la familia PI3K son enzimas claves en la respuesta a la presencia de factores de crecimiento, estos factores activan receptores en la superficie de las células que a su vez activan a estas cinasas lipídicas (Ruggero & Sonenberg, 2005). Se han identificado tres clases diferentes que pueden distinguirse entre sí, por la organización de sus subunidades y su especificidad a sustratos.

La clase I de PI3Ks está compuesta de una subunidad regulatoria y una unidad catalítica, es esta clase la que se encuentra presente en mamíferos y regula diversos fenómenos celulares tales como el crecimiento, progresión del ciclo celular, síntesis de DNA y el reacomodo de actina, entre otros. Esta clase utiliza como sustrato a PtdIns(4,5)P₂ para generar a los fosfolípidos: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) y PtdIns(3,4)P₂ en la membrana plasmática de las células.

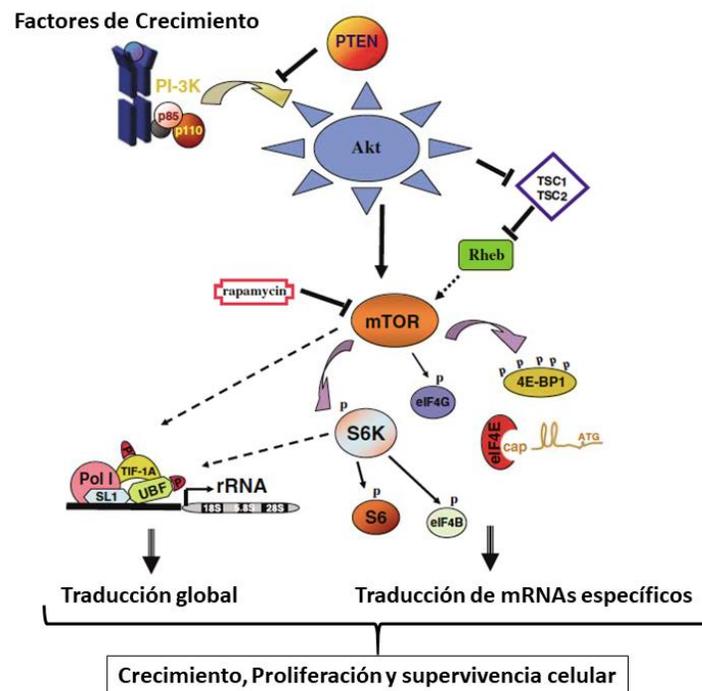


Figura 4. La vía PI3K/Akt/mTOR en mamíferos. Los factores de crecimiento, una vez reconocidos por su receptor, activan a PI3K y Akt, quien directamente fosforila a mTOR e inhibe a los complejos TSC1/2, propiciando la activación de la vía. Río abajo, esto resulta en estimulación de la síntesis de proteínas global mediante una mayor transcripción de rRNA y biogénesis de ribosomas, así como la traducción de mRNAs específicos mediante la fosforilación de la cinasa S6K y de 4E-BP. Estos

mRNAs corresponden a proteínas involucradas en el crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Modificado de Ruggero y Sonenberg, 2005.

La clase II sólo usa como sustratos a los fosfatidilinositol y fosfatidilinositol-4-fosfato. Se sugiere que tienen un rol en la supresión de la muerte celular por apoptosis, en exocitosis, organización del citoesqueleto, entre otros.

La clase III sólo utiliza como sustrato a los fosfatidilinositol, produciendo así PtdIns3P. La primer PI3K de esta clase fue descubierta en *Saccharomyces cerevisiae* y se le denominó VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*), debido a su función en la regulación del tráfico vesicular en el sistema lisosomal donde se encarga de reclutar proteínas que contienen dominios de unión a PtdIns3. Entre otras de sus funciones se encuentra la autofagia que, en conjunto con otra cinasa de clase III (VPS15), es activada en respuesta a deficiencia de nutrientes. También se ha demostrado que esta cinasa juega un rol en la activación directa de mTORC1 en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos y glucosa (Backer, 2008; Byfield et al., 2005; Lee et al., 2009).

En mamíferos, la actividad de PI3K y la presencia de PtdIns(3,4,5)P₃ desencadenan una serie de señalizaciones que resultan en el reclutamiento de diversas proteínas a la membrana plasmática, esta actividad es contrarrestada por PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), una fosfatasa que convierte al PtdIns(3,4,5)P₃ de nuevo en PtdIns(4,5)P₂ actuando así como un regulador negativo de la vía.

Entre las proteínas que son reclutadas por la actividad de PI3K se encuentran PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*) y AKT/PKB (*protein kinase B*), la actividad cinasa de PDK1 contribuye a la activación de AKT quien necesita ser fosforilada en dos sitios específicos, en el residuo Thr308 y Ser473. (Wullschleger et al., 2006)

PDK1 fosforila a AKT en el residuo Thr308, mientras que la cinasa encargada de la fosforilación de Ser473 es mTORC2, estas fosforilaciones son esenciales para la activación completa de AKT y su subsecuente efecto en mTORC1 (Sarbasov et al., 2005).

El rol de AKT en la señalización hacia mTORC1 se debe a su papel como inhibidor del complejo de esclerosis tuberosa (TSC, *tuberous sclerosis complex*), compuesto por TSC1 y TSC2, al fosforilar a TSC2 en cinco residuos (S939, S981, S1130, S1132 y T1462). TSC1 y TSC2 actúan como un heterodímero que regula negativamente a mTOR mediante la inhibición de la actividad GAP (proteína activadora de GTPasas) de TSC2 necesaria para la GTPasa pequeña Rheb.

Al ser parte de la familia de GTPasas Ras, Rheb necesita de la hidrólisis de un fosfato en la molécula de guanósín trifosfato (GTP), produciendo guanósín difosfato (GDP), para estimular la actividad de mTORC1 al unirse directamente en su dominio cinasa. Se ha propuesto que una manera en la que TSC regula a Rheb es a través del secuestro de Rheb-GDP para evitar su cambio a Rheb-GTP, este proceso se da principalmente cuando hay una deficiencia de factores de crecimiento o nutrientes. También se ha planteado que Rheb pueda activar de manera indirecta a mTORC1 mediante la estimulación de la fosfolipasa D1 (PLD1), quien cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina a ácido fosfatídico (PA), este último podría activar alostéricamente a mTORC1 al interactuar directamente con su dominio FRB. (Dibble & Cantley, 2015) Incluso se ha visto que la actividad de VPS34 dependiente de aminoácidos pueda ocurrir a través de la producción de PA mediada también por PLD (Yoon et al., 2011).

Las plantas, caracterizadas por estudios en el modelo *Arabidopsis thaliana*, al parecer carecen de varios de los componentes reguladores de TORC presentes en mamíferos, tales como PI3K de clase 1, AKT, el complejo TSC y Rheb. Con lo que se sabe hasta el momento con relación a la conservación de esta vía en plantas se han propuesto varias hipótesis ejemplificadas a través de la Figura 5. Para esta ruta hipotética, se plantean como reguladores de TOR a VPS34, PTEN y PDK1 debido a su conservación y presencia en plantas. El único regulador río arriba ya establecido para TOR en plantas serían las GTPasas ROP. El complejo TOR y sus componentes río abajo como S6K y rpS6, se mantienen conservados respecto a la vía en mamíferos.

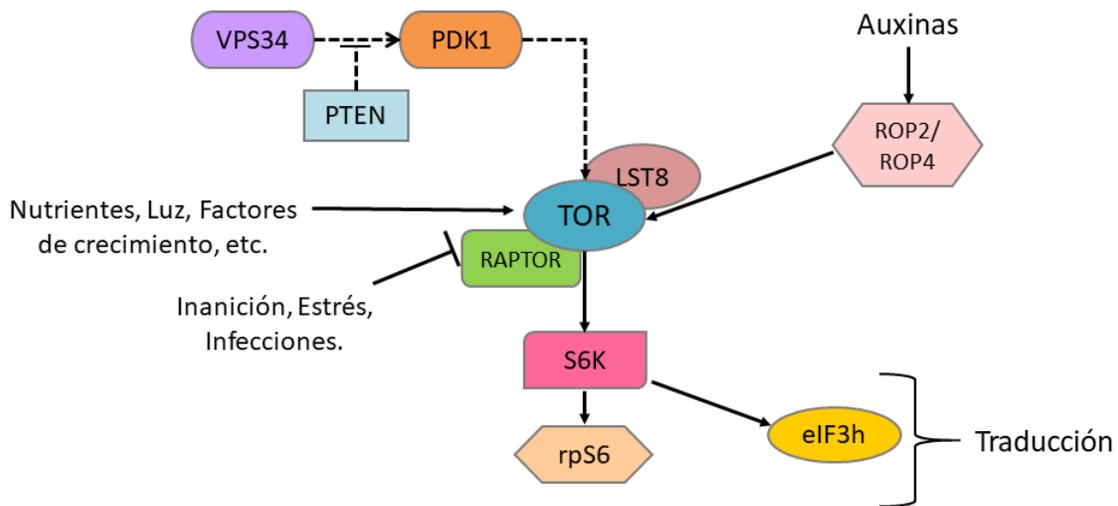


Figura 5. Vía de señalización hipotética de TOR en plantas. Las líneas punteadas indican interacciones hipotéticas con VPS34, PTEN y PDK1 debido a su conservación y presencia en plantas. Para el resto de los componentes ya se ha establecido su presencia y función para esta vía en plantas. Se confirmó el rol de las GTPasas ROP sobre la activación de TOR en plantas y su subsecuente efecto sobre el reinicio de la traducción a través de S6K y eIF3h, así como el efecto directo en traducción a través de rpS6. (Dinkova et al., 2007; Schepetilnikov & Ryabova, 2018)

La regulación de TOR en plantas hasta el momento no es clara debido a la ausencia de reguladores directos de la cinasa que sí están presentes en otros organismos, pero estas discrepancias podrían deberse a las diferencias evolutivas entre organismos, dado que las plantas presentan modos distintos de adquisición de nutrientes y responden de manera considerablemente diferente a estímulos externos por tratarse de organismos sésiles.

Varios análisis para poder comprobar la regulación de TOR están aún pendientes, entre ellos se encuentra el comprobar si VPS34 juega un papel regulador en respuesta a aminoácidos, así como ha sido descrito en cultivos celulares humanos y levaduras, ya sea a través de la acción de alguna otra cinasa como PDK1 o a través de la producción de PA mediada por PLD ya que este último se encuentra presente en 12 isoformas en *Arabidopsis*. Al hacer un análisis funcional de una de estas isoformas, PLD α 3, se demostró que bajo condiciones de estrés hiperosmótico

aumentaba la actividad de esta proteína y los niveles de transcrito de TOR también incrementaban (Hong et al., 2008).

En cuanto a la cinasa PDK1 se ha demostrado que contribuye a la activación completa de la cinasa ribosomal S6 (S6K), quien es también blanco directo de TOR. (Rexin et al., 2015) El perfil de la actividad de PDK1 en Arabidopsis demuestra que es activada por un mayor rango de sustratos comparado con el de los animales, además de mostrar activación bajo la presencia de PA en vez de PtdIns(3,4,5)P₃ o PtdIns3P. (Anthony et al., 2004)

PTEN se encuentra expresado a través de 3 isoformas en Arabidopsis, AtPTEN1, AtPTEN2a y AtPTEN2b. AtPTEN1 exhibe una actividad fosfatasa *in vitro* comparable con la de mamíferos, aunque a su vez presenta afinidad por PtdIns3P y demuestra ser esencial en el desarrollo de polen. Las otras dos isoformas tienen una mayor expresión en diversos tejidos y su rango de sustratos es mayor, desde PtdIns3P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, pero no a PtdIns(3,4,5)P₃ (Rexin et al., 2015).

Dentro de los estímulos que se han confirmado que activan la vía de TOR en plantas se encuentra la fitohormona auxina a través de la activación de una pequeña GTPasa denominada ROP2 (*Rho-like small GTPase 2*). De hecho, debido a la ausencia de un ortólogo de Rheb, la familia de GTPasas ROP/RACS es la única candidata como regulador específico de TORC1 en plantas. ROP2 de Arabidopsis interactúa directamente tanto *in vivo* como *in vitro* con TOR en respuesta a la presencia de auxinas, independientemente de su unión a GTP, pero sólo activa a la cinasa cuando se encuentra unida a GTP.

Las auxinas son reconocidas por el receptor TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*) y la señal es transmitida al citosol donde ROP2 se une directamente a TOR a través de su motivo C-terminal rico en lisinas, el cual es similar a Rac1 en mamíferos. ROP2-GTP activo recluta al complejo de TOR en la membrana de endosomas donde se comprobó que activa a mecanismos que controlan el reinicio de la traducción en plantas, específicamente en mRNAs que contienen un marco de lectura abierto río arriba (uORF). (Figura 6) Los uORFs son regiones que codifican

Un elemento que comparten estos dos complejos es la presencia de la proteína mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*), esta proteína se asocia directamente con el dominio cinasa de TOR e interviene en su actividad, tanto así que se comprobó que la sobreexpresión de esta proteína estimula la actividad de la cinasa (Kim et al., 2003).

mTORC1 responde a varios estímulos tales como aminoácidos, glucosa, insulina y factores de crecimiento, los cuales determinan diversas funciones en el organismo, tales como síntesis de proteínas, metabolismo, biogénesis de ribosomas, autofagia y regulación de la transcripción. Mientras que mTORC2 controla la organización de la actina lo que conlleva a la regulación de la forma de la célula a través del citoesqueleto, también está involucrada en glucólisis, gluconeogénesis y lipogénesis vía la fosforilación de AKT (Wullschleger et al., 2006; Xiong & Sheen, 2014).

Con el descubrimiento del ortólogo de TOR en *Arabidopsis*, y su relación con el crecimiento de la planta, se afianzó el estudio de esta vía. Las mutantes nulas de TOR en *Arabidopsis* han demostrado ser letales durante la embriogénesis y la inactivación de TOR afecta el crecimiento de la planta, de hecho, la expresión de esta cinasa ocurre a lo largo de todos los tejidos en *Arabidopsis*, particularmente en raíces primarias y laterales, meristemo apical y floral (Menand et al., 2002).

En la actualidad sabemos que en plantas TOR actúa a través de un sólo complejo, el cual está conformado por los ortólogos de RAPTOR y LST8, ya que no se han encontrado ortólogos para RICTOR. Tanto para RAPTOR como para LST8 fue posible localizar dos genes codificantes para las proteínas en *Arabidopsis* (*RAPTOR1/RAPTOR2* y *LST8-1/LST8-2*), mientras que para TOR sólo se encontró un gen. Al contrario de mamíferos, mutantes nulas de LST8 o de RAPTOR en plantas no son letales, aunque resultan en defectos en el desarrollo (Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Shi et al., 2018).

RAPTOR-1 se une al dominio HEAT de TOR y *LST8-1* al dominio FRB tanto en *Arabidopsis* como en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que sugiere que

ambas cumplen funciones similares a las descritas en los ortólogos de mamíferos. Además, las funciones de este complejo en plantas son similares a las correspondientes al complejo mTORC1 en mamíferos, donde señales de disponibilidad de nutrientes y de crecimiento son percibidas a través de la activación de TOR y resultan en incrementos de la biogénesis de ribosomas y regulación de la traducción de mRNAs específicos (Deprost et al., 2007).

De manera similar a lo observado en animales, TOR funge como regulador del metabolismo en plantas. En *Arabidopsis* fue posible visualizar esta actividad mediante perfiles metabólicos y transcripcionales en donde la inhibición química de TOR o mutaciones en LST8 llevan a la acumulación de almidón, ácido tricarboxílico que es un intermediario de los triacilgliceroles, y cambios asociados en los perfiles de expresión génica del metabolismo intermedio. A su vez se estableció el rol de AtTOR en la autofagia mediante un mecanismo similar al de los mamíferos, donde TOR fosforila a ULK1 (*unc-51-like autophagy-activating kinase 1*) lo que evita la fosforilación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Se han encontrado ortólogos funcionales a estas proteínas tanto en algas como en *Arabidopsis* (Rexin et al., 2015).

3.1.3 Efectores río debajo de TOR

Entre los efectores más estudiados río debajo de mTORC1, y que influyen en la regulación traduccional y el crecimiento, se encuentran: el inhibidor de inicio de la traducción 4E-BP y las cinasas de la proteína ribosomal S6 (S6K1 y S6K2).

