UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Proliferación celular en la zona radicular de ejes embrionarios de maíz y el efecto de azúcares

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Brendy Berenice García Ayala

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos, Facultad de Química- UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Sonia Vázquez Santana, Facultad de Ciencias – UNAM

Dra. Adriana Garay Arroyo, Instituto de Ecología – UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2017

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Reconocimientos

Esta tesis de maestría se realizó en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos.

El comité tutor que asesoro el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química- UNAM
Dra. Sonia Vázquez Santana	Facultad de Ciencias- UNAM
Dra. Adriana Garay Arroyo	Instituto de Ecología- UNAM

Se reconoce:

La asesoría técnica y discusión de resultados de la Dra. Aurora Lara Núñez y del Dr. Elpidio García Ramírez, del laboratorio 114 de la Facultad de Química.

El financiamiento para la realización de los experimentos por parte del PAPIIT (IN215316, IA204817), PAIP (5000-9124, 5000-9130) y CONACyT (CB220661).

Durante la duración de la maestría goce de una Beca de Maestría Nacional otorgada por el CONACyT, con un número de CVU 709571.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día …..

El jurado del examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Tzventanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química-UNAM
Vocal	Dra. Alma Delfina Lucia Orozco Segovia	Instituto de Ecología-UNAM
Vocal	Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez	Instituto de Ecología- UNAM
Vocal	Dr. José Luis Reyes Taboada	Instituto de Biotecnología-UNAM
Secretario	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química- UNAM

Agradecimientos

A la Facultad de Química y a la UNAM que me dieron un título, trabajo, amigos, anécdotas, aventuras, un enriquecimiento personal e intelectual invaluable, entre muchas cosas más por tan solo unos centavos, algún día espero poder devolver un poco a la universidad.

Al Dr. Jorge Vázquez por permitirme ser parte de su grupo de investigación por casi 5 años, por las críticas y orientación para realizar de la mejor forma posible este proyecto. Por ser una gran y buena influencia para mi desarrollo profesional, científico y personal; por la confianza y libertad con la que me permitió desarrollarme en el laboratorio.

A la Dra. Aurora Lara por abrirme las puertas a este proyecto y junto con el Dr. Elpidio García por sus comentarios, críticas y compartir su conocimiento para enriquecer este proyecto.

A los miembros de mi comité tutor Dra. Sonia Vázquez y Dra. Adriana Garay, por cada discusión, comentario, observación que no solo mejoro notablemente el proyecto, si no también mi desarrollo personal, profesional y científico.

A los miembros del jurado, doctores Tzventanka Dimitrova, Alma Orozco, María de la Paz Sanchez, José Luis Reyes y Felipe Cruz, por tomarse el tiempo de discutir y comentar este trabajo, cada corrección ayudo a mi desarrollo científico y personal.

A mi SistaLab, Fernanda por cada buffer, lavado, anticuerpo, artículos, anotaciones, libros, comidas, historias, ejercicios, bailes, lágrimas, risas y corajes compartidos en estos años; tú y Pablo fueron mis cinturones de seguridad en este avión. Gracias por poder contar con ustedes no solo para el trabajo en el lab.

A todos mis compañeros del laboratorio 114 y del laboratorio de Desarrollo en Plantas por su ayuda en momentos de duda, discusión de experimentos, críticas y comentarios, con mención especial a Mingyar por su ayuda, paciencia e instrucción en los experimentos con radioactividad; Víctor y Javier que me mostraron de igual forma con una paciencia absoluta varias técnicas y resolvieron mis mil y un dudas.

A mis amigos y a los faltosos, porque aunque la vida en cierto punto parece un camino en solitario, transite esta etapa bien acompañada olvidando cada frustración con risas y diversión.

A mis papas Alfredo y Selene por apoyarme, impulsarme a dar lo mejor, darme ánimos, aguantarme cuando ando de malas (juro que era un efecto típico del posgrado), por cada desvelada, madrugada, por consentirme mucho, llevarme, esperarme, acompañarme y por estar tan orgullosos de mi… saben que este éxito es de los tres.

A mi René, eres lo más bonito que he hecho por mí.

Índice

1. Introducción 1
1.1. El maíz 1
1.2. Anatomía del fruto de maíz 1
1.3. Anatomía funcional de las raíces de maíz 2
1.4. Germinación 4
1.5. Ciclo celular en eucariontes 5
1.6. Ciclinas, CDKs y la oscilación del ciclo celular 6
1.7. Transición G_1→ S de plantas 7
1.8. Transición G_2→ M de plantas 8
1.9. Señales ambientales, nutrimentales y el ciclo celular 9
2. Antecedentes 10
3. Justificación 13
4. Hipótesis 13
5. Objetivo General 13
5.1 Objetivos particulares 13
6 Materiales y métodos 14
6.1. Material biológico 14
6.2. Imbibición 14
6.3. Extracción de proteínas 14
6.4. Electroforesis de proteínas 14
6.5. Western Blot 14
6.6. Preparación de muestras para microscopía 15
6.7. Tinción de núcleo y pared celular 15
6.8 Extracción nuclear 15
6.9. Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo 15
6.10. Inmunoprecipitados con extractos nucleares 16
6.11. Actividad de cinasa 16
6.12. Análisis estadístico 16
7. Resultados 17
8. Discusión 40
9. Conclusión 49

10. Perspectivas 50
11. Referencias 51
Apéndice A 56
Apéndice B 57
Apéndice C 58
Apéndice D 63
Apéndice E 64

Resumen

Se ha descrito el comportamiento del ciclo celular en raíces de Arabidopsis, basándose en la presencia de algunas proteínas que participan en este proceso y en el contenido de ADN en las diferentes zonas de la raíz. Sin embargo, una descripción similar no se ha realizado en el eje embrionario de maíz, que es la parte de la semilla que contiene la información para desarrollar una nueva planta.

Por otro lado, se sabe que la disponibilidad de nutrimentos importantes como la sacarosa y la glucosa modifican la regulación de varios procesos moleculares, como el ciclo celular en diferentes especies de plantas. En ejes embrionarios completos de maíz la presencia de estos azúcares aumenta la proliferación celular e incrementa la síntesis *de novo* de ADN.

En el presente trabajo se estudió la regulación del ciclo celular en dos regiones de la radícula del eje embrionario de maíz una de las cuales incluyó a la región meristemática, mientras que la segunda incluyó en su mayoría a las células de elongación y diferenciación; evaluando proteínas del ciclo celular y el contenido de ADN como marcadores, y se determinó el efecto de la presencia de la sacarosa o la glucosa en el medio de imbibición.

Los resultados mostraron que dos diferentes regiones de la radícula del eje embrionario de maíz tienen un comportamiento diferencial en su capacidad proliferativa y en los niveles proteicos de la ciclina B1;2 y la cinasa dependiente de ciclina B1;1 (CDKB1;1). La presencia de sacarosa y glucosa en el medio de imbibición modifican la proliferación celular especialmente en la zona que incluye a la región meristemática, así como la abundancia proteica de la ciclina B1;2 y la CDKB1;1, además de la formación de complejos entre las ZmCycD3;1 y ZmCycB1;2 con las CDKs, sugiriendo que la presencia de sacarosa y glucosa afecta principalmente a las proteínas típicas de las fases G2 y M.