S6K1 se ha reconocido como la cinasa que interactúa con diversos efectores para el control de la traducción. Para su activación se requiere de la fosforilación en dos sitios específicos, uno de esos sitios es en el motivo hidrofóbico en el extremo C-terminal y el otro sitio es un bucle-T en el dominio cinasa. mTORC1 media la fosforilación de Thr389 en el motivo hidrofóbico, mientras que PDK1 es responsable de la fosforilación del bucle-T. La fosforilación de mTORC1 está auxiliada por RAPTOR, este último media la interacción entre TOR y S6K1. El sitio Thr389 se encuentra conservado en la S6K1 de plantas.

Cuando S6K1 se encuentra activa, ésta fosforila a la proteína ribosomal S6 (S6rp) en la subunidad 40S lo que provoca un aumento en la traducción de un conjunto de mRNAs que contienen en su extremo 5' oligopirimidinas (5' TOP). Entre los productos codificados por este tipo de mRNAs se encuentran componentes del aparato de la traducción tales como otras proteínas ribosomales y factores de elongación, se estima que son entre el 15-20% del total de mRNAs celulares (Wullschleger et al., 2006). También se ha demostrado que otra manera de intervenir directamente con la traducción es a través del factor de inicio de la traducción en eucariontes eIF3, quien actúa como una proteína tipo "scaffold/andamiaje" entre mTORC1 y S6K (Holz & Blenis, 2005).

En animales se encuentran las proteínas 4E-BPs, las cuales son fosforiladas por mTORC1 quien permite la liberación de eIF4E, esto permite que este factor se asocie con eIF4G para estimular el inicio de la traducción (Bjornsti & Houghton, 2004).

En Arabidopsis se descubrieron dos ortólogos de S6K, AtS6K1 y AtS6K2, de los cuales AtS6K1 es el que presenta mayor similitud con S6K1 de mamíferos. Para Arabidopsis, se ha descrito la interacción entre RAPTOR, TOR y S6K1. La manera en la que TOR regula la traducción en las plantas es a través de S6K1, ya que no se han observado ortólogos para las proteínas 4E-BPs. Se ha descrito que aminoácidos, auxinas e infecciones virales promueven que TOR fosforile a S6K1, quien a su vez induce la hiperfosforilación de S6rp y la fosforilación de eIF3h, resultando en la traducción selectiva de mRNAs 5'TOP o con uORF, cuyos productos son necesarios para el crecimiento celular (Dinkova et al., 2007; Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Xiong & Sheen, 2015).

Hay ciertas funciones novedosas de la vía TOR-S6K en plantas, donde esta señalización influye en la reiniciación de la traducción en mRNAs virales y mRNAs específicos de plantas. El reinicio de la traducción del mRNA del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) se ve promovido por una proteína viral TAV (*translational transactivator/viroplamin*). TAV estimula la hiperactivación de TOR y la fosforilación de S6K, esto facilita la asociación de TOR en polisomas mediante la intervención

del complejo eIF3 y la proteína de soporte de la reiniciación (RISP). También se mostró que las auxinas promueven la asociación de TOR a polisomas que contienen mRNAs con uORFs a través de la actividad de ROP2. La reiniciación se da cuando S6K se disocia de TOR y este es reclutado por el complejo de eIF3h, manteniendo así su estado de fosforilación para continuar promoviendo la reiniciación de la traducción (Schepetilnikov et al., 2011, 2013).

TOR también fosforila de manera directa a TAP46 (*2A-phosphatase-associated protein 46 kDa*), esta proteína regula la actividad de la fosfatasa 2A (PP2A) quien controla genes de estrés, autofagia, metabolismo del nitrógeno y traducción. Otra de las proteínas que interactúa con TOR es ATG1, ortólogo de ULK1 en mamíferos, y también controla la inhibición de la autofagia en plantas (Rexin et al., 2015).

Recientemente, a través del estudio de la reducción endógena de glucosa en semillas quiescentes de *Arabidopsis*, se estableció que TOR censa y dicta la reprogramación transcripcional de genes involucrados en ciclo celular. El factor de la transcripción E2Fa es fosforilado y activado por TOR lo que produce el aumento de la transcripción de genes involucrados en la fase S del ciclo. También el factor E2Fb y otros factores de la transcripción son fosforilados por TOR lo que promueve la activación del ciclo celular. A su vez, esta vía de señalización TOR-glucosa también activa más de 100 genes que codifican para proteínas ribosomales, proteínas que procesan RNA ribosomal y proteínas que regulan la biogénesis de ribosomas en *Arabidopsis* (Xiong & Sheen, 2015).

3.2 El maíz

El maíz (*Zea mays*) es una planta de origen mesoamericano perteneciente a la familia botánica Poaceae o Gramineae, al igual que el trigo, el arroz, la cebada, el centeno y la avena.

Este cultivo, como lo conocemos hoy en día, se originó mediante el proceso de domesticación que llevaron a cabo los antiguos habitantes de Mesoamérica hace aproximadamente 10,000 años; surgió a partir de los “teocintles” que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica.

Históricamente esta planta ha acompañado a las antiguas civilizaciones de América, como lo fueron los Aztecas, Mayas, Zapotecas, Mixtecas, Purhepechas, Totonacas, Mazatecas, Chinantecas, Zoques, etc. El desarrollo de estas culturas se fundamenta en el cultivo y aprovechamiento de este grano, tanto que sus crónicas, cantares, leyendas, referencian al maíz como sustento de sus pueblos (CONABIO, 2020).

México y los países centroamericanos son considerados como centro de la diversidad de maíz con 59 razas. Actualmente, el maíz es uno de los cuatro principales cultivos producidos en el mundo, con 695 millones de toneladas producidas en 2007. El mayor productor es Estados Unidos, con 282 millones de toneladas anuales y tan sólo en México su producción ocupa el 50.3% de la superficie agrícola (INE et al., 2008).

El maíz se utiliza principalmente como alimento humano, cerca del 40% de su producción en trópicos es usado como alimento animal y el resto está destinado a otros usos, tales como materia prima para la elaboración de productos alimentarios como aceites comestibles, almidón, jarabe, dextrosa, jarabe de alta fructosa, alcoholes, etc. (Paliwal & Nations, 2001).

Dada la relevancia cultural y agrícola que tiene esta planta, especialmente en México, últimamente ha cobrado mucho interés como modelo de estudio. Tanto así que se han creado diversos proyectos a nivel nacional para la conservación, rescate y mejoramiento genético de maíces criollos y razas nativas.

3.2.1 Estructura de la semilla

La semilla, constituye un órgano de dispersión y representa la culminación de la evolución reproductiva de las plantas. Se forma mediante una embriogénesis cigótica que comprende los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final del desarrollo y maduración del embrión (Matilla, 2008).

Este órgano, el cual contiene en su interior el eje embrionario, está equipado estructuralmente para sostener el crecimiento de la plántula y permitir el

establecimiento de esta. Los componentes que dan forma a la semilla permiten la reanudación de eventos metabólicos tras la rápida absorción de agua (Bewley, 1997).

En el caso del maíz, una semilla madura (cariopsis) está compuesta de tres partes: el pericarpio, el endospermo y el germen o embrión. El pericarpio es la parte externa transparente de la semilla que actúa como una barrera para retener el agua alrededor de la semilla, a su vez esta se divide en más capas que están representadas en la Figura 7. La base del grano está compuesta de tejidos denominados pedicelo o piloriza quien ayuda a la maduración de la semilla gracias a su capacidad de absorber agua y nutrientes.

El endospermo representa aproximadamente el 85% del total del peso del grano seco, se compone de 87% almidón, 8% de proteínas y menos del 1% son grasas. Esta parte es la principal fuente de nutriente para el embrión durante la germinación y formación de la plántula.

El embrión tiene un eje central o eje embrionario en donde en su parte basal se encuentra la raíz primaria y en el otro extremo se encuentra la punta que dará forma a la parte aérea de la planta. En esta parte de la semilla se encuentra toda la información genética y enzimática necesaria para la germinación y establecimiento de la plántula (Vincent, 2012).

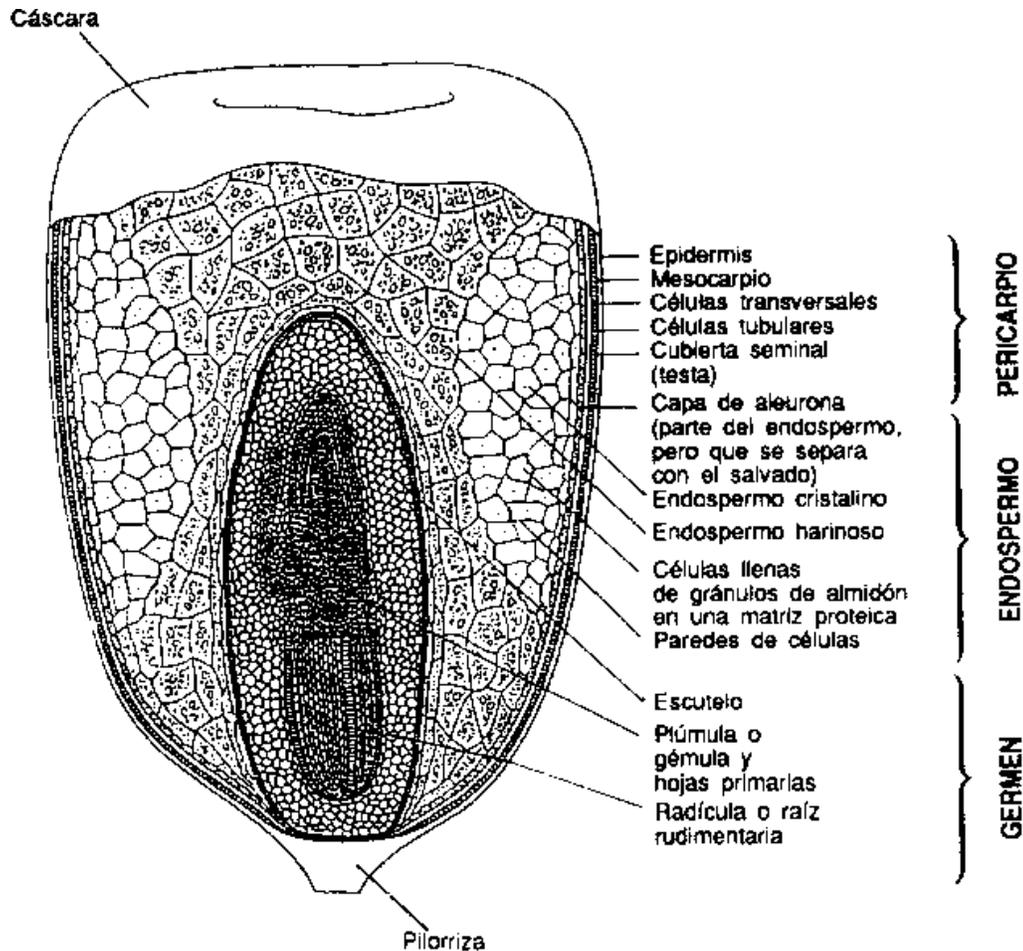


Figura 7. Morfología de una semilla de maíz madura. Tomada de Hosney, 1991.

3.3 Germinación

La germinación es un proceso complejo que puede definirse de diversas maneras dependiendo del contexto. Por ejemplo, en la agricultura se puede definir como el momento en que la plántula emerge del suelo. El proceso empieza cuando una semilla seca quiescente se pone en contacto con agua (imbibición) y finaliza con la elongación del eje embrionario que conlleva a la protrusión de la radícula (Bewley, 1997).

La semilla latente, la cual contiene en su interior el eje embrionario, está equipada estructuralmente para sostener el crecimiento de la plántula y permitir el establecimiento de esta. Los componentes de la semilla permiten la reanudación de los eventos metabólicos, como la síntesis de proteínas y el metabolismo energético, tras la rápida absorción de agua.

Una manera de describir el proceso de la germinación ha sido dividiéndolo en fases (Figura 8). La fase 1 inicia con la imbibición rápida de agua por la semilla quiescente, la cual está metabólicamente inactiva, provocando cambios estructurales principalmente en las membranas celulares hasta el punto en el que todas las matrices y contenidos celulares se encuentran hidratados. La fase II es un periodo de absorción constante y limitada de agua, algunas semillas no se ven modificadas en esta fase y no completan la germinación como es el caso de las semillas dormantes. La fase III se caracteriza por un nuevo aumento en la absorción de agua y se le suele denominar fase post-germinativa.

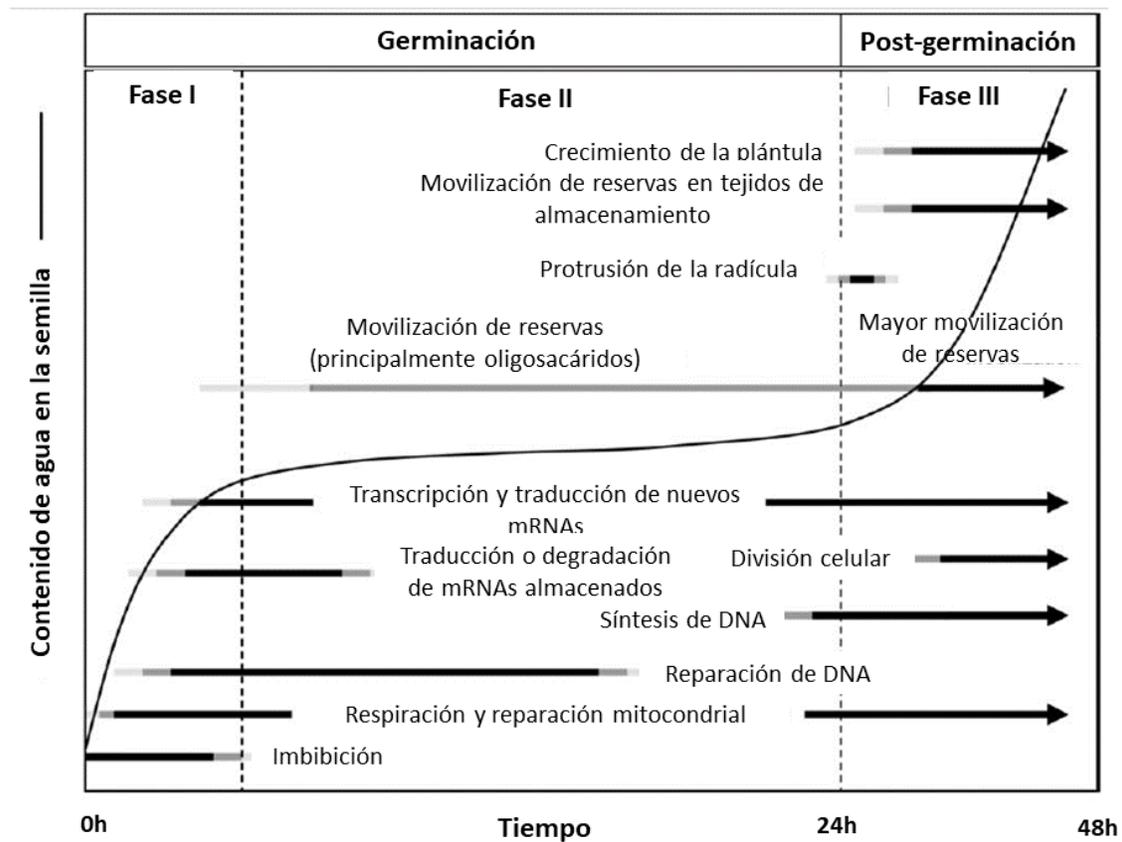


Figura 8. Línea temporal de los eventos físicos y metabólicos que ocurren durante la germinación. Modificado de Nonogaki et al., 2010.

Uno de los primeros eventos metabólicos que se reanudan en la fase I es el metabolismo energético. Las semillas secas maduras contienen mitocondrias y algunas enzimas funcionales las cuales son necesarias para la respiración como

algunas enzimas del ciclo de Krebs. Las semillas de Arabidopsis o maíz contienen muchas especies de mRNAs, denominados mensajeros almacenados o residuales.

Los mRNAs almacenados dan paso a la síntesis de proteínas *de novo* antes de que se reanude la actividad transcripcional y nuevos mensajeros estén disponibles. A los pocos minutos tras la rehidratación, los ribosomas son reclutados en complejos de síntesis de proteínas llamados poliribosomas, utilizando los mRNAs existentes (Nonogaki et al., 2010). Los mRNA que codifican para proteínas que se requieren durante germinación temprana, como por ejemplo transcritos de proteínas ribosomales, son reemplazados por mRNAs idénticos conforme la síntesis de proteínas se vuelve más dependiente una transcripción activa. Nuevos mRNAs son sintetizados conforme el proceso de germinación va avanzando, la mayoría de éstos probablemente codifiquen a proteínas esenciales para el soporte del metabolismo celular normal. En maíz se comprobó que durante la germinación sí hay un cambio en la población de mRNAs en el embrión y la síntesis de proteínas (Agredano-Moreno et al., 2007; Dinkova et al., 2007).

En la fase II es cuando estímulos, como las fitohormonas, son integrados al estado fisiológico de la semilla para determinar si es que entrará o no a la fase III, además aquí generalmente se presenta la protrusión de la radícula y finalización de la germinación. La síntesis de DNA se observa en dos instantes, durante la primera fase tras la imbibición probablemente asociado a la reparación del DNA dañado durante la maduración de la semilla y a síntesis de DNA mitocondrial; y entre la segunda y tercera fase asociado a división celular post-germinativa, La tercera fase continua con entrada de agua abundante, división y crecimiento celular, así como movilización de reservas y establecimiento de la plántula (Bewley, 1997).

3.4 Inducción de callos embriogénicos de maíz

La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas diferenciadas, bajo las condiciones de inducción adecuadas, generan células embriogénicas indiferenciadas capaces de sostener proliferación continua (Yang & Zhang, 2010).

Este tipo de embriogénesis es un proceso alternativo de reproducción en plantas promovido por señales exógenas, principalmente elevadas concentraciones de auxinas, e incluye ciertos eventos característicos: desdiferenciación de células, activación de la división celular y reprogramación de su fisiología, metabolismo y patrones de expresión genética (Jakubeková et al., 2012).

Estas células desdiferenciadas que proliferan manteniendo su estado totipotencial, conforman aglomeraciones denominadas callos embriogénicos. Una vez retirado el estímulo de auxinas y en presencia de luz, estos tejidos pueden regenerar plantas completas.

Debido a su similitud con el desarrollo de embriones cigóticos tanto morfológica como fisiológicamente, la embriogénesis somática se utiliza ampliamente como modelo de estudio de la embriogénesis, también permite examinar los mecanismos que regulan la expresión de genes específicos involucrados en crecimiento y diferenciación, así como respuesta a auxinas (López-Ruiz et al., 2019).

La capacidad de producir callos embriogénicos depende de diversos factores tales como genotipo y tipo de tejido. Para maíz el explante preferido son los embriones cigóticos inmaduros cosechados en un periodo entre 15 y 18 días después de la polinización, los cuales permiten el establecimiento de cultivos embriogénicos con una alta eficiencia de regeneración (Garrocho-Villegas et al., 2012).

Las fitohormonas auxinas y citocininas, se utilizan en la iniciación y propagación de callos embriogénicos debido a que están relacionadas con la regulación de la división y diferenciación celular. La aplicación exógena de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se utiliza en la desdiferenciación e inducción de embriogénesis somática, mientras que su combinación con citocininas promueve la proliferación de callos embriogénicos, suspensiones celulares y órganos, además de regular el proceso de morfogénesis (Jakubeková et al., 2012).

Las auxinas son un grupo de fitohormonas de gran importancia ya que están implicadas en la mayor parte de los procesos involucrados en el crecimiento de una planta. No sólo pueden tener una influencia directa en crecimiento celular, sino que

también controlan numerosos y diversos aspectos del desarrollo, su efecto dependerá del tipo de auxina aplicada y de su concentración. Las citocininas regulan procesos como el retraso de la senescencia, transducción de señales nutricionales y el incremento de la productividad del cultivo (Mok & Mok, 2001; Teale et al., 2006).

Estas dos fitohormonas actúan de manera sinérgica durante el proceso de inducción de embriogénesis somática. Una alta relación entre citocininas y auxinas estimula la formación de brotes, mientras que una baja relación induce la regeneración de raíces. También se ha informado que las citocininas son esenciales para mantener los niveles basales de biosíntesis de auxinas durante el desarrollo de raíces y brotes, lo que sugiere que existe una red reguladora homeostática para soportar concentraciones adecuadas entre auxinas y citocininas en el desarrollo de la planta. (Méndez-Hernández et al., 2019)

4. Antecedentes

En el departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM se han realizado estudios referentes a la vía de TOR en maíz. En 2007 Agredano-Moreno identificó el transcrito de TOR, así como su expresión durante la germinación en maíz de la raza Chalqueño. En este estudio se describe que ZmTOR se expresa a nivel de proteína a partir de las 12 horas después de la imbibición, su nivel va en aumento hasta un máximo en las 48 horas después de la imbibición (Figura 9 A). También se estudió su expresión de nivel de transcrito, ZmTOR se ve expresado de manera abundante en ejes embrionarios de semilla seca, a las 6 horas después de la imbibición no se detecta el transcrito, pero a partir de las 12 horas se reinicia progresivamente su transcripción aumentando sus niveles desde las 12 horas hasta las 48 horas (Figura 9 B/C). Esto sugiere que el transcrito almacenado podría ser degradado y que se requiere transcripción de novo para la acumulación de TOR al final de la germinación y en etapas post-germinativas.

En otro experimento del mismo estudio se evaluó el patrón de expresión de la cinasa en tejidos en distintas etapas de desarrollo, entre ellos incluyen callos

embriogénicos y no embriogénicos. Se constató que ZmTOR mantiene niveles altos de expresión en todos los tejidos. (Figura 10)

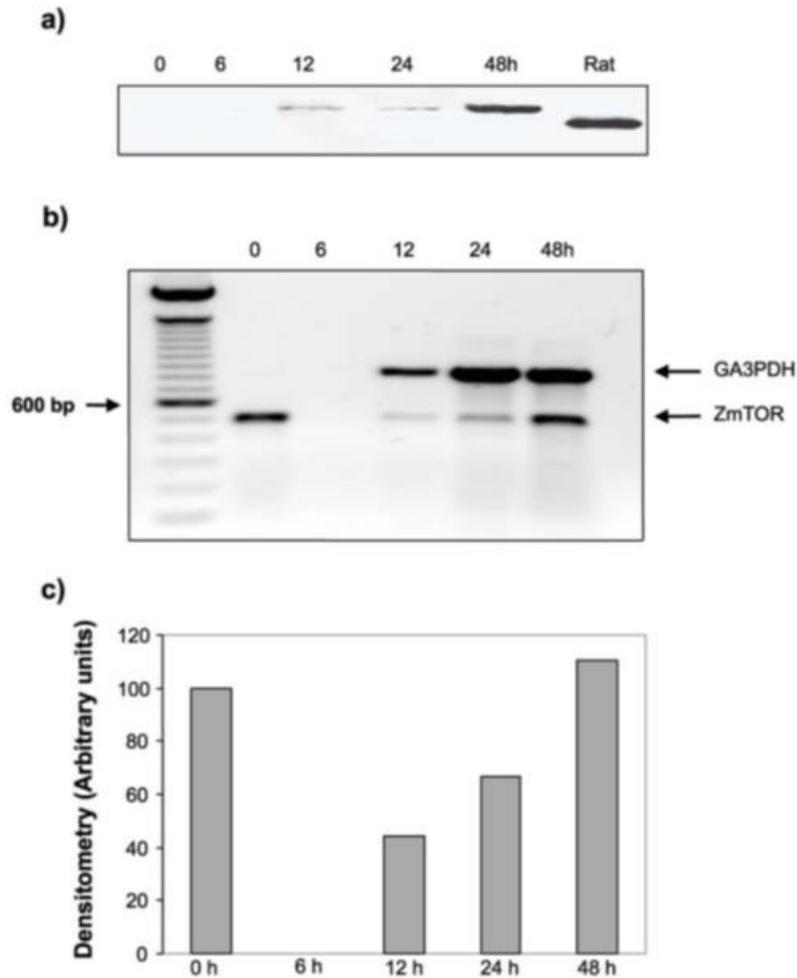


Figura 9. Regulación de la expresión de ZmTOR durante la germinación. a) Monitoreo de la expresión de la proteína ZmTOR durante la germinación a través de western-blot. b) Monitoreo de la expresión de ZmTOR a nivel de RNA mediante RT-PCR. GA3PDH fue usado como control. c) Análisis densitométrico de los productos del RT-PCR. Tomado de Agredano-Moreno et al., 2007.

También se ha identificado a la proteína S6K en la germinación de maíz, los resultados indicaron que los niveles de la proteína son similares desde las 0h hasta las 48h. A su vez se investigó el efecto de la rapamicina en la actividad de la cinasa, esta fue inhibida así como su subsecuente fosforilación sobre rpS6 lo que podría indicar que TOR se encuentra río arriba de S6K (De La Cruz et al., 2004).

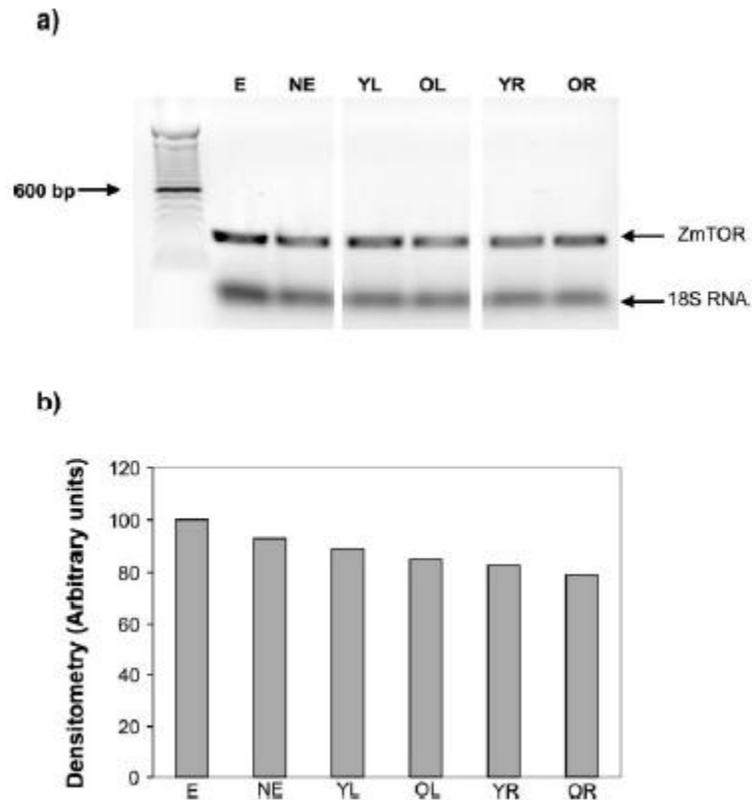


Figura 10. Patrón de expresión de ZmTOR en tejidos de maíz a diferentes estadios de desarrollo y en callo embriogénico y no embriogénico. a) Análisis semicuantitativo de la expresión a nivel de transcrito de ZmTOR a través de RT-PCR, usando a 18S RNA como control. b) Análisis densitométrico de los resultados presentados en a). Callo embriogénico (E) y callo no embriogénico (NE), hojas jóvenes (YL), hojas maduras (OL), raíces meristemáticas (YR), raíces maduras (OR). Tomado de Agredano-Moreno et al., 2007.

En cuanto a elementos río arriba de TOR y estímulos que puedan activar la vía, se ha descrito que la presencia del factor IGF de maíz (ZmIGF) induce la activación de TOR y su función cinasa sobre las proteínas ZmS6K y rpS6 para estimular el crecimiento de la planta (Figura 11)(Dinkova et al., 2007).

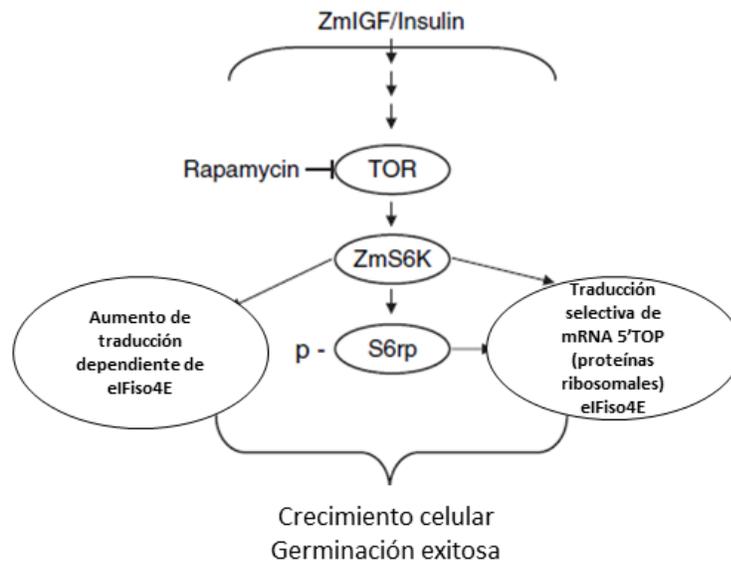


Figura 11. Vía de señalización de TOR-S6K en germinación de maíz. La estimulación de la vía por ZmIGF induce la activación de TOR y estimula la activación de ZmS6K. Esto aumenta la fosforilación de S6rp y la traducción selectiva de proteínas ribosomales y aumenta el nivel de traducción del factor de inicio eIFiso4E, todo lo cual se resume en la estimulación del crecimiento celular y una germinación exitosa en maíz. Modificada de (Dinkova et al., 2007).

El efecto de las auxinas sobre la vía en maíz fue igualmente analizado en ejes embrionarios de 24h después de la imbibición, demostrando que hay un aumento en la síntesis de proteínas ribosomales y que se estimula la fosforilación de rpS6. Este efecto podría explicar el mecanismo por el cual las auxinas regulan la traducción de mRNAs específicos a través de TOR (Beltrán-Peña et al., 2002).

5. Justificación

Se ha demostrado cuán importante es la cinasa TOR en el crecimiento de los organismos eucariontes y se ha ido detallando conforme el tiempo qué elementos contribuyen en las vías de señalización que involucran a esta cinasa en animales y plantas. En ambos tipos de organismos existen proteínas interactoras con TOR necesarias para su función. Sin embargo, la llegada de señales y la salida de efectos presentan diferencias importantes.

En plantas, TOR ha sido identificado en *Arabidopsis* y otras especies, pero muchas dudas quedan por resolver sobre su participación y efectos en la percepción de señales externas. Dado su rol central como regulador metabólico, se requiere extender la investigación sobre las vías de señalización a organismos de relevancia agrícola como maíz, trigo, arroz y otros.

Tomando en cuenta los antecedentes sobre la actividad de TOR-S6K en la germinación de maíz, así como los cambios en el perfil de expresión de TOR como transcrito a distintos tiempos de germinación (Agredano-Moreno et al., 2007; Dinkova et al., 2007) consideramos importante comprobar la presencia de otros componentes de esta vía y sus perfiles de transcrito durante la germinación y establecimiento temprano de la plántula de maíz, así como el efecto que tendría sobre su expresión el estímulo de elevadas concentraciones de auxinas que propicia eventos de desdiferenciación e inducción de callos embriogénicos de maíz.

6. Hipótesis

- Dado que la activación de TOR es importante durante el proceso de germinación y establecimiento de la plántula de maíz, los componentes de la vía que incluyen a reguladores, integrantes del complejo TORC1 y blancos de TOR presentarán una expresión diferencial durante este proceso.
- Durante la inducción de callos embriogénicos de maíz en respuesta a elevadas concentraciones de la auxina 2,4-D, se modificará la abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Explorar los niveles de mRNA como parámetro de expresión de los componentes de la ruta TOR en maíz de la raza Chalqueño, a distintos tiempos de imbibición de la semilla y en respuesta a estímulos hormonales.

7.2 Objetivos particulares

- Analizar la secuencia de genes de la vía TOR en maíz en comparación con Arabidopsis, así como la presencia de transcritos correspondientes durante la germinación y establecimiento de la plántula.
- Evaluar si existen patrones similares de expresión entre transcritos correspondientes a reguladores, componentes del complejo y blancos de TORC1 durante la germinación y establecimiento de plántula de maíz.
- Analizar si existen cambios en la expresión de genes de la ruta TOR, en respuesta al estímulo con auxina durante la inducción de callos embriogénicos de maíz.

8. 4. Metodología

4.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de maíz de la raza Chalqueño (cosecha agosto 2018) para el análisis de germinación y crecimiento de la plántula, que presentaran testa íntegra y sin evidente contaminación fúngica. Las semillas fueron imbibidas en agua entre dos capas de algodón a 28 °C en la oscuridad por 24 o 48 h. De las semillas secas (sin imbibir) o imbibidas por los tiempos indicados se extrajeron los ejes embrionarios para ser procesados. Se realizaron varias réplicas de la imbibición, con alrededor de 100 semillas imbibidas por réplica, y se seleccionaron los ejes embrionarios que presentaban un estado de germinación o crecimiento similares divididos en 3 grupos (réplicas a, b y c).