1. Introducción

1.1. El maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es la especie vegetal más importante de México; su domesticación, iniciada hace miles de años, la convirtió en una planta apta para proporcionar a los grupos humanos granos suficientes para alimentarse, a lo que contribuye la invención, también milenaria, de los diferentes modos de prepararlos que sacan provecho de sus bondades nutritivas. Durante la época prehispánica fue tal su importancia en la dieta, que puede considerarse uno de los factores que propiciaron el tránsito de sociedades nómadas de cazadores-recolectores a otras de agricultores sedentarios; de hecho, del maíz derivaron gran parte de las características económicas, sociales y religiosas de los pueblos mesoamericanos. Hoy en día sigue siendo el principal alimento de los mexicanos, además de ser materia prima para procesos industriales y para otros fines. El maíz ocupa, con casi 7 millones de hectáreas, cerca de la mitad de la superficie cultivada en México, prácticamente toda dedicada al consumo interno (Vela, 2011).

Agronómicamente, *Zea mays p*ertenece a la familia Poaceae (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea,* comúnmente llamadas teocintle y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas silvestres parientes de *Zea mays.* Son clasificadas como del *Nuevo Mundo* porque su centro de origen está en América (Paliwal, 2001).

Además, el maíz tiene una larga historia de desarrollo en herramientas genéticas y genómicas y es considerado uno de los sistemas más accesibles de plantas superiores. Con su genoma totalmente secuenciado y el uso de herramientas citogenéticas, el maíz puede ser objeto de estudio para cuestiones más allá de la biología vegetal. Es un sistema modelo clásico que está experimentando un renacimiento en la era molecular (Nannas y Dawe, 2015).

1.2. Anatomía del fruto de maíz

El fruto (cariópside) del maíz está constituido de las siguientes estructuras principales (Figura 1):

- ✓ Pericarpio o cáscara, capa delgada que encierra a la semilla.
- ✓ Endospermo, estructura que contiene parte del material de reserva (en forma de almidón) que se moviliza para aportar energía durante la post-germinación, se utiliza también para nutrir al embrión en desarrollo.
- ✓ Escutelo, estructura que cubre y protege al eje embrionario y también contiene material de reserva (de naturaleza lipídica).
- ✓ Eje embrionario, parte de la semilla que cuenta con la información para desarrollar una nueva planta de maíz. En la semilla madura, el eje embrionario está formado por la raíz primaria (radícula), protegido por la coleorriza, y la punta de tallo con cinco o seis entrenudos cortos y primordios foliares que, en su conjunto, forman la plúmula que está rodeada por el coleoptilo (MASISH, 2017).
- ✓ Pedúnculo, estructura que sostiene al fruto, uniéndola a la mazorca (Bewley y Black, 1994).

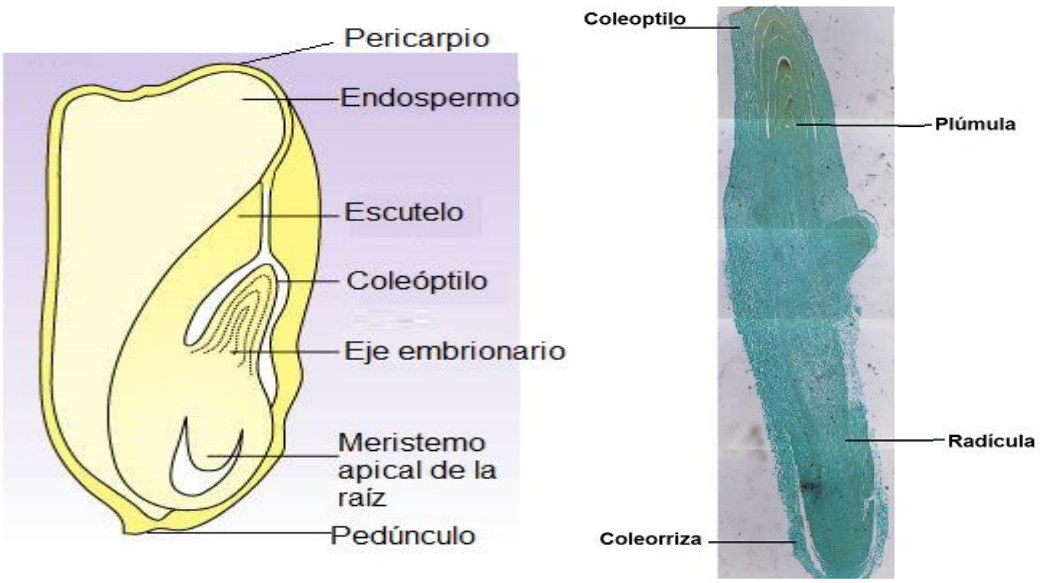

Figura 1. Representación del fruto y eje embrionario de maíz. A la izquierda esquema del fruto formado por varios tejidos y un endospermo que proporciona nutrimentos a los diferentes tejidos. Esquema adaptado de Scanlon y Takacs, 2009. A la derecha corte longitudinal de un eje embrionario completo, teñido con safranina y verde rápido que indica sus estructuras principales. Amplificación 10X.

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen (Doria, 2010), por tal motivo es de gran interés científico estudiar los diferentes procesos que desencadenan cambios metabólicos y morfogenéticos que se llevan a cabo en el eje embrionario como lo es la germinación.

1.3. Anatomía funcional de las raíces de maíz

Aunque el eje embrionario es la estructura que cuenta con la información para crear una nueva planta y el modelo de estudio en el presente proyecto, la estructura longitudinal de la radícula no se ha descrito de manera precisa como en las raíces; por ello para tener una idea aproximada de la diferente distribución celular en la radícula a continuación se describe la anatomía funcional de la raíz de maíz.

Tradicionalmente, la estructura longitudinal de la raíz del maíz se describe en términos de varias zonas parcialmente sobrepuestas especializadas de desarrollo, incluida la cofia, el meristemo apical de la raíz, la zona distal de elongación, la zona de elongación y la de diferenciación como se observa en la Figura 2 (Ishikawa y Evans, 1995).

La cofia cubre el ápice de la raíz lo que facilita el movimiento de las raíces en crecimiento sobre el suelo. Proximal a la cofia está el apéndice subterminal de la raíz, que consiste en el centro quiescente, una región mitóticamente activa de 800 ± 1200 células (Jiang *et al*., 2003) y está rodeado por los meristemos proximal y distal. Junto al meristemo proximal está la zona de elongación distal en la que las células comienzan a alargarse. La zona de elongamiento distal es una zona de transición entre la zona meristemática y la zona donde las células se diferencian

(Hochholdinger *et al.*, 2004b). Esta zona juega un papel importante en la respuesta de las raíces del maíz a una variedad de señales exógenas. La zona de elongación distal se encuentra bordeada por la zona de elongación, donde las células no se dividen pero se alargan al máximo. Además proximal a la zona de elongación, se encuentra la zona de maduración donde se diferencian las células, lugar en que se observan los pelos radiculares (Ishikawa y Evans, 1995).