Para la inducción de callos embriogénicos de maíz se utilizaron embriones inmaduros de 15 (E15) o de 23 (E23) días después de la polinización (DDP), así como embriones maduros de 45 DDP (EM) de maíz de la raza Tuxpeño. Se tomaron muestras de los embriones y de callos inducidos a partir de estos al mes (C15, C23 y CM). La inducción consistió en poner a los embriones en medio de inducción N6I, que contenía 2 mg/L de 2,4-D por 15 días y posteriormente transferir a medio de proliferación N6P que contenía 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de cinetina por otros 15 días (López-Ruiz et al., 2018).

8.2 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos

La selección de genes se hizo a través de la comparación de las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las proteínas de la vía reportadas en Arabidopsis, contra el genoma de maíz. La base de datos utilizada para identificar estas proteínas en Arabidopsis fue *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). La plataforma usada para identificar los genes en maíz fue Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) donde se utilizó la herramienta *Basic Logical Alignment Search Tool* (BLAST) para comparar las secuencias entre Arabidopsis y maíz. Se seleccionaron aquellos genes con mayor porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos.

Para el análisis *in silico* del nivel de expresión de los genes en las etapas de desarrollo de nuestro interés en maíz, se utilizó la plataforma eFP browser de maíz (http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi) utilizando como referencia los datos de secuenciación masiva proporcionados por Sekhon et al., 2011 (Anexo 1).

Una vez teniendo esta información y la secuencia del transcrito para cada gen (número de acceso indicado en la Tabla 1), se procedió a diseñar los oligonucleótidos correspondientes a cada gen mediante el uso de la herramienta de diseño de oligos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tomando en consideración un tamaño de amplicón entre 200 y 400 pares de bases (pb). También se verificó que el porcentaje de citosina y guanina no fuera menor al 40% (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de PCR.

| Gen | Número de acceso | Secuencia | Tamaño del amplicón (pb) |
|---------|------------------|--|--------------------------|
| VPS34 | GRMZM2G103721 | F: ACCTCCGGCAAGATCAGTTG R: TTATCCAGATGCCTGTCTCCA | 325 |
| PTEN | GRMZM2G132468 | F: AAAACCAAGTGCTTGCTGCTT R: GCTTGACTTGGTGCTCTTCC | 204 |
| PDK1 | GRMZM2G097821 | F: GATTTATGGGCATTGGGATG R: CCTTTTGCCTGGATCAACAT | 183 |
| TOR | Zm00001d037950 | F: GATGCAAGTCCTTCGCACAA R: CTCTCGTTAGCCACTGCTT | 178 |
| RAPTOR | GRMZM2G048067 | F: GATGGTGTGAAGAGGCTCCC R: AAGGAGGAATGCTGACCACC | 231 |
| LST8 | GRMZM2G094959 | F: CGTTTGAGAGCATGCGTTG R: GGCGGATATGAGGATTGCCA | 241 |
| S6K1 | GRMZM2G080001 | F: CACAAGGAACCCAACAAGCG R: CTTGAGCCTAGAGCCGGATG | 306 |
| S6rp | GRMZM2G054136 | F: AAGTCTGTCCGTGGTTGCAT R: GACCCCTCATCCTTGGCTTC | 121 |
| eIF3h-1 | GRMZM2G028945 | F:TTTGACACACTTCCTAATTATACCA R: CGACCATTCCGTGAAACCTG | 141 |
| ROP4 | GRMZM2G375002 | F: TAGACCTCCGTGATGTGGGC R: AGCTCAATCGATTTGCCAGTG | 259 |

| | | | |
|-------------|---------------|--|-----|
| ROP2 | GRMZM5G846811 | F: ACCGCCTATCTTCTTCAGAC R: CGACCGTGACGCACTTTATG | 143 |
| 18S | U42796.1* | F: TCCTATTGTTGGCCTTCGG R: TCCTTGGCAAATGCTTTTCGC | 131 |

*Acceso proveniente de GenBank, los oligos para 18S fueron diseñados previo al desarrollo de este proyecto.

8.3 Extracción y purificación de RNA

Se extrajo RNA de aproximadamente 100 mg de ejes embrionarios, embriones o callos, usando TRizol Reagent (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor. El RNA fue precipitado con isopropanol frío y lavado con etanol. Tras secarse, el RNA fue disuelto en 40 μ L de agua libre de RNAsas. La integridad del RNA fue verificada en un gel de agarosa al 1.5%, empleando como buffer de corrida TAE 1x. La concentración del RNA fue cuantificada en un equipo NanoDrop2000.

Aproximadamente 4 μ g del RNA total fueron tratados con RQ1 RNase-free DNase (Promega) y purificados por columna con el kit RNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research), la muestra final también fue cuantificada. El RNA tratado restante fue almacenado a -70 °C hasta su posterior uso.

8.4 Reacción de inverso transcripción y PCR

Se utilizó aproximadamente 1 μ g del RNA purificado para reacciones de transcripción inversa incubando la muestra con Improm-II Reverse Transcriptase (Promega) en un volumen final de 20 μ L, al mismo tiempo también se hicieron pruebas para comprobar la ausencia de DNA (-RT) en las muestras purificadas de RNA.

Para estas pruebas se adicionó 1 μ L de cada muestra de RNA a una reacción individual de PCR con la siguiente composición:

Reacción estándar de PCR

| | <u>Concentración</u> |
|---------------------------------|----------------------|
| 2X KAPA2G Fast ReadyMix2 | 1x |
| Oligo FW | 0.3 μ M |
| Oligo RV | 0.3 μ M |
| H₂O | cbp 10 μ L |

Las temperaturas y tiempos de estas reacciones, así como de la síntesis de cDNA, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Programas de síntesis de cDNA, -RT y PCR.

| | Temperatura (°C) | Tiempo (min: seg) | Ciclos |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| Síntesis de cDNA | 25 | 05:00 | 1 |
| | 42 | 60:00 | 1 |
| | 70 | 15:00 | 1 |
| -RT y PCR | 95 | 03:00 | 1 |
| | 95 | 00:30 | Dependiendo de la abundancia del transcrito |
| | 60 | 00:30 | |
| | 72 | 00:30 | |
| | 72 | 07:00 | 1 |

Para cada gen de interés se realizaron reacciones usando las mismas concentraciones de los reactivos antes mencionados y el mismo programa de temperaturas. Sin embargo, las diluciones de cDNA y número de ciclos variaron en

algunos casos dependiendo del nivel de expresión de cada transcrito, estos datos se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Diluciones del cDNA estandarizado para cada gen necesarios para las reacciones de PCR punto final, así como el número de ciclos utilizados.

| Componente de la vía | Dilución del cDNA | Número de ciclos |
|----------------------|-------------------|------------------|
| <i>VPS34</i> | 1:10 | 30 |
| <i>S6K</i> | | |
| <i>S6rp</i> | | |
| <i>TOR</i> | | |
| <i>RAPTOR</i> | | |
| <i>18S</i> | | |
| <i>ROP2</i> | | |
| <i>ROP4</i> | Sin dilución | 35 |
| <i>PTEN</i> | | |
| <i>PDK1</i> | | |
| <i>LST8</i> | | |
| <i>eIF3h</i> | | |

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% y para visualizarlos se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador.

Para llevar a cabo el análisis semi-cuantitativo, se determinó la intensidad de cada banda por densitometría empleando el software Image Lab. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando como referencia la intensidad de banda del gen 18S. Se determinaron las veces de cambio respecto a 0h para las muestras de 24h y 48h. Se emplearon tres diferentes extracciones de RNA y se realizaron réplicas de cDNA y PCR.

9. Resultados

9.1. Análisis *in silico* de genes de la vía TOR en maíz

Para poder analizar los genes correspondientes a proteínas involucradas en la vía de señalización por TOR en maíz, se identificaron primero aquellos genes reportados en *Arabidopsis thaliana*. Usando la base de datos de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), se hizo la búsqueda de cada uno de los componentes de la vía tomando como referencia la información proporcionada por Rexin et al., 2015.

En el caso de los componentes representados por más de un gen en *Arabidopsis*, se analizaron como referencia los siguientes: RAPTOR1A, LST8-1, PTEN1, S6K1 y eIF3h-1, ya que han sido caracterizados en la mayoría de las publicaciones previas. Para cada gen se seleccionó la secuencia de aminoácidos correspondiente para proceder a analizar mediante la herramienta de BLAST contra el genoma de referencia de maíz *Zea mays* B73_AGPv3 (Ensembl-18), en la plataforma de Phytozome v12. Se seleccionaron aquellos genes con mayor identidad a nivel de aminoácidos respecto a los de *Arabidopsis* (Tabla 4).

La nomenclatura en maíz no siempre coincide con *Arabidopsis*, particularmente en cuanto al número que corresponde al identificador de tres letras de cada gen. Por ejemplo, en el caso de ROP2 (AT1G20090) el análisis mediante BLAST arrojó varios genes con identidad similar a nivel de aminoácidos, de estos se seleccionó a ROP4 con un mayor porcentaje de identidad (93.18%) que ROP2 (92.74%), aunque se optó por trabajar con ambos debido a la escasa diferencia en la identidad. Para varios de los componentes de la vía se encontró un solo gen en maíz, tal es el caso de VPS34, TOR, LST8, RAPTOR, S6K y eIF3h.

Tabla 4. Genes que fueron considerados para el análisis de expresión a distintos tiempos de germinación en eje embrionario de maíz. Se indica el Número de Acceso del gen de maíz que fue identificado en la versión 3 de anotación del genoma y los que corresponden a la versión 4 actualizada, así como los ortólogos de Arabidopsis que se indican en esta última actualización.

| Gen | Número de Acceso | | | Función biológica |
|---------|----------------------|--------------------|-------------------------|--|
| | Zea mays B73_AGPv3 | Zea mays B73_AGPv4 | A. thaliana | |
| VPS34 | GRMZM2G103721 | Zm00001d050219 | AT1G60490 | Actividad PI3 cinasa. Cataliza la fosforilación de fosfatidilinositol. |
| PTEN | GRMZM2G132468 | Zm00001d007942 | AT5G39400.1 | Regulador negativo de la ruta PI3K-AKT. Al regular esta vía actúa como supresor de tumores en mamíferos. |
| PDK1 | GRMZM2G097821 | Zm00001d042676 | AT5G04510 | Cinasa maestra que activa una serie de cinasas con actividad Ser/Thr. |
| TOR | GRMZM2G349554 | Zm00001d037950 | AT1G50030 | Target of rapamycin, cinasa con actividad Ser/Thr. Fosforila proteínas blanco como S6K1 |
| RAPTOR | GRMZM2G048067 | Zm00001d023230 | AT3G08850; AT5G01770 | Proteína reguladora de TOR que se asocia formando un complejo |
| LST8 | GRMZM2G094959 | Zm00001d007577 | AT2G22040; AT3G18140 | Proteína reguladora de la actividad cinasa de TOR que se asocia formando un complejo |
| S6K1 | GRMZM2G080001 | Zm00001d022434 | AT3G08720; AT3G08730 | Cinasa que induce hiperrfosforilación en S6rp |
| S6rp | GRMZM2G054136 | Zm00001d022180 | AT4G31700.1 | Proteína de la subunidad ribosomal 40S |
| eIF3h-1 | GRMZM2G028945 | Zm00001d025193 | AT1G10840.1 | Subunidad del factor 3 de inicio de la traducción en plantas |
| ROP4 | GRMZM2G375002 | Zm00001d018573 | At4g35020.1/Rop6 | GTPasa Rho-like involucrada en ruta de señalización de auxinas |
| ROP2 | GRMZM5G846811 | Zm00001d053899 | At3g51300.1/Rop1 | GTPasa Rho-like involucrada en ruta de señalización de auxinas; participa en la vía TOR |

Una vez seleccionados los genes a estudiar, y mediante el uso de la base de datos Maize eFP Browser y la información proporcionada por Sekhon et al., 2011, se analizaron *in silico* los niveles de expresión para cada gen en embriogénesis cigótica y semillas germinadas (Tabla 5, Anexo 1).

Tabla 5. Nivel de expresión de los genes de interés. Se analizaron *in silico* los niveles de expresión reportados en la base de datos eEF Browser para maíz: DDP; Días después de la polinización, DDS; Días después de la siembra. Los números corresponden a valores de expresión absoluta.

| Gen | Niveles de expresión (eFP Browser) | | |
|---------|------------------------------------|---------|----------|
| | 24 DDP | 1 DDS | 6 DDS |
| VPS34 | 8146.6 | 9383.74 | 5453.54 |
| PTEN | 6223.3 | 7253.2 | 8990.38 |
| PDK1 | 2843.32 | 1453.88 | 3323.65 |
| TOR | 4084.72 | 977.74 | 2681.99 |
| RAPTOR | 5159.35 | 2612.04 | 3386.27 |
| LST8 | 5279.43 | 2836.12 | 3608.72 |
| S6K1 | 3299.63 | 352.14 | 646.53 |
| S6rp | 20903.56 | 20511.2 | 26624.76 |
| eIF3h-1 | 15930.7 | 8617.31 | 15649.5 |
| ROP4 | 655.44 | 524.02 | 716.68 |
| ROP2 | 10683.7 | 7094.01 | 7387.65 |

Para finalizar el análisis se hizo la búsqueda de los genes en el genoma de maíz actualizado B73_AGPv4 (MaizeGDB; <https://www.maizegdb.org>) para identificar el número de acceso correspondiente. En la base de datos actualizada para cada secuencia se sugieren los genes ortólogos de otras especies, incluyendo Arabidopsis. En la mayoría de los casos, las sugerencias coinciden con el análisis que realizamos mediante BLAST. Sin embargo, para las GTPasas ROP, se sugiere que ROP4 de maíz podría ser ortólogo de ROP6, mientras que ROP2 sería ROP1 en Arabidopsis. No obstante, dada la elevada identidad con otros genes ROP, es difícil discernir únicamente por el análisis *in silico* la ortología exacta.

9.2. Estandarización del proceso de extracción del RNA de ejes embrionarios

Para obtener ejes embrionarios a partir de semillas secas se seleccionaron semillas que presentaran características similares como testa íntegra y sin hongos (0 h; Figura 12, panel A). Para la imbibición por 24 h se seleccionaron las semillas cuya radícula hubiese protruido (germinación completada); para las imbibidas por 48 h se seleccionaron aquellas semillas cuya longitud de raíz principal y coleóptilo fueran

similares, así como la presencia de raíces nodales (Figura 12, panel B). De los ejes embrionarios disectados se procedió a la extracción de RNA.

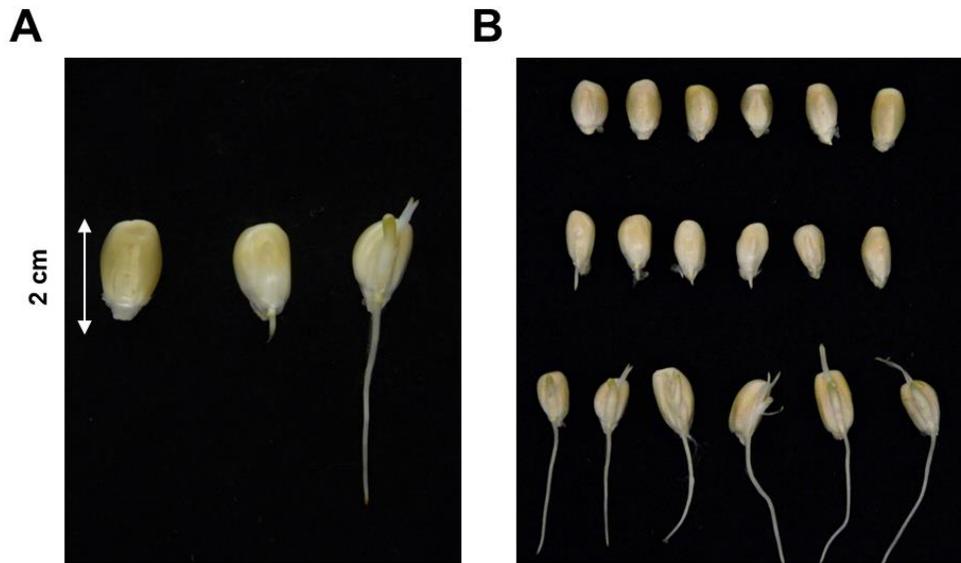
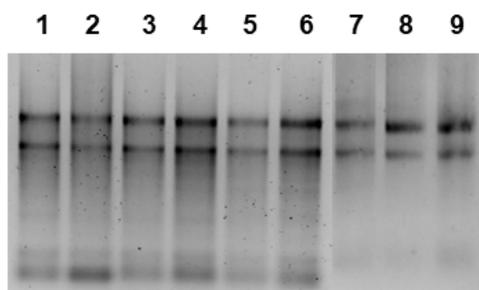


Figura 12. Fenotipo de las semillas de maíz de la raza Chalqueño en los tiempos establecidos después de la imbibición. A. Semilla seca (0 horas después de la imbibición), semilla a las 24 horas después de la imbibición y semilla a las 48 horas después de la imbibición, de izquierda a derecha respectivamente. B. De arriba abajo, semillas secas, semillas a las 24 horas después de la imbibición y semillas a las 48 horas después de la imbibición.

En las primeras extracciones de RNA se utilizó la cantidad suficiente de ejes embrionarios para coleccionar aproximadamente 100 mg de tejido. Dado que tanto el tamaño del eje embrionario, como su estado de hidratación contribuyen al peso total, el número de ejes fue diferente para cada tiempo de imbibición: en el caso de los ejes embrionarios de 0 horas fueron necesarios aproximadamente de 10 a 12 ejes, para 24 h de imbibición se utilizaron entre 5 y 6 ejes y para las 48 h se tomaron de 1 a 2 ejes. Siendo que el número de ejes tomados para las 48 h después de la imbibición representaba un valor muy bajo de individuos y considerando la variabilidad de los ejes embrionarios respecto a la germinación y desarrollo, para las réplicas biológicas *b* y *c* se decidió aumentar el número de ejes utilizados en la extracción de RNA a aproximadamente 6 ejes. Tras la molienda total se dividió el tejido pulverizado en muestras con un peso aproximado de 100 mg.

Una vez obtenido el RNA total, se verificó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa. En la Figura 13, Panel A se muestra un ejemplo del RNA extraído a partir de cada tiempo de imbibición, así como los valores de concentración para cada una de las réplicas biológicas y su pureza representada a través del cociente A_{260}/A_{280} (Figura 13, Panel B). Se observó la separación de los rRNAs 28S y 18S, con una mayor intensidad para la banda de 28S, lo cual corrobora la integridad óptima del RNA de las muestras extraídas. Para eliminar restos de DNA genómico, se trató el RNA con una enzima DNasa y se purificaron las muestras con el uso de columnas comerciales, verificando nuevamente integridad y concentraciones del RNA purificado (Figura 13; panel B). La pureza del RNA (eliminación de proteínas) se verificó mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm (≥ 2).

A



B

| Réplica | RNA total | | | RNA purificado | | |
|---------|-----------|-----------------------|-----------|----------------|-----------------------|-----------|
| | Muestra | Concentración (ng/μl) | A 260/280 | Muestra | Concentración (ng/μl) | A 260/280 |
| b | 0 | 2581.8 | 1.98 | 0 | 237.0 | 2.14 |
| | 24 | 2643.7 | 2.02 | 24 | 123.3 | 2.16 |
| | 48 | 2564.9 | 2.04 | 48 | 119.9 | 2.17 |
| c | 0 | 3780.0 | 2.06 | 0 | 322.9 | 2.16 |
| | 24 | 726.8 | 2.06 | 24 | 250.5 | 2.16 |
| | 48 | 2091.0 | 1.98 | 48 | 303.0 | 2.15 |

Figura 13. Integridad y concentración de RNA. Se muestran los datos de RNA para las réplicas *b* y *c*. A. Gel de agarosa al 1.5% y tinción con bromuro de etidio, se cargaron aproximadamente 500 ng de RNA en cada pozo. Los carriles del 1 al 6 corresponden a muestras de RNA de la réplica biológica *b*, del 7 al 9 a muestras de RNA de la réplica biológica *c*. 1, 2 y 7 (0h), 3, 4 y 8 (24 h), 5, 6 y 9 (48 h). De estas muestras se seleccionaron para su purificación las muestras 2, 4, 6, 7, 8 y 9. B.

Valores de concentración de las muestras de RNA seleccionadas antes y después de la purificación, así como el valor del cociente de pureza A_{260}/A_{280} .

Para corroborar la ausencia de DNA en las muestras de RNA purificado de las réplicas biológicas, se realizaron reacciones de PCR directamente con el RNA, sin realizar previamente la inverso transcripción (-RT) donde se añadió 1 μ L de RNA purificado por reacción, las concentraciones del RNA se encuentran en la Figura 13, panel B.

El resultado de estas pruebas se presenta en la Figura 14.

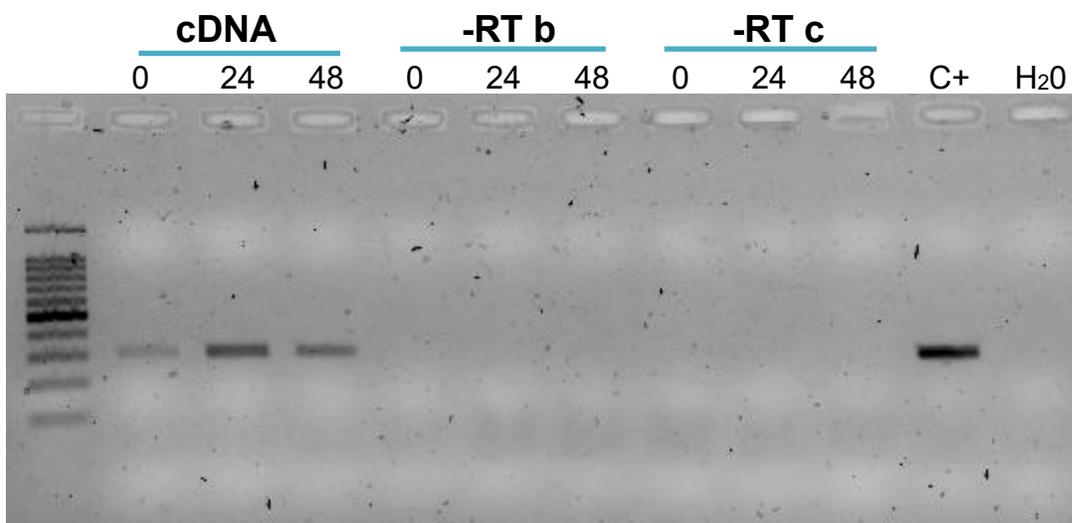


Figura 14. Prueba del funcionamiento del cDNA sintetizado y ausencia de DNA (-RT) en las muestras purificadas de RNA. El cDNA, proveniente de las muestras de RNA purificadas de la réplica *b*, fue probado mediante reacciones de PCR utilizando los cebadores diseñados para la cinasa S6K. Para las pruebas -RT, réplica *b* y *c* respectivamente, también se utilizaron los cebadores de S6K en las reacciones de PCR donde se agregó 1 μ L de RNA purificado por cada reacción. El control positivo se realizó a partir de cDNA probado anteriormente.

9.3. Expresión de los componentes de la vía TOR a nivel de transcrito durante la germinación y establecimiento de la plántula

El RNA obtenido y purificado de cada réplica se usó para reacciones de transcripción reversa que resultaron en la síntesis de cDNA, este material genético sirvió para poder visualizar la presencia de los componentes de la vía TOR, a nivel

de transcrito mediante el uso de geles de agarosa donde fueron corridos los productos amplificados en las reacciones de PCR.

La réplica *a* fue realizada como una prueba piloto para verificar el funcionamiento de los cebadores diseñados para genes de la vía TOR y para poder estandarizar el protocolo a seguir en las reacciones de PCR para cada componente, ya que algunos mRNAs eran muy abundantes (rpS6, S6K), mientras que otros se encontraban a niveles bajos. En algunos casos no fue posible amplificar fragmentos en las muestras correspondientes a la réplica piloto *a* (PDK1 y eIF3h).

En el caso de las réplicas *b* y *c*, fue posible amplificar el transcrito de cada uno de los componentes de la vía propuesta para TOR en plantas y en cada tiempo de imbibición establecido. Además, para cada réplica biológica se hicieron a su vez distintas réplicas técnicas para poder establecer la abundancia promedio de los transcritos. Un ejemplo de los productos amplificados a través de estas reacciones de PCR para cada réplica se muestra en la Figura 15. También fue posible establecer las diluciones de cDNA óptimas para cada componente, al igual que los ciclos de amplificación (punto final).

Considerando que el cDNA sintetizado se encuentra en un volumen de 20 μ L, y que se utilizó un microlitro de las diluciones establecidas en la Tabla 3 de este mismo cDNA, se necesitaron de aproximadamente 5 ng de cDNA y 30 ciclos de amplificación para los genes: VPS34, TOR, RAPTOR, S6K, S6rp y 18S. ROP2 y ROP4 se amplificaron con 35 ciclos, mientras que PTEN, PDK1, LST8 y eIF3h se realizaron a partir de 50 ng de cDNA y 35 ciclos de amplificación.

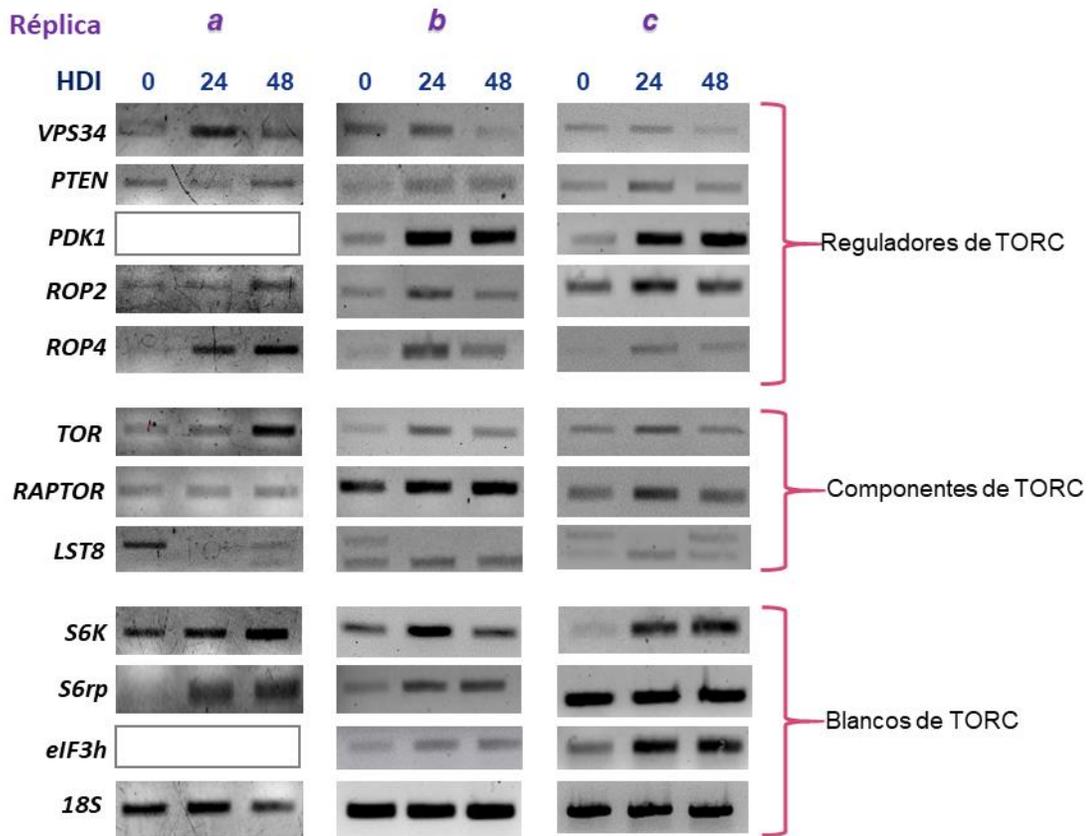
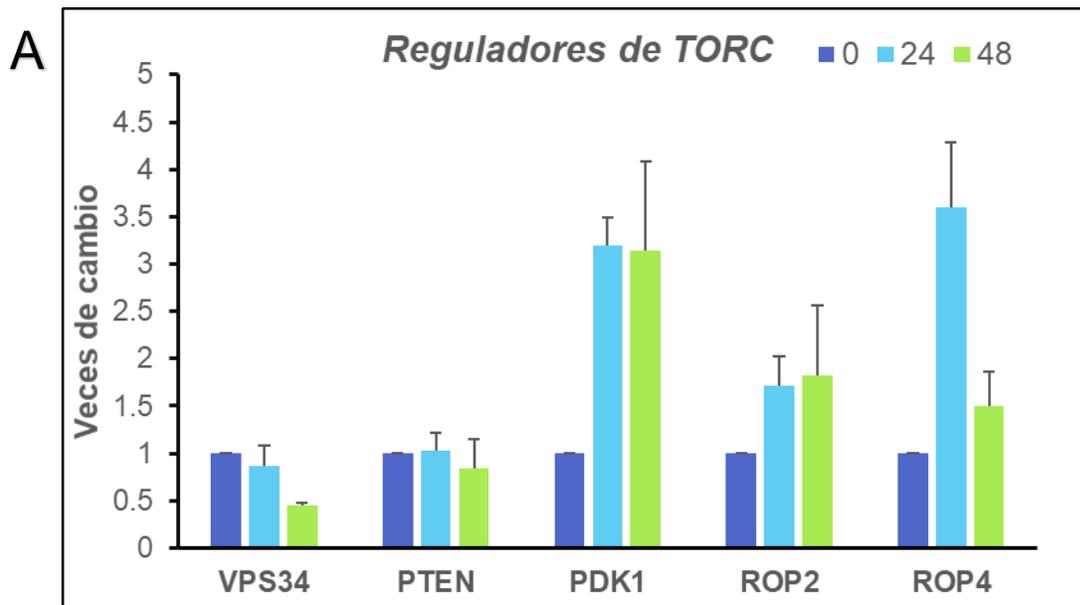


Figura 15. Abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR en maíz. Se realizó la amplificación de regiones específicas para cada gen mediante RT-PCR punto final. Se visualizaron los productos mediante geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. **HDI:** horas de imbibición de las semillas. El rRNA18S se utilizó para normalizar la abundancia. **Réplica a;** Prueba realizada para verificar el funcionamiento de los oligos y estandarización del procedimiento, **Réplica b;** primera réplica biológica, **Réplica c;** segunda réplica biológica. Los recuadros vacíos indican que no se logró amplificación en la primer prueba.

Realizando un análisis cualitativo del comportamiento de transcritos correspondientes a cada componente de la vía en las distintas réplicas, es posible apreciar que ciertos componentes incrementan la abundancia de transcritos en mayor medida a partir de las 24 horas de imbibición. Tal es el caso de PDK1, ROP4, rpS6, mientras que otros presentaron mayor abundancia en semilla seca y sus niveles se redujeron conforme transcurría el tiempo de imbibición, como fue VPS34. Otros elementos presentaron niveles de transcritos relativamente constantes a lo largo de los tiempos de

imbibición, como RAPTOR y LST8. Para evaluar las tendencias observadas para cada componente, se realizó la amplificación de diferentes réplicas técnicas para las dos réplicas biológicas donde se habían utilizado un número mayor de individuos (semillas con sus correspondientes ejes embrionarios). Se midió la intensidad de las bandas mediante Image Lab y esta fue normalizada en cada caso por la correspondiente a 18S rRNA y se representó como abundancia promedio de cada transcrito en el tiempo de imbibición correspondiente. Para LST8 se tomó en cuenta la intensidad de las dos bandas amplificadas si era el caso. La presencia de dos bandas apoya la propuesta de un splicing alternativo en la anotación actual del genoma de maíz, que generaría dos proteínas que difieren solamente en su extremo amino terminal (ver Anexo 2).

Se determinaron las veces de cambio para las muestras correspondientes a 24 h y 48 h después de la imbibición respecto a los valores obtenidos para ejes embrionarios secos (0 h) para cada componente de la vía (Figura 16).