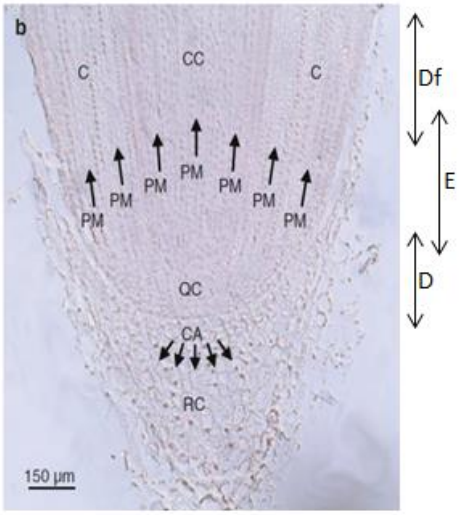

Figura 2. Estructura anatómica de la raíz primaria de maíz. Mostrando las posiciones relativas de los diferentes tipos de células como lo son las células meristemáticas que se encuentran en el centro quiescente y el meristemo proximal**.** Donde **C**. Corteza; **CA**. Caliptrógeno; **CC.** Cilindro central; **PM**. Meristemo proximal; **QC**. Centro quiescente; **RC**. Cofia. Zonas longitudinales de desarrollo se indican en el margen derecho D: división; E: elongación; Df: diferenciación. Modificada de Hochholdinger*,* 2009.

Estas descripciones anatómicas de raíces de maíz, se realizaron utilizando una gran variedad de mutantes como: *lrt1,* que impide la formación de raíces laterales*; slr1 y slr2,* reducen la elongación de raíces laterales*; rth3,* impide la formación de pelos radiculares*; sml*, afecta la formación del meristemo apical del tallo; y *rum1*, que afecta la formación de raíces laterales y seminales (Hochholdinger y Feix, 1998; Hochholdinger *et al*., 2001; Hochholdinger, 2009).

Sin embargo, también se han identificado sobre tejido de semillas de *Zea mays* cv. Merit después de dos días de germinación el centro quiescente (CQ) y el meristemo proximal (PM) basándose en la expresión de algunos genes de regulación del ciclo celular, genes relacionados a auxinas y reguladores de la transcripción, así como el estado redox, donde indican que el CQ tiene un estado más oxidativo y mientras se aleja de éste se vuele más reductor (Jiang *et al*., 2003).

1.4. Germinación

La germinación es un proceso que involucra el reinicio metabólico de la semilla quiescente o latente y la reanudación de los procesos de desarrollo. Las semillas contienen, la información necesaria para recrear morfogenéticamente a la planta.

Como consecuencia de la entrada de agua, las células en los tejidos de la semilla se alargan y, finalmente, se dividen, un proceso que es concomitante con, o seguido de la protrusión radicular. Este evento se define como el final del proceso de la germinación. En general, las células en el ápice de la raíz (meristemáticas) son las primeras en ser activadas para entrar en el ciclo celular y proliferar. El establecimiento exitoso del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento de la plántula y, por lo tanto, su estudio durante la germinación es fundamental (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

El proceso germinativo comienza con la imbibición de la semilla es decir, entrada de agua a la semilla seca y madura y termina, como ya se mencionó, con la protrusión de la radícula (Bewley y Black, 1994). Durante este tiempo, las células en la semilla reparan su ADN, y las células meristemáticas comienzan el ciclo celular (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

En el proceso de germinación la toma de agua por una semilla madura es trifásica, como se observa en la Figura 3. Inicia con una absorción rápida de agua (Fase I) seguida de un contenido constante de agua en la semilla (Fase II), finalmente un nuevo aumento de la absorción de agua se produce sólo después de que se ha completado la germinación, y los ejes embrionarios se alargan (Fase III).

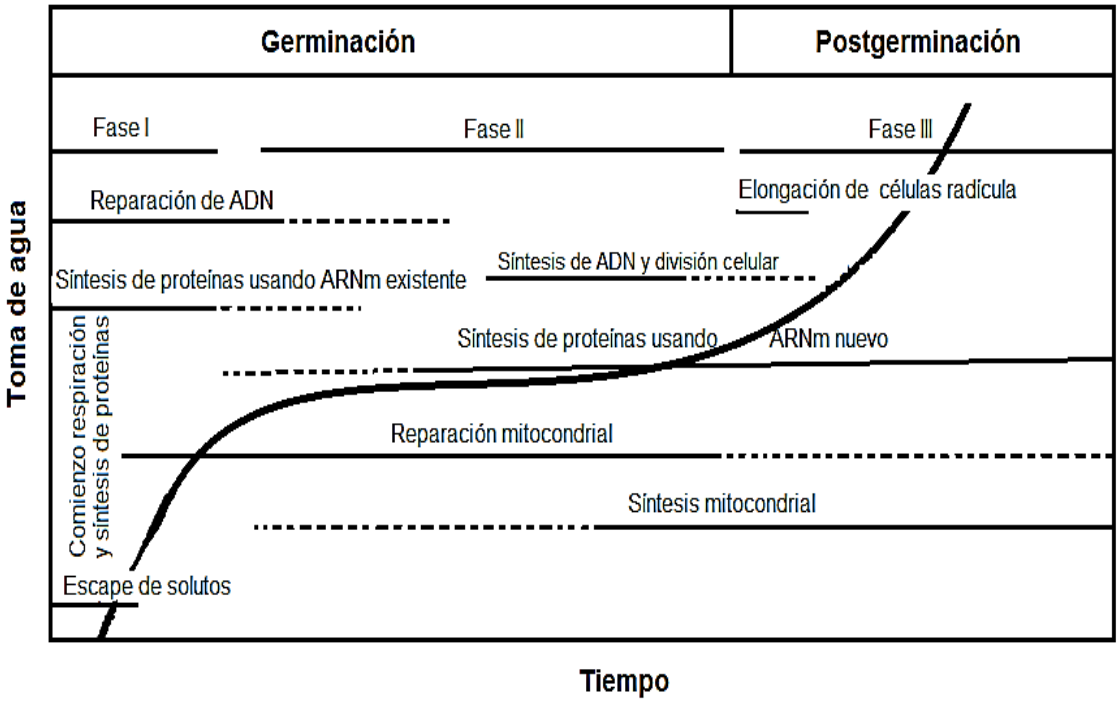

Figura 3. **Toma de agua de semillas maduras y secas a través del tiempo.** Eventos importantes asociados a la germinación como reparación de ADN, reparación mitocondrial, síntesis de proteínas y el subsecuente crecimiento postgerminativo donde elongan las células de la radícula. Modificado de Bewley,1997; Bewley y Black,1994.