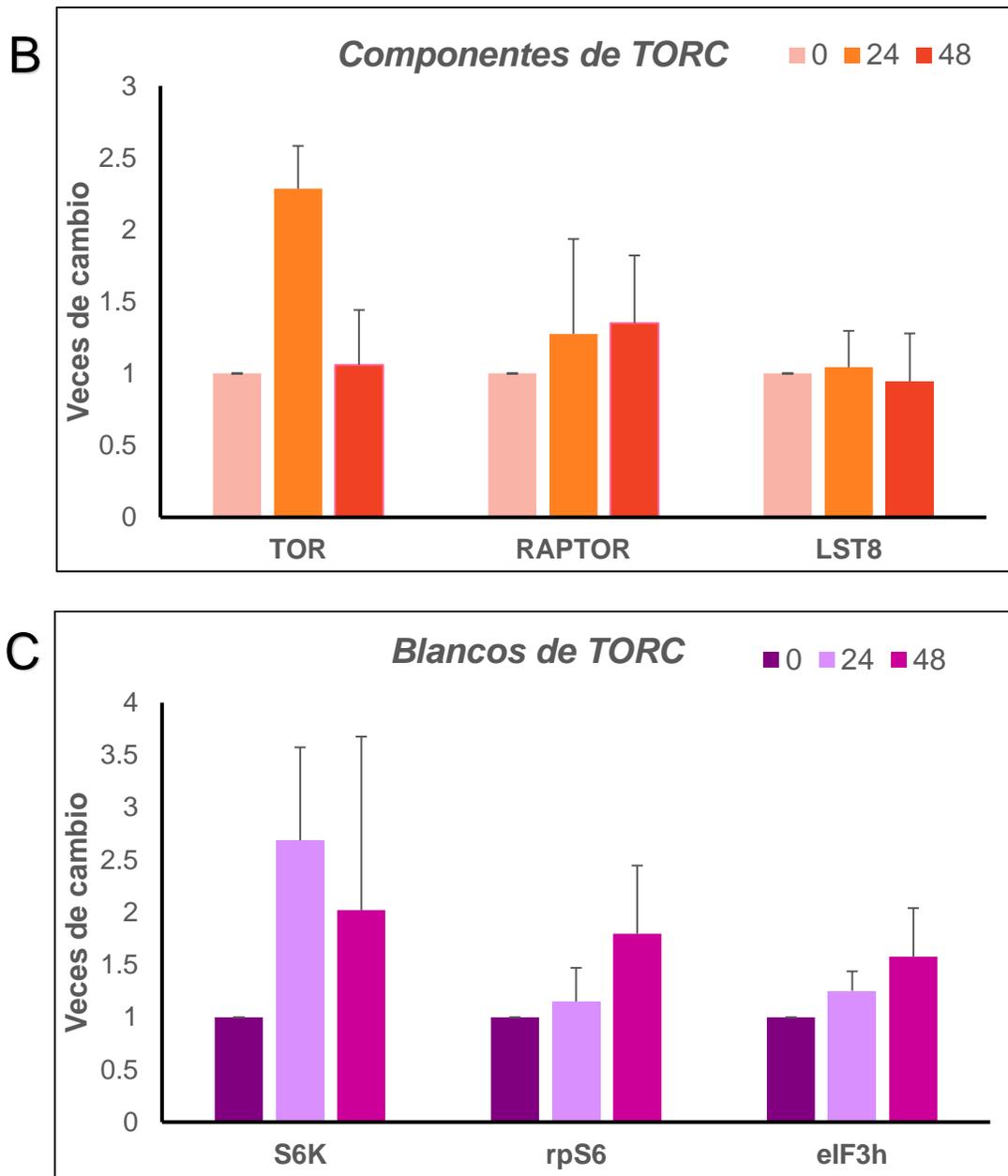


Figura 16. Cambios en la abundancia de los transcritos de la vía TOR durante la germinación en maíz. Gráficos donde se representa las veces de cambio respecto a la abundancia del transcrito en semilla seca para cada uno de los componentes de la vía TOR. A) Patrón de abundancia de los transcritos correspondientes a los reguladores de la vía TOR en plantas. B) Patrón de abundancia de los transcritos correspondientes a los componentes del complejo de TOR. C) Patrón de abundancia de los transcritos correspondientes a los blancos de TORC en plantas.

En los gráficos es posible visualizar un comportamiento contrastante entre los diferentes reguladores propuestos para la vía TOR en plantas. VPS34 tiene una tendencia a disminuir durante el establecimiento de la plántula (48 h), mientras que PTEN se mantiene aproximadamente constante. Los genes que mostraron un incremento en su acumulación a partir de las 24 horas de imbibición son PDK1 y las GTPasas ROP2 y ROP4, que son reguladores positivos del complejo TORC1. Cabe recalcar que existe una diferencia en la expresión entre estos dos últimos componentes que radica principalmente en la poca expresión de ROP4 en semilla seca (Figura 15) y que se ve reflejado en la diferencia de intensidad de la banda entre semilla seca y 24 horas después de la imbibición visualizado a través del gráfico correspondiente. De estos dos componentes, es precisamente ROP4 de maíz quien presenta una mayor identidad a nivel de aminoácidos con ROP2 de *Arabidopsis thaliana* reportado como activador de TOR en respuesta a auxinas.

Dado que los componentes de TORC1, además de TOR, no se habían evaluado previamente en maíz era importante ver si su expresión/abundancia, al menos a nivel transcrito seguían patrones semejantes. En el caso específico de TOR, éste presentó un incremento considerable en su abundancia a las 24 horas después de la imbibición. Este incremento no fue observado para los otros dos componentes del complejo, RAPTOR y LST8, quienes mantuvieron niveles semejantes a lo largo de la imbibición. Por otra parte, TOR disminuyó sus niveles de transcrito a 48 h de imbibición. Se sabe que es necesaria la presencia de los tres elementos en conjunto para el correcto funcionamiento del complejo, pero no se ha descrito el tipo de regulación que pueda tener cada elemento.

9.4 Análisis de la expresión de los componentes de la vía TOR durante la inducción de embriogénesis somática en maíz

Se trabajó con RNA extraído y purificado, de la misma manera que con los ejes embrionarios, proveniente de embriones de maíz y de callos embriogénicos obtenidos a partir de la inducción de callos de estos mismos embriones. Se sintetizó

cDNA a partir del RNA purificado para posteriormente visualizar los productos de amplificación de las reacciones de RT-PCR de cada componente de la vía TOR.

Para este modelo de estudio se requirió de 10 ng de cDNA para todos los genes con excepción de PTEN, PDK1, LST8 y eIF3h quienes necesitaron de 50 ng. Los ciclos necesarios en las reacciones de PCR fueron los mismos que los indicados para el análisis en ejes embrionarios. Sólo se realizó una réplica biológica, un ejemplo de los productos amplificados a través de estas reacciones de PCR para cada réplica se muestra en la Figura 17.

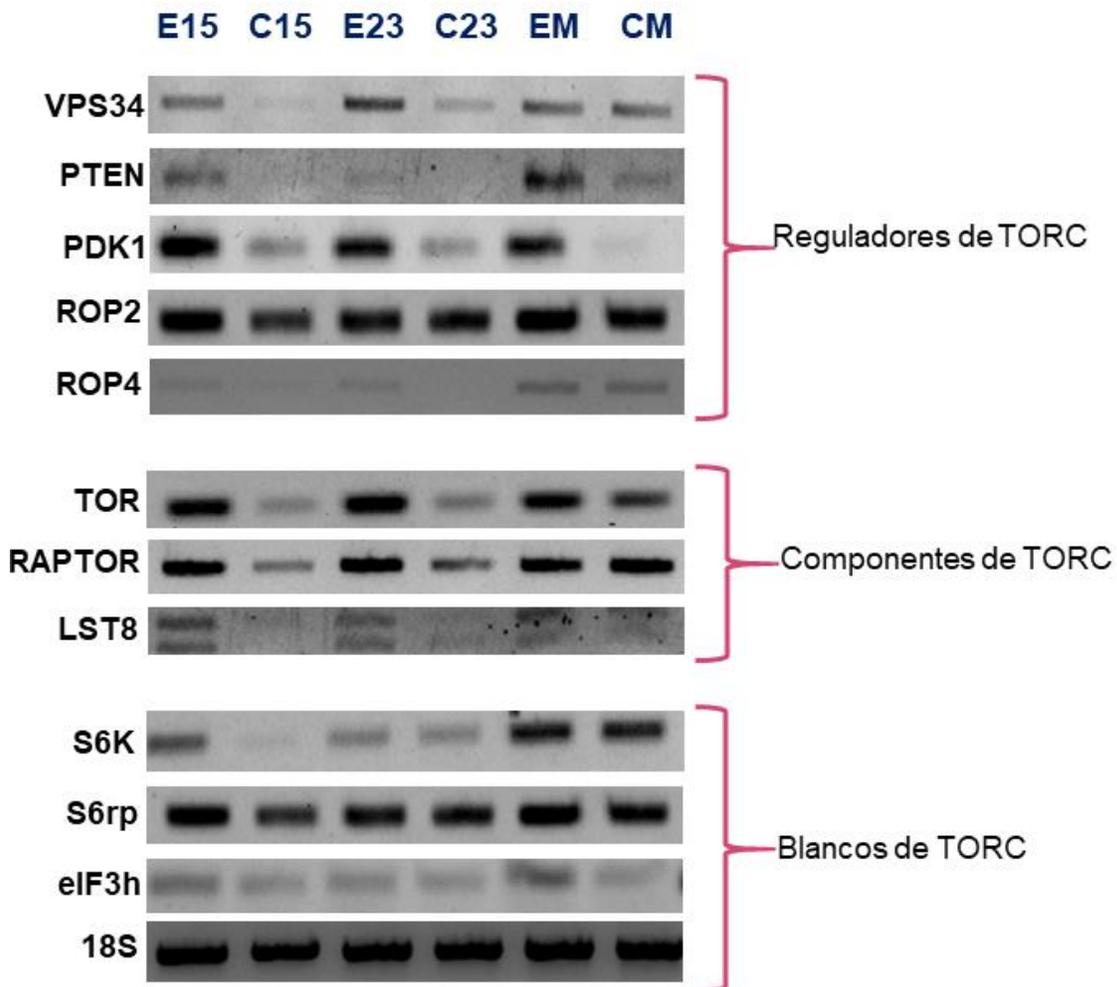


Figura 17. Abundancia de transcritos correspondientes a genes de la vía TOR durante la inducción de embriogénesis somática de maíz. Se realizó la amplificación de regiones específicas

para cada gen mediante RT-PCR punto final. Se visualizaron los productos mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El rRNA18S se utilizó para normalizar la abundancia. E15; embrión inmaduro de 15 DDP. E23; embrión inmaduro de 23 DDP. EM; embrión maduro de 45 DPP. C15; callo proveniente de E15. C23; callo proveniente de E23. CM; callo proveniente de EM.

Al analizar los resultados de manera cualitativa podemos apreciar que todos los transcritos de todos los genes se encuentran presentes en los embriones, mientras que en los callos su abundancia cambia. Transcritos como ROP2 y S6rp presentaron un alto nivel de expresión en todas las muestras, aunque parece haber una mínima disminución en sus niveles en las muestras de C15 y C23.

Algo interesante a señalar es que hay una alta expresión de todos los componentes de la vía en embriones inmaduros (E15 y E23) que disminuye durante la inducción de callos. Sin embargo, en el caso de inducción a partir de embriones maduros (EM) este comportamiento de disminución sólo es claramente visible para PTEN, PDK1, TOR y eIF3h.

Al comparar las muestras de embriones entre sí, los genes que presentan un nivel de expresión similar son TOR, RAPTOR y LST8; VPS34 tiene un aumento en E23 y disminuye en EM; ROP4 mantiene un bajo nivel de expresión en E15 y E23 pero presenta aumento en EM. PTEN, S6K y eIF3h presentaron una ligera disminución en su abundancia en E23 y un aumento en EM.

En cuanto a las muestras de callos, para VPS34, TOR, RAPTOR, LST8 y S6K es evidente que presentan menores niveles en C15 y mayores en CM. Solamente PDK1 presenta un comportamiento inverso, observándose que en CM prácticamente no hay transcrito. PTEN y ROP4 no muestran transcrito detectable en C15 y C23, mientras que en CM se detecta. Por último, los genes de ROP2, S6rp y eIF3h son los que presentan menos cambios en abundancia durante el proceso de inducción de callos para cualquiera de los explantes.

Aunque es necesario contar con más réplicas en este análisis, fue evidente que la presencia de elevadas concentraciones de 2,4-D, una auxina sintética utilizada en

el proceso de inducción de callos para la embriogénesis somática de maíz, modifica la expresión de componentes de la vía TOR, particularmente en el caso de embriones inmaduros que pueden lograr de manera exitosa el proceso de desdiferenciación.

10. Discusión de resultados

La regulación del crecimiento y desarrollo en eucariontes es un proceso complejo que depende de la suma de diversas variables, entre los cuales se encuentran nutrientes, reguladores del crecimiento y factores ambientales. Las plantas, al ser organismos inmóviles y autotróficos, necesitan ajustar constantemente este proceso de desarrollo dependiendo de señales como luz, agua y disponibilidad de iones.

Al establecer la influencia de TOR en el desarrollo de prácticamente todos los organismos eucariontes, y ratificar que su actividad depende de un conjunto de señalizaciones, se han establecido vías en las que esta cinasa actúa, dependiendo de cada organismo. De aquí surge la incógnita de cuáles son los elementos que participan en estas vías, especialmente en plantas de relevancia agrícola, dado que su conocimiento hasta el momento es escaso.

Partiendo de investigaciones previas y de lo que se ha descrito hasta el momento sobre la vía TOR en *Arabidopsis thaliana* se planteó conocer cómo se encuentran conservados los elementos de la vía en maíz y cuál es su nivel de expresión durante las etapas de germinación y crecimiento de la plántula. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la abundancia de transcrito para la mayoría de los elementos de la vía a partir de las 24h de imbibición, exceptuando a PTEN, RAPTOR y LST8 que mantuvieron abundancias similares a las observadas en el eje embrionario seco. Sólo VPS34 presentó una tendencia a disminuir la abundancia de transcrito durante el establecimiento de la plántula.

Se considera que el tiempo de 24h de imbibición durante la germinación de maíz representa justo la etapa previa al inicio de elongación y división celular activos (Díaz-Granados et al., 2020). Al final de este tiempo, la transcripción y traducción

de nuevos mRNAs requeridos para etapas post-germinativas se habrán activado, lo que a su vez promoverá el crecimiento de la plántula (Bewley, 1997).

El comportamiento presentado por TOR en esta etapa de la germinación y la subsecuente activación de la ruta río abajo, ya había sido descrita en publicaciones previas (Agredano-Moreno et al., 2007; Dinkova et al., 2007), por lo que los resultados obtenidos en este proyecto para estos genes concuerdan con una activación transcripcional a las 24h después de la imbibición. Los niveles de TOR y de S6K tienden a disminuir en etapas post-germinativas, sugiriendo que su presencia podría restringirse a ciertas zonas o tejidos en crecimiento activo de la plántula. Sin embargo, también es posible que la variabilidad biológica y número de individuos analizados interfiera con el resultado, ya que se observó una elevada desviación estándar entre las muestras. Por otra parte, elementos río debajo de S6K, como rpS6 y eIF3h, presentaron una tendencia hacia aumentar a las 48h de imbibición.

Para el factor de inicio de la traducción, eIF3h, se necesitó de una mayor cantidad de cDNA para poder visualizar su expresión tanto en germinación como en inducción de embriogénesis somática. Habría que considerar que tanto en Arabidopsis, como en maíz hay más de un gen para este factor, por lo que sería necesario analizar cual(es) participa(n) en la vía TOR. Por otra parte, la información disponible sobre la regulación de eIF3h por TOR-S6K es a nivel post-traducciona (Schepetilnikove et al., 2013) y no hay datos sobre su regulación a nivel de transcrito.

La información sobre reguladores río arriba de TOR es limitada, ya que muchos de los intermediarios de señalización descritos para animales no se han encontrado en plantas o su función es diferente. Un hallazgo importante, fue el papel de GTPasas ROP en la activación de TOR (Schepetilnikov & Ryabova, 2018). Se describió que la señalización por auxinas resulta en la activación de ROP2 quien a su vez interactúa con TOR para activarlo y promover el reinicio de la traducción en transcritos correspondientes a factores de respuesta a auxinas que llevan uORFs en su 5'UTR (Schepetilnikov et al., 2017).