La entrada de agua en las células de semillas secas durante la Fase I resulta en perturbaciones estructurales temporales, particularmente en las membranas, que conducen a una fuga inmediata de solutos y metabolitos de bajo peso molecular. Dentro de un corto tiempo de rehidratación, las membranas regresan a su configuración más estable, al tiempo en que la fuga de solutos se reduce (Bewley, 1997); el reactivarse secuencialmente sus funciones, se comienzan a sintetizar proteínas a partir de ARNm existente, se reanudan los procesos de respiración para la producción de ATP, al mismo tiempo que comienza a sintetizar nuevos ARN (Ching, 1972). Durante la fase II disminuyen los procesos reparativos y se incrementa el número de mitocondrias, se lleva a cabo la síntesis de ADN y la síntesis de proteínas usando ARN nuevo y por último la fase III, se relaciona con la elongación radicular, además, en esta fase se lleva a cabo la movilización de reservas de la semilla provenientes del endospermo (Bewley y Black, 1994; Orsbone, 1983).

Vázquez-Ramos y Sánchez en 2003 han definido a la germinación como la consecución exitosa de la ejecución de un proceso molecular altamente regulado, el ciclo celular. Que antecede a la primera ronda de división celular necesario para la proliferación requerida para el establecimiento de la plántula (Cruz-García *et al.,* 1998). Sin embargo aunque se lleve a cabo la germinación de manera exitosa no asegura el posterior establecimiento de la plántula.

Por su importancia fisiológica la germinación es un sistema interesante para el estudio del ciclo celular en plantas, debido a que la entrada de agua reactiva a las células del eje embrionario de maíz que se encuentran detenidas en su mayoría en la fase G_1, particularmente en las zonas meristemáticas (Sánchez *et al.,* 2005). Además de encontrarse claros niveles de todas las proteínas consideradas típicas del ciclo celular en las células de los ejes embrionarios sin embeber, como lo son las ciclinas (Cyc), las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), DNA polimerasas, DNA ligasas, entre otros (Lara-Núñez *et al*., 2008; Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003; Godínez-Palma *et al.,* 2013; Garza-Aguilar *et al*., 2017).

1.5. Ciclo celular en eucariontes

El ciclo celular es un proceso ordenado, cuyos eventos finalizan con la división celular (Arellano *et al.*, 2008).

Diferentes variaciones en el ciclo celular ocurren en la naturaleza, pero en su forma más común el ciclo celular consiste en cuatro diferentes fases las cuales son: G_1, S, G_2 y M.

Aunque a las fases de la replicación del ADN (Fase S) y mitosis (Fase M) se les da mayor atención, es durante la fase G_1, cuando las células monitorean su tamaño y entorno y realizan un reconocimiento de la acumulación de materiales celulares y de energía (Arellano *et al*., 2008) para así entrar a la fase S; mientras que una de las tareas realizadas durante la fase G_2 es asegurar que la duplicación del ADN ha sido completada con éxito (De Veylder *et al.,* 2003), para continuar con la mitosis que es la fase de la repartición cromosómica y división celular.

En general existe una gran conservación evolutiva de los componentes básicos de la maquinaria del ciclo celular. Sin embargo, la evolución de los mecanismos varían entre células animales y vegetales en gran parte debido a algunas características únicas del ciclo de división celular en las plantas (Gutiérrez, 2009). Por ejemplo:

- Algunos genes de ciclo celular son únicos para células vegetales, algunos de los cuales participan en procesos específicos de plantas (Vandepoele *et al*., 2002).
- La citocinesis en plantas es completamente diferente a la citocinesis en células animales. Las diferencias derivan en gran medida de la necesidad de una nueva pared celular entre las dos células hijas (Jürgens, 2005).
- En células vegetales es posible el estudio del ciclo de células haploides y diploides de el mismo organismo (Kim *et al.,* 2008).
- La organogénesis es un proceso post-embrionario que ocurre de manera continua a lo largo de toda la vida de la planta. Así, la aparición continua de divisiones celulares dentro de los meristemos de manera iterativa producen células que eventualmente se diferenciaran en diversos tipos celulares que forman un órgano (Gutiérrez, 2005; Scheres, 2007).
- Muchas células de una planta adulta retienen una capacidad significativa para desdiferenciarse y adquirir un estado pluripotente, confiriendo plasticidad a la planta (Grafi y Avivi, 2004).

De igual forma la regulación de los eventos de proliferación en eucariontes se lleva a cabo a todo lo largo del ciclo celular sin embargo, existen tres puntos muy estrictos de regulación ampliamente estudiados: i. La transición de la fase G_1 a la fase S, ii. La transición de G_2 a M y iii. La transición de metafase a anafase durante la mitosis (Vázquez-Ramos, 2003).
El estudio de las transiciones del ciclo celular tiene principalmente dos enfoques. Uno es estudiar los mecanismos de acción de los componentes del ciclo celular así como su regulación; y otro es entender la proliferación celular, el crecimiento y el desarrollo en las plantas. Ambos aspectos son relevantes para estudiar los mecanismos a través de los cuales las células vegetales experimentan la diferenciación y reacción de la proliferación celular en respuesta a señales ambientales y estatus nutricional (Gutiérrez *et al.,* 2002).

1.6. Ciclinas, CDKs y la oscilación del ciclo celular

El principio básico de regulación del ciclo celular está determinado por la activación de las CDKs que requieren la unión de ciclinas para poder activarse, y así impulsar transiciones cruciales del ciclo celular, la entrada de la fase G_1 a S y de la fase G_2 a M (Nieuwland *et al*., 2007).

En animales, han sido identificadas por lo menos 13 clases de ciclinas (llamadas ciclina A a L y T), mientras que en diversas plantas se han aislado más de 100 ciclinas. El análisis del genoma de Arabidopsis mostró 50 ciclinas potenciales que pueden agruparse en nueve clases (Wang *et al*., 2004; Menges *et al.,* 2005), de las cuales cinco no tienen equivalente en animales. Solo se ha encontrado una evidencia clara del papel de las ciclinas A, B, D y H en el ciclo celular (Nieuwland *et al*., 2007).
Los complejos ciclina-CDK regulan (al menos) dos vías acopladas: la inactivación de la vía Rb (Retinoblastoma), la inactivación de complejos de pre-replicación después de la iniciación de la replicación del ADN (Gutiérrez *et al*., 2002), y regulan la transactivación de las proteínas MYB, entre otras (Komaki y Sugimoto, 2012).

En plantas se conocen dos grupos principales de CDK que juegan un papel importante en la progresión del ciclo celular. Las CDKA, que es homóloga directa de cdc2 de levadura y CDK1 de mamífero, y conserva la secuencia aminoacídica PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina. En este grupo de CDKs (Planchais *et al*., 2004), el transcrito y los niveles de proteína no muestran una expresión preferencial en alguna fase del ciclo celular y además son detectadas aunque en bajos niveles, en tejidos diferenciados (Ferreira *et al.,* 1991). Sin embargo, la evidencia en plantas indica que CDKA se especializa principalmente en la fosforilación de la proteína RBR1 (Van Leene *et al*., 2011)

Las CDKB son un grupo específico de CDK de plantas (Planchais *et al*., 2004) que tienen un motivo de unión a ciclina único PPTALRE o PPTTLRE, por lo que se han dividido en dos subgrupos CDKB1 y CDKB2; su actividad es dependiente del ciclo celular y actúan principalmente en la transición $G_2 \rightarrow M$ (Mironov *et al*., 1999).