En *Arabidopsis*, ROP2, ROP4 y ROP6 pertenecen al mismo sub-grupo de pequeñas GTPasas “Rho-like” y muestran interacción con TOR. En maíz, tanto ROP2 como ROP4 pertenecen al mismo grupo acorde a su secuencia (Christensen et al., 2003). No obstante, acorde a su patrón de expresión y posible función, se propuso que ZmROP4 pudiera ser ortólogo de AtROP2, mientras que ZmROP2 correspondería a AtROP1 por su elevada expresión en polen. Nuestros resultados indican que tanto ROP2 como ROP4 incrementan su abundancia en transcrito a las 24h de imbibición correspondiendo con el incremento de elementos de la vía TOR río debajo. Sin embargo, el transcrito ROP4 presenta una disminución a las 48h que coincide con el comportamiento presentado por TOR, mientras que ROP2 mantiene su nivel. Asimismo, en el análisis de embriones y callos de maíz, los patrones de expresión entre ROP4 y ROP2 difieren, siendo el perfil de transcrito de ROP4 el de mayor similitud con el perfil de transcritos TOR-S6K (Figura 17). Esto coincide con la sugerencia de una función diferencial para estos ROP (Christensen et al., 2003) y sitúa a ROP4 como mejor candidato para participar río arriba en la activación de TOR en maíz.

La diferencia entre estas dos GTPasas podrían deberse a las funciones que realizan en el organismo, las cuales hasta el momento no se han establecido, pero si se ha descrito que las nueve ROP de maíz se expresan abundantemente en tejidos con división y/o expansión celular rápida, mientras que en células especializadas muestran patrones de expresión diferenciales (Christensen et al., 2003).

Por otro lado, se encuentra la cinasa VPS34 con un patrón de expresión a la inversa del resto de componentes de la vía TOR en germinación, ya que mostró poco cambio entre 0h y 24h de imbibición, pero a las 48h se observó una importante disminución en su abundancia (Figura 16). En mamíferos se describió que esta cinasa no presentaba efecto sobre AKT o TSC, componentes río arriba de TOR, aunque si tenía un efecto sobre la activación de S6K en respuesta a estímulos como glucosa, sugiriendo que probablemente esta cinasa actúa al mismo nivel del complejo TOR (Byfield et al., 2005). En plantas, a través de la expresión de construcciones antisentido de AtVPS34, se corroboró que esta cinasa es esencial

para el crecimiento, observándose defectos sustanciales en el crecimiento y desarrollo de una segunda generación de plantas transformadas (Welters et al., 1994). Acorde a su patrón de expresión en embriones y callos inducidos (Figura 17), se podría proponer un rol de VPS34 en el proceso de embriogénesis similar a elementos clave de la vía TOR, pero diferente al observado en el proceso de germinación. VPS34 se ha involucrado en autofagia y tráfico vesicular de plantas (Chung, 2019), funciones biológicas que tienen relación con TOR, al menos en levadura y animales. Sería importante explorar a futuro su conexión con TOR mediante mutantes de *Arabidopsis thaliana*, tanto en germinación como en inducción de embriogénesis somática.

Al no observar coincidencia entre el perfil de VPS34 y TOR durante la germinación, resulta interesante el análisis del comportamiento de PTEN y PDK1, ya que hipotéticamente los tres componentes se encuentran relacionados. El patrón presentado por PTEN nos indica un comportamiento estable a lo largo de la germinación y establecimiento de la plántula, mientras que PDK1 tiene un aumento considerable en su acumulación a partir de las 24 horas lo que correspondería con el perfil de expresión del eje TOR-S6K. Dado que PTEN se propone como inhibidor en la activación de PDK1, su poco cambio correspondería con promover la activación de la vía.

En mamíferos se ha estudiado ampliamente el rol de PTEN dentro de la vía TOR, destacándose como un supresor de la actividad de PI3K/AKT mediante su actividad fosfatasa contra PtdIns(3,4,5)P₃. En *Arabidopsis* se ha establecido la presencia de más de un gen PTEN, AtPTEN1 ha demostrado tener actividad *in vitro* en la desfosforilación de PtdIns(3,4,5)P₃ y su expresión se ha encontrado mayormente localizada en granos de polen (Gupta et al., 2002), pero hasta el momento no se han localizado *in vivo* ni el sustrato ni alguna enzima PI3K de clase I capaz de sintetizarlo en plantas.

Por otra parte, se encuentran los genes denominados AtPTEN2a y AtPTEN2b quienes presentan una mayor afinidad como sustrato al PtdIns3P. Pribat et al., 2012 nos presenta un análisis filogenético de cómo es que esta fosfatasa podría haber

evolucionado funcionalmente en plantas, el patrón filogenético obtenido sugiere que aproximadamente hace 400 millones de años este gen sufrió una duplicación dando lugar a dos clados, PTEN1 y PTEN2. Las plantas angiospermas dicotiledóneas (como *Arabidopsis*) retuvieron estos dos clados mientras que las monocotiledóneas parecen haber perdido a PTEN1 (como el maíz).

Suponiendo que así fuera el caso para esta fosfatasa en maíz y que su afinidad sea realmente mayor hacia PtdIns3P, podría ser que si tuviera una función de inhibición dentro de la vía y que, tomando en consideración el estadio de desarrollo y la alta actividad de la vía en estos tiempos, no sea necesaria su actividad y por esta razón sus niveles se encuentren estables durante la germinación.

Ahora bien, el caso de PDK1 es particular dado que a partir de las 24h la abundancia del transcrito aumenta de manera considerable, lo interesante radica en que este fue uno de los componentes de la vía que requirió de mayor cantidad de cDNA para su visualización a través de geles de electroforesis. Cuando analizamos la Figura 15, podemos ver claramente como a las 0h su nivel resulta bastante más reducido que a las 24h, es por esta razón que se requirió de mayor concentración de cDNA para poder finalmente percibir de manera clara los tres tiempos.

Sin embargo, su patrón de expresión parece corresponder con TOR y S6K presentando una alta acumulación a las 24h y manteniendo este mismo nivel a las 48h. La relación de PDK1 con estos elementos, especialmente con S6K, ha sido explorada en *Arabidopsis* donde se ha comprobado como PDK1 fosforila de manera directa a esta cinasa relacionando así a esta proteína con el crecimiento de la planta (Anthony et al., 2004; Mahfouz et al., 2006; Otterhag et al., 2006).

Algo interesante que se evidenció en este trabajo es la poca correspondencia entre los perfiles de expresión de RAPTOR, LST8 y TOR, los tres componentes de TORC1. RAPTOR y LST8 no presentaron cambios reproducibles en su abundancia entre 0h y 48h de imbibición, a diferencia de TOR que mostró aumento a las 24h. Lo que sí se observó a las 24h fue la ausencia de amplificación de la banda de mayor tamaño para LST8 que correspondería a un transcrito alternativo propuesto

para este gen en maíz (Anexo 2). Este transcrito produciría una versión más corta de la proteína LST8 de maíz, a la que le faltarían alrededor de 100 aminoácidos de la región amino terminal, ya que por splicing alternativo ocurre una retención de tres intrones, (Anexo 2; T02). Es interesante notar que el fragmento amplificado de menor tamaño, que correspondería al transcrito que da lugar a la versión de LST8 completa (Anexo 2; T01) con mayor identidad a LST8-1 y LST8-2 de Arabidopsis, se observa a 24 y 48 h de imbibición así como en los embriones inmaduros que representan tejidos en proliferación. Por otra parte, esta banda disminuye en ejes secos o en embrión maduro.

Estudios en Arabidopsis revelaron que tanto RAPTOR como LST8 tienen una función importante en la regulación del crecimiento de las plantas dado que sus mutantes presentan defectos en el desarrollo (Deprost et al., 2005; Moreau et al., 2012), y ha quedado claro que ambas presentan algún tipo de interacción con los dominios de TOR (Díaz-Troya et al., 2008; Mahfouz et al., 2006). No obstante, faltan estudios detallados sobre los niveles de expresión de estos componentes, aún para Arabidopsis. Curiosamente en Arabidopsis hay dos genes codificantes para RAPTOR (RAPTOR1A y RAPTOR1B) y para LST8 (LST8-1 y LST8-2), mientras que en maíz solamente se encontró un gen para cada uno. Las mutantes que presentaron defectos de desarrollo fueron las correspondientes *raptor1b* y *lst8-1*. En este contexto, nuestros resultados sugieren que la regulación de la formación del complejo TORC1 en maíz podría diferir de lo reportado en Arabidopsis, dado que la expresión y procesamiento del transcrito de LST8 sugiere un rol regulatorio para el complejo durante la germinación.

El análisis de los resultados obtenidos durante la inducción de callos embriogénicos de maíz por elevadas concentraciones de la auxina sintética 2,4-D resulta particularmente interesante debido a que hay una clara disminución en la expresión de prácticamente todos los elementos de la vía TOR en callos, particularmente a partir del tejido de embriones inmaduros. Los únicos que no presentaron de manera tan clara este comportamiento fueron ROP2 y S6rp con una abundancia más o menos constante. La inducción de tejidos desdiferenciados (callos) durante la

embriogénesis somática, permite modificar el patrón de expresión genética de células somáticas para dar paso a la embriogénesis y regeneración de plantas. A partir de Juárez-González et al., 2019 se demostró el estadio de desarrollo que presentan las muestras analizadas, revelando que E15 y E23 aún se encuentran en continuo crecimiento, mientras que EM, representa el desarrollo embrionario completo y el inicio de desecación de la semilla. El potencial embriogénico de C23 y CM es considerablemente menor al presentado por C15, dado que presentan tejidos no embriogénicos con altos niveles de oxidación. Además, C15 fue el único tejido que dio lugar a callos en proliferación por más de 6 meses y que fueron capaces de regenerar plantas (Juárez-González et al., 2019).

El análisis de la vía TOR en este proceso, permitió visualizar una clara modificación en la expresión de estos genes, que coincide con la capacidad de reprogramar el tejido hacia la desdiferenciación celular. En particular, se observó que la expresión de todos los componentes de vía TOR está activa durante la embriogénesis cigótica y que el estímulo de inducción se traduce en una reducción de la expresión. Esto es necesario para frenar la proliferación que se venía dando en el embrión y dar paso al proceso de desdiferenciación. Sería interesante comparar los perfiles a tiempos posteriores, en el establecimiento de los callos, donde la proliferación nuevamente se encuentra muy activa. Se pudo comprobar que el tejido de EM muestra mucho menor respuesta en la expresión de componentes de la vía, ya que los niveles de expresión fueron similares entre EM y CM para la mayoría de los componentes, exceptuando a PDK1, PTEN y eIF3h. Esto coincide con la incapacidad del tejido para sufrir una reprogramación hacia la desdiferenciación (Juárez-González et al., 2019). Sorprendentemente los niveles de expresión entre C15 y C23 parecen ser muy similares entre sí en todos los elementos de la vía, sugiriendo reducción en la proliferación para ambos tejidos. Sin embargo, la capacidad embriogénica de C23 está seriamente afectada, por lo que probablemente se requieren otros elementos, además de la regulación de la actividad de la vía TOR, para establecer el potencial embriogénico de los callos.

11. Conclusiones

- Los integrantes sugeridos para la vía de TOR en maíz se encuentran presentes a nivel de transcrito tanto durante la germinación como durante la inducción de callos embriogénicos.
- A las 24 horas después de la imbibición de semillas hay un incremento en la abundancia de transcritos para ciertos elementos de la vía, tales como PDK1, ROP2, ROP4, TOR y S6K. Este aumento coincide con la etapa de culminar el proceso de germinación y protrusión de la radícula.
- VPS34 presenta un decremento en la abundancia de su transcrito durante la germinación, mientras que PTEN, RAPTOR y LST8 mantienen niveles constantes. Esto sugiere que VPS34 no participa de manera activa en el estímulo de TOR durante la germinación, mientras que RAPTOR y particularmente LST8 podrían actuar como elementos limitantes en la actividad de TORC1 en este proceso.
- La expresión de los componentes de la vía TOR se ve modificada a la baja en el proceso de inducción de callos respecto al tejido explante de embriones, especialmente para los embriones inmaduros, debido al proceso de desdiferenciación celular.

12. Perspectivas

- Realizar una tercera réplica biológica con sus subsecuentes réplicas técnicas en germinación de maíz para corroborar las tendencias presentadas. Evaluar mediante técnicas cuantitativas los cambios observados.
- Realizar más réplicas técnicas con las muestras procedentes de la inducción de callo embriogénico y evaluar la reproducibilidad mediante análisis semicuantitativo de los resultados de expresión. Evaluar mediante técnicas cuantitativas los cambios observados.
- Confirmar mediante secuenciación que los amplicones de LST8 corresponden a la propuesta de splicing alternativo. Diseñar oligonucleótidos que permitan obtener amplificaciones específicas para cada transcrito y evaluar su abundancia de manera cuantitativa en las etapas de germinación de maíz

13. Referencias

- Agredano-Moreno, L. T., Reyes De La Cruz, H., Martínez-Castilla, L. P., & Sánchez De Jiménez, E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular BioSystems*, 3(11), 794-802. <https://doi.org/10.1039/b705803a>
- Anthony, R. G., Henriques, R., Helfer, A., Mészáros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deák, M., Koncz, C., & Bögre, L. (2004). A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 23(3), 572-581. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600068>
- Backer, J. M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: Novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, 410(1), 1-17. <https://doi.org/10.1042/BJ20071427>
- Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortiz-López, A., Dinkova, T. D., & De Jiménez, E. S. (2002). Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiologia Plantarum*, 115(2), 291-297. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150216.x>
- Bewley, J. D. (1997). *Seed Germination and Dormancy*. 9(July).
- Bjornsti, M. A., & Houghton, P. J. (2004). The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 335-348. <https://doi.org/10.1038/nrc1362>
- Byfield, M. P., Murray, J. T., & Backer, J. M. (2005). HVps34 Is a Nutrient-regulated Lipid Kinase Required for Activation of p70 S6 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 33076-33082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507201200>

- Christensen, T. M., Vejlupkova, Z., Sharma, Y. K., Arthur, K. M., Spatafora, J. W., Albright, C. A., Meeley, R. B., Duvick, J. P., Quatrano, R. S., & Fowler, J. E. (2003). Conserved Subgroups and Developmental Regulation in the Monocot rop Gene Family. *Plant Physiology*, 133(4), 1791-1808. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029900>
- Chung, T. (2019). How phosphoinositides shape autophagy in plant cells. *Plant Science*, 281, 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.017>
- CONABIO. (2020). *Maíces | Biodiversidad Mexicana*. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices>
- De La Cruz, H. R., Aguilar, R., & De Jiménez, E. S. (2004). Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70S6K. *Biochemistry*, 43(2), 533-539. <https://doi.org/10.1021/bi035222z>
- Deprost, Dorothée, Truong, H.-N., Robaglia, C., & Meyer, C. (2005). An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(4), 844-850. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.117>
- Deprost, Dorothee, Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., & Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *Scientific Report*, 1-7. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>
- Díaz-Granados, V. H., López-López, J. M., Flores-Sánchez, J., Olguin-Alor, R., Bedoya-López, A., Dinkova, T. D., Salazar-Díaz, K., Vázquez-Santana, S.,

- Vázquez-Ramos, J. M., & Lara-Núñez, A. (2020). Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.041>
- Díaz-Troya, S., Florencio, F. J., & Crespo, J. L. (2008). Target of Rapamycin and LST8 Proteins Associate with Membranes from the Endoplasmic Reticulum in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 212-222. <https://doi.org/10.1128/EC.00361-07>
- Dibble, C. C., & Cantley, L. C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology*, 25(9), 545-555. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.002>
- Dinkova, T. D., De La Cruz, H. R., García-Flores, C., Aguilar, R., Jiménez-García, L. F., & De Jiménez, E. S. (2007). Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: Relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum*, 130(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00862.x>
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., & Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 261-285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>
- Garrocho-Villegas, V., de Jesús-Olivera, M. T., & Quintanar, E. S. (2012). Maize somatic embryogenesis: Recent features to improve plant regeneration.

- Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 877, 173-182.*
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_14
- Gupta, R., Ting, J. T. L., Sokolov, L. N., Johnson, S. A., & Luan, S. (2002). A Tumor Suppressor Homolog, AtPTEN1, Is Essential for Pollen Development in Arabidopsis. *The Plant Cell, 14(10), 2495-2507.*
<https://doi.org/10.1105/tpc.005702>
- Holz, M. K., & Blenis, J. (2005). *Identification of S6 Kinase 1 as a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) -phosphorylating Kinase **. *280(28), 26089-26093.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M504045200>
- Hong, Y., Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2008). Phospholipase Dα3 Is Involved in the Hyperosmotic Response in Arabidopsis. *The Plant Cell, 20(3), 803-816.*
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.056390>
- Hoseney, R. C. (1991). *Principios de Ciencia y Tecnología de Los Cereales*. Acribia, Editorial, S.A.
- INE, CONABIO, & SAGARPA. (2008). Agrobiodiversidad en México: El caso del Maíz. *Agrobiodiversidad en México: el caso del Maíz, 64-64.*
- Jakubeková, M., Pretová, A., & Obert, B. (2012). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Embryo Induced Callus of Maize (zea Mays L.). *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences; Nitra, 1(4), 478-487.*
- Juárez-González, V. T., López-Ruiz, B. A., Baldrich, P., Luján-Soto, E., Meyers, B. C., & Dinkova, T. D. (2019). The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize

- somatic embryogenesis. *Scientific Reports*, 9(1), 14511.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50962-y>
- Kim, D., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V. P., Erdjument-bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). *G β L*, a Positive Regulator of the Rapamycin- Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *11*, 895-904.
- Lee, Y., Munnik, T., & Lee, Y. (2009). Plant Phosphatidylinositol 3-Kinase. En *Plant Cell Monographs* (Vol. 16, pp. 95-106).
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). *Two TOR Complexes , Only One of which Is Rapamycin Sensitive , Have Distinct Roles in Cell Growth Control*. *10*, 457-468.
- López-Ruiz, Brenda A., Juárez-González, V. T., Luján-Soto, E., & Dinkova, T. D. (2019). The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis. En R. Alvarez-Venegas, C. De-la-Peña, & J. A. Casas-Mollano (Eds.), *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants* (pp. 311-338). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14760-0_12
- López-Ruiz, Brenda Anabel, Juárez-González, V. T., Chávez-Hernández, E. C., & Dinkova, T. D. (2018). MicroRNA Expression and Regulation During Maize Somatic Embryogenesis. En V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 397-410). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_28

- Mahfouz, M. M., Kim, S., Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant Cell*, 18(2), 477-490. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035931>
- Matilla, Á. J. (2008). *Desarrollo y germinación de las semillas*. 23.
- Menand, B., Bouchez, D., Meyer, C., Desnos, T., Nussaume, L., & Robaglia, C. (2002). *Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene*.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 89-118. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne, C., Martin-Magniette, M.-L., Taconnat, L., Renou, J.-P., Robaglia, C., & Meyer, C. (2012). Mutations in the Arabidopsis Homolog of LST8/GβL, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days. *The Plant Cell*, 24(2), 463-481. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091306>

- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Otterhag, L., Gustavsson, N., Alsterfjord, M., Pical, C., Lehrach, H., Gobom, J., & Sommarin, M. (2006). Arabidopsis PDK1: Identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie*, 88(1), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.005>
- Paliwal, R. L., & Nations, F. and A. O. of the U. (2001). *El Maíz en Los Trópicos: Mejoramiento y Producción*. Food & Agriculture Org.
- Pribat, A., Sormani, R., Rousseau-Gueutin, M., Julkowska, M. M., Testerink, C., Joubès, J., Castroviejo, M., Laguerre, M., Meyer, C., Germain, V., & Rothan, C. (2012). A novel class of PTEN protein in Arabidopsis displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *The Biochemical Journal*, 441(1), 161-171. <https://doi.org/10.1042/BJ20110776>
- Rexin, D., Meyer, C., Robaglia, C., & Veit, B. (2015). *TOR signalling in plants*. 1-14. <https://doi.org/10.1042/BJ20150505>
- Romero Aguilar, L. G. S., Guadalupe; Luqueño Bocado, Oscar I.; Pardo, Juan Pablo. (2018). LA CINASA DE RESIDUOS DE SERINA Y TREONINA BLANCO DE LA RAPAMICINA (TORC1) ES ESENCIAL EN EL METABOLISMO CELULAR DE LOS EUKARIOTES. *Revista de educación bioquímica*, 37(1), 4-13.

- Ruggero, D., & Sonenberg, N. (2005). The Akt of translational control. *Oncogene*, 24(50), 7426-7434. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209098>
- Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *The EMBO Journal*, 32(8), 1087-1102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *The EMBO Journal*, 30(7), 1343-1356. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.39>
- Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P., & Ryabova, L. A. (2017). GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *The EMBO Journal*, 36(7), 886-903. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694816>
- Schepetilnikov, M., & Ryabova, L. A. (2018). Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants. *Plant Physiology*, 176(2), 1095-1105. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01243>
- Sekhon, R. S., Lin, H., Childs, K. L., Hansey, C. N., Buell, C. R., de Leon, N., & Kaeppler, S. M. (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 66(4), 553-563. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04527.x>

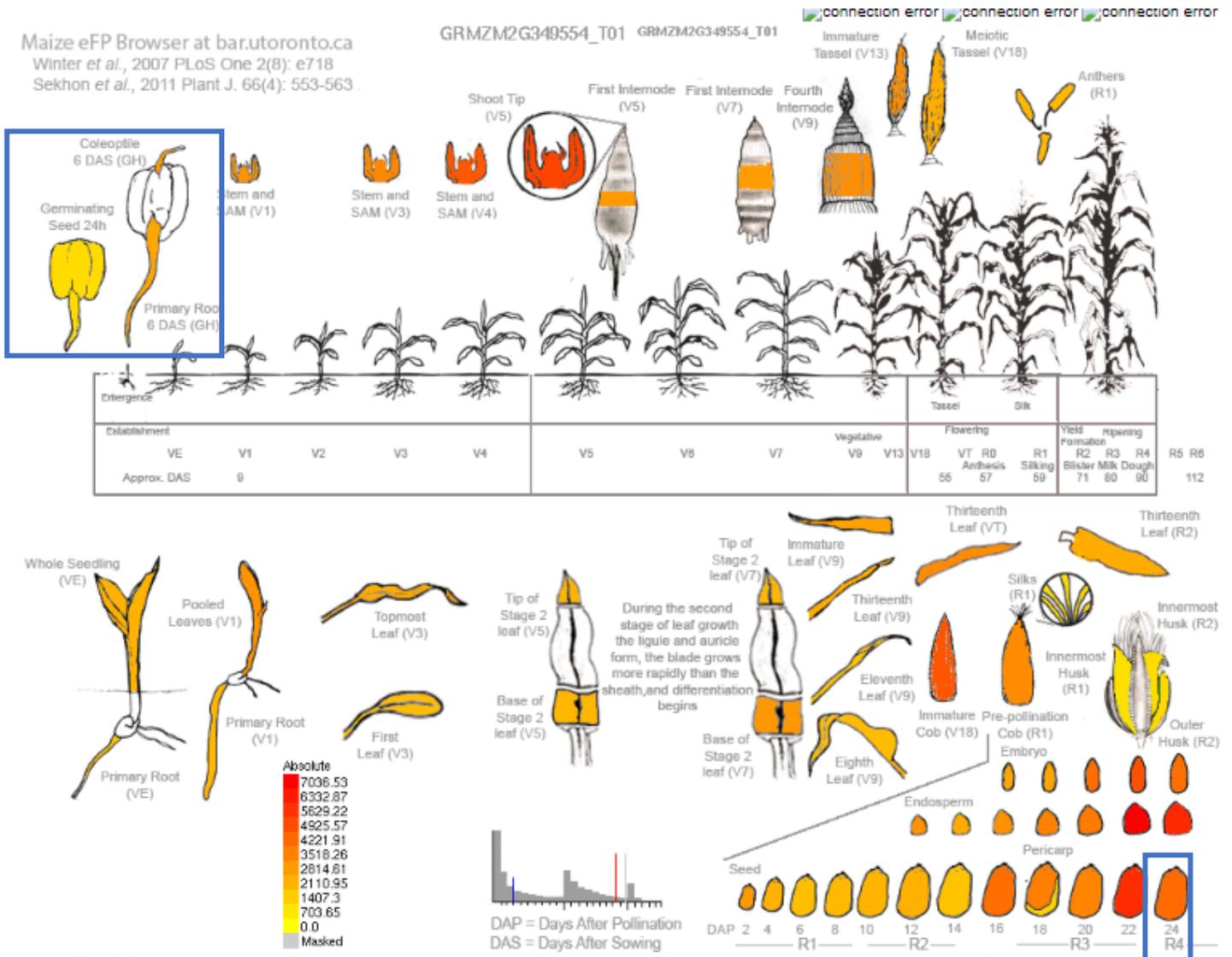
- Shi, L., Wu, Y., & Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: Conservation and innovation. *Development*, 145(13), dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>
- Vincent, P. L. D. (2012). Zea Mays (Maize, Corn). En *ELS*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003687.pub2>
- Welters, P., Takegawao, K., Emr, S. D., & Chrispeels, M. J. (1994). AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of Arabidopsis thaliana, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain (vacuole/prln t rt/yeast come on/ c gene/ant-ene). En *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (Vol. 91, pp. 11398-11402).
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). Review TOR Signaling in Growth and Metabolism. 471-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>
- Xiong, Y., & Sheen, J. (2014). The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism. *Plant Physiology*, 164(2), 499-512. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229948>
- Xiong, Y., & Sheen, J. (2015). Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.006>

- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1), 36-57.
<https://doi.org/10.1080/07352680903436291>
- Yoon, M.-S., Du, G., Backer, J. M., Frohman, M. A., & Chen, J. (2011). Class III PI-3-kinase activates phospholipase D in an amino acid-sensing mTORC1 pathway. *The Journal of Cell Biology*, 195(3), 435-447.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201107033>

14. Anexos

14.1 Anexo 1. Análisis de expresión en EFP Browser de maíz

Se muestran las etapas de desarrollo y tejidos donde se encuentran disponibles los análisis de expresión por secuenciación masiva proporcionados por Sekhon et al., 2011. Marcados en recuadros azules se encuentran las etapas de desarrollo de nuestro interés.



14.2 Anexo 2. Análisis del gen para LST8 en maíz

Se propone un modelo de splicing alternativo en el genoma de referencia B74-4.0.

Zm00001d007577 ([pco120776](#) -) [MaizeGDB curated]

GENE MODEL **SEQUENCE** **PAN-GENE** **GENETIC INFORMATION**

Overview

Gene Model Set: Zm00001d.2, **Assembly version:** Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0

Model Type: protein_coding

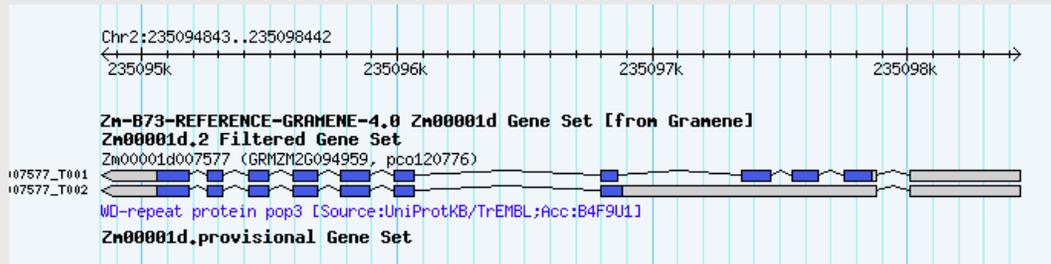
Alternative names: GenBank: [ZEAMMB73_Zm00001d007577](#),

NCBI Gene (Entrez Gene): [100191700](#) ()

Line: B73

History: Introduced in gene model set Zm00001d.1.

Genome Browser: ([Chr2: 235093343..235099942](#))



Canonical Transcript: Zm00001d007577_T002

Canonical Length: 3599bp

Canonical Protein: Zm00001d007577_P002 (GenBank accession: [ONM27115](#))

Metabolic Pathway: There is currently no pathway information available for this gene model.

UniProt accession(s):

Zm00001d007577 - [B4F9U1](#)

Orthologs (Gramene, June 2017)

Sorghum bicolor (Sorghum) ortholog: [SORBI_3005G172500](#)

Setaria italica (Foxtail millet) ortholog: [SI026660m.g](#) [SI036688m.g](#)

Oryza sativa japonica (Rice) ortholog: [OS03G0681700](#)

Brachypodium distachyon (Brachypodium) ortholog: [BRADI2G60690](#)

Arabidopsis ortholog: [AT2G22040](#) [AT3G18140](#)

qTeller Link: [Zm00001d007577](#)

GEvo GenBank Record/Gene Model Comparison: [Zm00001d007577](#)

See this gene model in MaizeMine

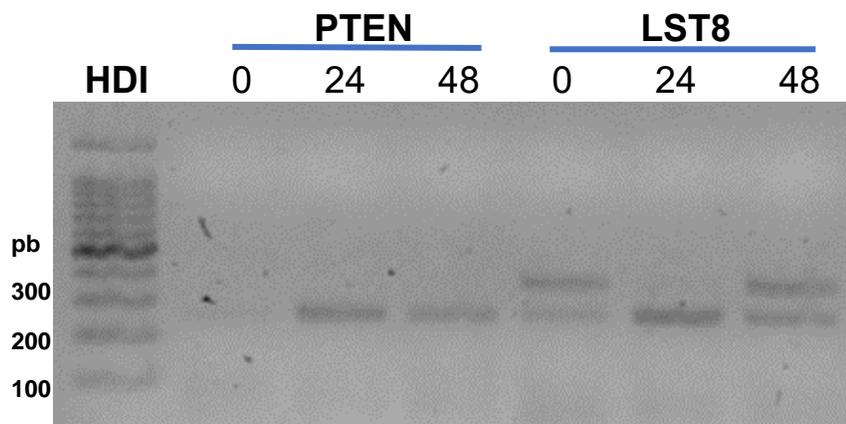
All Associated Loci: (some may be synonyms)

| Locus | Type | Authority |
|---------------------------|------|------------------|
| pco120776 | Gene | MaizeGDB curator |

El gen ortólogo de LST8 (1 y 2 en Arabidopsis) en la base de datos actualizada de maíz es Zm00001d007577 y se plantea la posibilidad de dos transcritos por splicing alternativo. En el transcrito canónico (T01) se eliminan todos los intrones y se produce una proteína (P01) utilizando el codón de inicio ubicado en el exón 2. En el transcrito alternativo (T02) se retienen los intrones 2-4 lo que propicia la aparición de un codón de paro prematuro si se utiliza el codón de inicio del exón 2. Sin

embargo, hacia el final del intrón 4 existe otro codón de inicio en marco de lectura con los codones presentes a partir del exón 5, lo que produce una proteína igual a la P01 a partir de su aminoácido 54 (P02).

Acorde a la ubicación de los oligos forward (amarillo) y reverse (verde), diseñados sobre el gen GRMZM2G094959 correspondiente a *LST8* en Phytozome, se obtendrían dos amplicones diferentes para T01 y para T02. El amplicón correspondiente a T01 sería de 241 pb, mientras que el correspondiente a T02 sería de 346 pb, debido a la retención del intrón 2. Estos tamaños de amplicón corresponden a los visualizados en los geles de electroforesis, un ejemplo de esto se muestra en seguida:



A continuación, se muestran las secuencias correspondientes a las regiones amplificadas a partir de cada versión de transcrito. Se indican los codones de inicio y de término comentados en el párrafo anterior en negritas y se subraya (azul) el codón a partir del cual las dos proteínas sintetizadas coinciden en secuencia. Los intrones retenidos en el T02 se muestran sin color de fondo.

T01 (amplicón 241 pb)

```

CAAACTGGACGCAATTCAGCACAAACCCAACTTCCACCAGACCCCTAACCTTTTCGCAGCTCCAGGCTCCAGC
GCACAGCCGCCGCCGTTTCTTTCATCTTCTTCGCAGAGCCGGCGCTCCATCTTCGGCTCCCTCCCTTACTTGCG
CTCGGCACGCAGGCGGGCGGGCGGGCGCTGTGGCTCGGGATCTCAGTGACGGCATCAGCGGCTTCCCCTCCCG
CCTCTCGCCAGTCGCCTCCGGTCTCTCCGCACACCGGCCGGTGATCTCTCTCTCTCCCGCCTCCGGTGGATCGTC
AACGACGCCCGGCCCGGGCGGGCTGCGCCGCGCGCTCTGAGGGCAGCTGCAGGCGCTGCTCCACCAAGGCGG
TCGCGCCGCTTTGGGAGCGGTTTATGCCCCAAAGTGAAGCGTGCTCTTAGTGCCGCTCTTTGGAACCCTGGT
AATGGTAATCTATTCCATATGCATTTGTTACCATATATAATGCCATCTTTTGTCTGTTTCTATTTTCATCGTTT

```