Uno de los niveles de regulación de la actividad de las CDKs es por la asociación con ciclinas: las ciclinas tipo D que en términos generales son reguladoras del punto de control de la fase G_1 en asociación con CDKA; las ciclinas tipo A que se encuentran involucradas en el control de la transición de la fase S a la M y las ciclinas tipo B que se encuentran involucradas en la transición $G_2 \rightarrow M$ y en los controles intramitóticos probablemente en asociación con CDKA y CDKB (Planchais *et al*., 2004).

1.7. Transición $G_1 \rightarrow$ S de plantas

El mecanismo que regula la transición $G_1 \rightarrow$ S parece estar conservado entre mamíferos y plantas. El control de esta transición generalmente representa el punto de compromiso con la división celular (Pardee, 1989).

En plantas, el paso de G_1 a S (Figura 4) se inicia mediante la síntesis *de novo* de las ciclinas tipo D; cuando se forman complejos CycD/CDK inicia la fosforilación de la proteína retinoblastoma (RBR) (De Veylder *et al.,* 2003). La proteína RBR reprime principalmente la transición $G_1 \rightarrow$ S del ciclo celular; directamente, mediante el enmascaramiento del dominio de transactivación de E2F (factor transcripcional que controla la expresión de muchos genes requeridos para la entrada e inicio de la fase S entre los que se encuentran el de la ciclina A, genes de histonas, ORC1, MCM, entre otros y así el ciclo celular progrese (Stevens y La Thangue, 2003; Dimova y Dyson, 2005; Ramírez-Parra *et al*., 2003)), o indirectamente por el reclutamiento de diferentes complejos remodeladores de cromatina silenciando así regiones específicas (Frolov y Dyson, 2004; Cobrinik, 2005). En conjunto, la función de la proteína RBR resulta en la inhibición de la expresión de genes regulados por E2F en G_1, evitando la transición a la fase S (Sabelli *et al.,* 2005).

La proteína RBR se encuentra unida al factor de transcripción dimérico E2F/DP (donde DP funciona en el reconocimiento del promotor mediante un dominio de unión al ADN) impidiendo la transactivación de sus genes blanco, pero conforme se hiperfosforila la proteína RBR por el complejo CycD/CDK, pierde afinidad por E2F/DP permitiendo que el heterodímero realice su actividad de transactivación de los genes que reconoce (Inzé y De Veylder, 2006), con base a una

secuencia canónica en los promotores (Ramírez-Parra *et al.,* 2003), que en general son genes cuyas proteínas son necesarias durante la fase S (Shen, 2002).

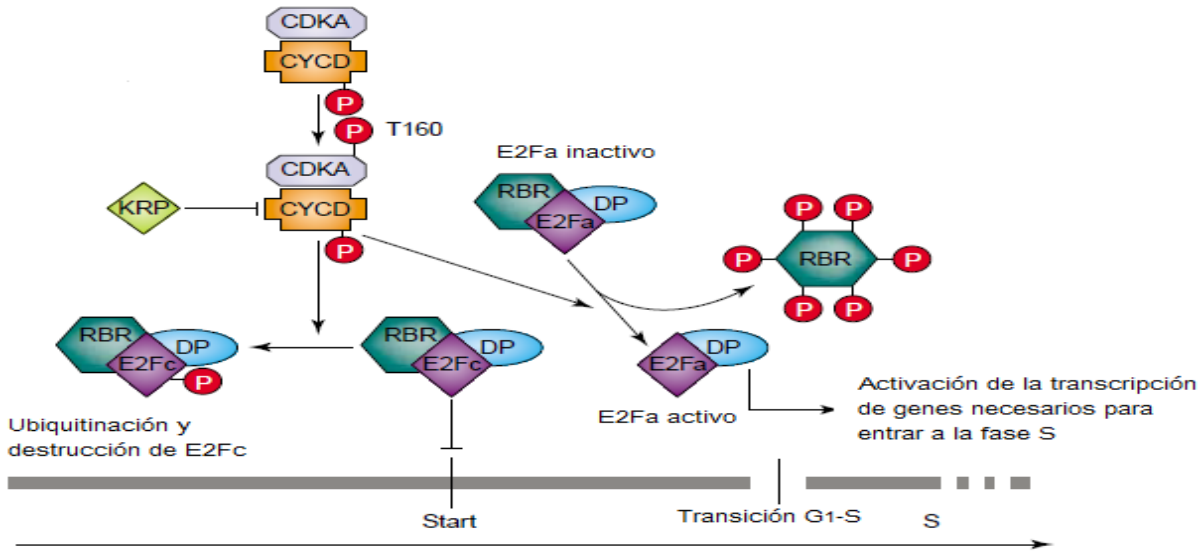

Figura 4. Visión esquemática de la regulación de la transición G_1→ S en plantas. RBR es fosforilada por el complejo formado por CYCD/CDK perdiendo su afinidad por E2F, la liberación de RBR permite la activación de genes necesarios para que la célula entre a la fase S. Modificada de De Veylder *et al.,* 2003.

1.8. Transición G_2→ M de plantas

Aunque datos recientes han expandido nuestra comprensión de los eventos moleculares que controlan la entrada a la fase S en plantas, la regulación de la entrada en mitosis es todavía poco conocida (De Veylder *et al.,* 2003). Se sabe que en la transición G_2→M participan principalmente las CDKB en asociación con ciclinas tipo A o B (Figura 5). La actividad de las CDKs puede regularse positiva o negativamente por fosforilaciones, localización celular o la interacción con otras proteínas (Dudits *et al*., 2007).

La actividad de los complejos Cyc-CDK es regulada por la desfosforilación de los residuos tirosina 15 (Y15) y treonina 14 (T14) en la transición G_2/M. Los complejos Cyc-CDK formados durante las fases S y G_2 están principalmente en su forma inactiva por una fosforilación inhibitoria debida a una familia de cinasas muy conservada: WEE1, MIK1 y MYT1 (De Veylder *et al.,* 2003).

Estas fosforilaciones inhibitorias T14/Y15 son removidas por una fosfatasa putativa aún desconocida en plantas, pero ya identificada y estudiada en otros organismos. Similar a lo que ya se describió anteriormente, los complejos CYC/Cdk se activan por la fosforilación en la treonina 160 (T160) de CDK (catalizada por la CAK (cinasa activadora de CDKs), CDKD/CDKF) permitiéndole así, la fosforilación de sus proteínas blanco para entrar a la fase M (Garza-Aguilar *et al*., 2014).

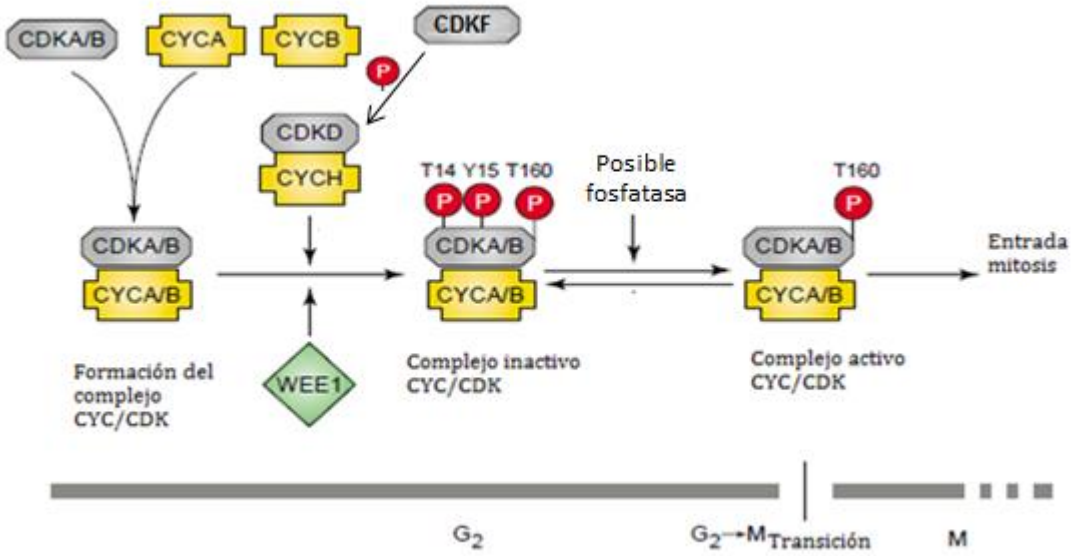

Figura 5. Visión esquemática de la regulación de la transición G_2→ M en plantas. La asociación de las ciclinas tipo A/B con CDKs A/B y su subsecuente desfosforilación promueve la entrada a mitosis. Modificada de De Veylder *et al.,* 2003.

1.9. Señales nutrimentales y el ciclo celular

El estado nutricional juega un papel importante en la germinación, así como en el ciclo celular. Una semilla no puede germinar sin los insumos adecuados de carbono y energía disponibles en cada tejido.

Entre los nutrimentos, los azúcares son como componentes duales como donantes de carbono y energía, así como moléculas de señalización. Los azúcares solubles podrían tener un impacto diferencial sobre la activación o inhibición de diferentes procesos clave. Por ejemplo, se sabe que las hexosas como la glucosa en los tejidos de plantas activan la división celular, mientras que la sacarosa favorece la diferenciación y maduración (Koch, 2004; Gibson, 2004; Evelan y Jackson, 2011; Wang y Ruan, 2013).

Además algunos marcadores relacionados con el ciclo celular pueden ser regulados en diferentes niveles por azúcares: En células en suspensión de Arabidopsis, la expresión de *CycD2* y *CycD3* se estimula por la presencia de sacarosa y glucosa; en presencia de sacarosa, la actividad de cinasa en complejos de la CycD2 y D3 con CDK aumenta (Rio-Khamlichi *et al.,* 2000). Similarmente, en ejes embrionarios de maíz la expresión de la *CycD2;1* se estimula por la presencia de sacarosa (Gutiérrez *et al*., 2005) y en células de tabaco BY-2 la expresión de la *CycD2;1, D3;2 , A3;2* y *B1;2* aumenta en paralelo con la concentración de glucosa; y la duración de las fases S y G_2 se modifican por diferentes niveles de glucosa (Hartig, 2005; Hartig y Beck, 2006). Esta regulación podría deberse, al menos en parte, a la presencia de elementos de respuesta en la región promotora de estos genes del ciclo celular.

Además, reportes recientes indican que la cinasa TOR (Target Of Rapamycin) juega un papel crucial en la señalización por glucosa, activando la expresión de diferentes vías biosintéticas (Polyn *et al*.,

2015), y se encontró que la señalización por glucosa a través de la vía TOR, activa la división celular en meristemos de raíz en Arabidopsis. TOR en un regulador maestro que coordina la disponibilidad de nutrimentos y energía además de señales ambientales con el crecimiento, desarrollo y superviviencia (Xiong *et al.,* 2013).

2. Antecedentes

Aunque el ciclo celular está relativamente bien caracterizado en especies modelo como Arabidopsis, nuestro conocimiento del control del ciclo celular en cultivos de importancia económica, y en particular en las principales gramíneas como el maíz, está todavía en desarrollo, y hay una necesidad urgente de identificar los papeles claves, regulación y funciones de las proteínas que controlan el ciclo celular en estos organismos (Sabelli *et al*., 2014); en nuestro caso, nos interesa particularmente el ciclo durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario, así como el efecto que tiene su estatus nutricional como la presencia de sacarosa o glucosa en el medio de imbibición en nuestro modelo de ejes embrionarios extraídos de semilla madura de maíz desprovistos de escutelo y endospermo.

En 2001 Beeckman y colaboradores describieron el comportamiento del ciclo celular a lo largo de las raíces en Arabidopsis, basándose en la ploidía de las células y la expresión de algunas proteínas del ciclo celular, de esta forma pudieron definir cuatro zonas diferentes. La zona A, que incluye la región meristemática, donde encontraron que en su mayoría las células se encuentran dividiéndose; en la zona B, solo las capas externas del tejido entran a diferenciación mientras que las células del cilindro central continúan dividiéndose; la zona C en la que se detiene la división celular y las células se mantienen en la fase G_1; y por último, la zona D donde solo las células en los polos del xilema progresan vía fases S → G_2 para iniciar la formación de la raíz lateral (Beeckman *et al*., 2001); de esta forma lograron definir diferentes estadios a lo largo de las raíces de Arabidopsis indicando que en ésta se llevan a cabo diferentes procesos que involucran la expresión de diferentes genes y la presencia de determinadas proteínas, una descripción similar no se ha realizado en la radícula de ejes embrionarios de maíz.

Por otro lado, los carbohidratos o azúcares, son esenciales para los procesos fundamentales que se requieren para el crecimiento vegetal. Por lo tanto, la producción, metabolismo y uso de carbohidratos deben ser cuidadosamente coordinados con la fotosíntesis, señales ambientales y el calendario de los programas clave de desarrollo (Eveland y Jackson, 2012).

Se sabe que en semillas de tabaco y Arabidopsis la velocidad del ciclo celular puede ser modulada en función de la presencia de azúcares solubles (Gibson, 2000) quienes tienen una función importante en la determinación del momento en que algunas especies de plantas florecen (Gibson, 2000).

La evidencia reciente indica que la disponibilidad de nutrimentos también desempeña un papel en el control del ciclo celular tanto en animales como plantas. Por lo tanto, tal vez no sea sorprendente que la disponibilidad de nutrimentos importantes, tales como azúcares, ayude a regular el progreso del ciclo celular (Gibson, 2004). Por ejemplo, la sacarosa y la glucosa ayudan a

regular la transición de crecimiento por división celular de células en expansión y acumulación de reservas en el desarrollo embrionario de plantas (Borisjuk *et al.,* 2003).

Además de afectar la sincronización con la que se producen los eventos de desarrollo, los niveles de azúcares solubles también pueden afectar el número y la forma de varios órganos. Los altos niveles de azúcar pueden conducir a la formación de plantas que producen hojas más grandes y gruesas, y un mayor número de tubérculos y raíces adventicias (Gibson, 2005).

En ejes embrionarios de maíz desprovistos de escutelo y endospermo la presencia de sacarosa o glucosa 120 mM (concentración que se encuentra dentro de un intervalo fisiológico de una semilla en germinación (Yu *et al.,* 1996; Borisjuk *et al*., 2003; Lara-Núñez *et al.,* 2017))en el medio de imbibición a lo largo del proceso germinativo, promueven un cambio morfólogico en los ejes; en presencia de glucosa los ejes crecen de manera enrollada, mientras que con sacarosa son más alargados comparados con el control (sin carbohidratos) (García-Ayala, 2015), despues de 7 dias de exposicion a sacarosa muestran una raíz primaria y coleoptilo mas largos y el desarrollo de numerosas raíces seminales, ademas se observan abundantes pelos radiculares. En contraste los ejes embrionarios embebidos con glucosa conservan la morfologia torcida y no se observa la formación de pelos radiculares, en su lugar se observan estructuras parecidas a callos, lo cual sugeriria que la glucosa esta afectando el proceso de desarrollo normal (Lara-Núñez *et al.,* 2017). Estos carbohidratos actúan de manera diferencial, aumentando la tasa de proliferación celular en las zonas meristemáticas (zonas altamente proliferativas); e incrementando la síntesis *de novo* de ADN, fenómenos que se ven más acentuados en presencia de glucosa (García-Ayala, 2015). Adicionalmente a los procesos antes mencionados, la presencia de sacarosa y glucosa afectan diferentes marcadores moleculares que participan a lo largo del ciclo celular en Arabidopsis y maíz (Lara-Núñez *et al*., 2017).

Asimismo la presencia de azúcares solubles en el medio de imbibición como la sacarosa y la glucosa promueven un aumento en la abundancia proteica y un cambio en la localización celular de la ZmCycB1;2 en ejes embrionarios de maíz (García-Ayala, 2015).

Planchais y colaboradores (2004) analizaron la relación de los niveles proteicos de CycD3;1, CycD2;1 y CDKA;1 con la disponibilidad de sacarosa y el aumento en la fase G_1 de células en suspensión de Arabidopsis. Sus resultados mostraron que la remoción de sacarosa resulta en una rápida caída en la abundancia de las proteínas CycD3;1 y CDKA;1, además las células sin sacarosa completaron la fase S y gradualmente permanecieron en la fase G_1, sugiriendo un control más estricto en la respuesta a la disponibilidad de sacarosa en la fase G_1 que en la fase G_2. En presencia de bajos niveles de sacarosa (0.3 %), los niveles de la CycD3;1 se reducen hasta las 24 horas, lo que relaciona con la acumulación de las células en la fase G_1.
Estos resultados sugieren que los niveles proteicos de la CycD3;1 responden rápidamente a la disponibilidad de sacarosa, y la abundancia de esta proteína correlaciona con la capacidad de las células para pasar de la fase G_1 a S (Planchais *et al.,* 2004).
Por otro lado, la ausencia de sacarosa en el medio de imbibición en nuestro modelo de

investigación reduce los niveles proteicos de la ZmCycD3;1 (Garza-Aguilar *et al*.,2017), como sucede en Arabidopsis.

Lo anterior sugiere que la presencia de sacarosa y glucosa afectan diferentes procesos a nivel molecular en maíz, los cuales pueden ser diferentes a lo largo de la raíz como sucede en Arabidopsis.

3. Justificación

Se ha descrito el comportamiento del ciclo celular a lo largo de las raíces de Arabidopsis basándose en el contenido de ADN de las células y la presencia de algunas proteínas del ciclo celular, esto se puede extrapolar a otro modelo vegetal como maíz, ya que en éste aún no se ha determinado el comportamiento del ciclo celular a lo largo de la radícula, que tiene una distribución anatómica similar a las raíces de Arabidopsis.

Además, se sabe que la disponibilidad de nutrimentos importantes como la sacarosa y la glucosa ayudan a regular el progreso del ciclo celular; en maíz la presencia de estos carbohidratos en el medio de imbibición aumenta la tasa de proliferación celular e incrementa la síntesis *de novo* de ADN. De esta manera, es importante determinar si la presencia y actividad de algunas proteínas del ciclo celular a lo largo del eje embrionario se afecta por la presencia de azúcares, resultados que ayudarían a conocer su papel en la regulación del ciclo celular.

4. Hipótesis

La proliferación celular será diferencial en dos regiones de la radícula donde una de ellas incluye a la región meristemática del eje embrionario de maíz. La presencia de sacarosa o glucosa en el medio de imbibición modificaran la proliferación celular en ambas regiones.

5. Objetivo General

Estudiar la regulación del ciclo celular en dos zonas de la radícula del eje embrionario de maíz evaluando proteínas del ciclo celular y el contenido de ADN como marcadores, y determinar el efecto de la presencia de sacarosa o glucosa en el medio de imbibición.

5.1 Objetivos particulares

- ✓ Definir diferentes regiones en la zona radicular del eje embrionario
- ✓ Determinar la abundancia de algunas proteínas del ciclo celular como la CycB1;2 (marcador de G_2-M), PCNA (marcador preferencial de la fase S), CycD3;1 (marcador de la fase G_1), así como CDKB1;1 y CDKA en las diferentes zonas previamente definidas del eje embrionario, en presencia de azúcares en el medio de imbibición.
- ✓ Evaluar la formación de complejos Cyc/CDK, así como su actividad de cinasa, entre las proteínas estudiadas en presencia y ausencia de azúcares en el medio de imbibición, en las zonas radiculares definidas.
- ✓ Analizar el contenido de ADN a lo largo de la zona radicular en presencia y ausencia de azúcares a diferentes tiempos de imbibición.

6 Materiales y métodos

6.1. Material biológico

Se utilizaron semillas secas y maduras de maíz (*Zea mays*) variedad Chalqueño almacenadas hasta su uso a 4 °C en oscuridad a las que se les extrajo el eje embrionario.

6.2. Imbibición

Los ejes embrionarios fueron extraídos de semillas secas y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio 1.7 %, en agitación constante por 10 minutos y se lavaron con agua destilada estéril hasta que perdieran el olor a cloro, posteriormente se embebieron, en medio de imbibición (Tris-HCl pH 7.4 , KCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM) enriquecido con sacarosa (58 mM o 120 mM) y en medio enriquecido con glucosa (120 mM) en cajas Petri estériles sobre un papel filtro Whatman estéril y se incubaron el tiempo necesario (18-96 horas) en la estufa a 25 °C en oscuridad.

6.3. Extracción de proteínas

Para realizar la extracción de proteínas se cortaron las dos zonas de los ejes embrionarios con una navaja, cada una se homogeneizó en un buffer de extracción de proteínas(Tris-HCl 25 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 15 mM, KCl 25 mM, Na_2EDTA 5 mM, NaCl 250 mM, Triton X-100 0.2 %, DTT 1 mM, NaF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, glicerol 30 %, β-glicerofosfato 60 mM), usando un instrumento de dispersión ULTRA-TURRAX, posteriormente los homogenados se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos y se desechó el pellet de cada muestra. El sobrenadante se guardó en alícuotas a -70 °C hasta su uso. Las proteínas extraídas se cuantificaron por el método de Bradford en una placa de ELISA, usando albúmina sérica bovina como estándar, y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrómetro (Epoch, BioTek, VT, USA).

6.4. Electroforesis de proteínas

Para verificar la presencia de proteínas y para los ensayos de Western blot se realizó electroforesis en gel Tris-glicina desnaturalizante de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE). El gel se preparó como se indica en Sambrook *et al.,* 1989 y se corrió a 90 V hasta que el frente de corrida pasara el gel concentrador, luego a 120 V durante el corrimiento en el gel separador. El amortiguador de electrodos utilizado fue de Tris-glicina-SDS 1X. Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga para obtener una concentración final 1X (SDS 2 %, β-mercaptoetanol 2 mM, glicerol 4 %, Tris-HCl 40 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.01 %) y desnaturalizando las proteínas a 90 °C por 5 minutos.

6.5. Western Blot

Para los ensayos de Western blot se realizaron geles SDS-PAGE 12 % como se indica en el punto 6.4. y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF Immobilon-PSQ transfer Membrane (Millipore) en el equipo Mini-PROTEAN Tetra System de BIO-RAD a 350 mA por una hora. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche al 5 % en PBS-Tween 20 al 0.9 % por una hora y luego incubadas con uno de los siguientes anticuerpos policlonales desarrollados en nuestro laboratorio: anti-ZmCycD3;1, anti-ZmCycB1;2, anti-ZmCDKA, anti-ZmCDKB1;1 y anti-ZmPCNA todos a una dilución 1:2000 en solución de bloqueo a 4 °C en agitación toda la noche.

Terminado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados, el primero y el último con PBS 1X por 10 minutos, y el segundo con PBS-Tween 20 al 0.9 % y NaCl 0.5 M por 15 minutos; después se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:20000) por una hora en una solución de leche al 5 % en PBS-Tween 20 al 0.9 % en agitación. Terminado el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se realizaron tres lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. El revelado se hizo en el equipo ChemiDoc MP (XRS, Bio-Rad, USA) y la reacción de peroxidasa fue detectada por el método ECL (Pierce kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con las imágenes obtenidas se realizó una densitometría utilizando el software Image Lab 5.2.1.

6.6. Preparación de muestras para microscopía

Después de embeber los ejes en los tratamientos correspondientes se fijaron inmediatamente en formaldehído al 4 % en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente y se enjuagaron en PBS 1X cinco veces por 15 minutos cada lavado, posteriormente el tejido se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol de manera gradual (50, 70, 85, 96, 100 %) durante una hora en cada concentración, después se impregnaron en paraplast y xilol por 24 horas y después en paraplast puro por 24 horas, para ser incluidos en bloques. Los bloques se cortaron en el micrótomo rotatorio a 4-6 µm de grosor, los cortes se colocaron en portaobjetos.

Los cortes se desparafinaron colocando el tejido en la estufa a 60 °C por 2 horas, posteriormente se pasaron por xilol y se hidrataron en una serie de concentraciones graduales de etanol (100, 96, 85, 70, 50, 30 %) durante 15 minutos en cada cambio.

6.7. Tinción de núcleo y pared celular

Los cortes desparafinados se tiñeron con safranina durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con agua destilada para quitar el exceso de safranina y se tiñeron con verde rápido, pasando sucesivamente por las siguientes soluciones: etanol 96 % + acido pícrico, etanol 96 % + amoniaco (detiene la acción del ácido pícrico), etanol, verde rápido y aceite de clavo. Una vez pasado por el tren de tinción las preparaciones se montaron con Entellan.

6.8 Extracción nuclear

Para realizar la extracción nuclear, primero se congeló el tejido en nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo muy fino. Este polvo se resuspendió en 2 mL de buffer NIB (sacarosa 500 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9.5, EDTA 10 mM, espermidina 4 mM, espermina 1 mM y β-mercaptoetanol 0.1 % v/v) y se filtró a través de una malla de nylon de 45 µm de poro, posteriormente se centrifugó a 500 g por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadieron 20 volúmenes de NIB/β-mercaptoetanol/ Tritón X-100 al 10 %, se volvió a centrifugar y se lavó 3 veces durante 5 minutos con 1.5 mL de PBS frio en cada lavado y se centrifugó desechando el sobrenadante, el pellet final con los núcleos se resuspendió en PBS 1X.

6.9. Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo

Una vez extraídos los núcleos previamente fijados, se les adicionó RNAsa a una concentración final de 50 µL/mL y se dejaron por 30 minutos en el agitador rotatorio a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron lavados con PBS y se adicionó yoduro de propidio (20 µL/mL) y se

dejaron a temperatura ambiente en oscuridad por media hora, transcurrido este tiempo los núcleos están listos para pasarse por el citómetro de flujo (CytoFLEX, Beckman Coulter, IND, USA).

6.10. Inmunoprecipitados con extractos nucleares

Una vez extraídos los núcleos, se sonicaron en buffer de extracción de proteínas con una amplitud de 20 % en pulsos de 20 segundos dos veces, posteriormente se adicionó una unidad de benzonasa (endonucleasa que rompe el ADN en fragmentos <8 pares de bases, disminuyendo así la viscosidad de la muestra) y se dejó en el agitador rotatorio a temperatura ambiente por 25 minutos, posteriormente se centrifugó a 14000 g por 15 minutos a 4 °C y se desechó el pellet, este extracto se cuantificó por el método de Bradford.

Para realizar los inmunoprecipitados primero se puso a interaccionar el anticuerpo con la proteína A/agarosa (Roche) previamente lavada en una dilución de 2:5, por 1 hora en el agitador rotatorio a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS; se adicionó el extracto nuclear y se dejó interactuar por 2.5 horas, una vez transcurrido este tiempo se realizaron 5 lavados con PBS, se adicionó buffer de carga, se desnaturalizaron las proteínas a 90 °C por 5 minutos y se realizó un Western Blot.

6.11. Actividad de cinasa

Los inmunocomplejos fueron incubados en 10 µL de buffer de cinasa (Tris/HCl, 70 mM pH 7.5, MgCl2 10 mM, NacL 150 mM, DTT 1 mM, EGTA 5 mM, ATP 20 mM, y [γ-32P]ATP 5 µCi). Como sustrato se utilizó Histona H1, recombinante humana y se agregó 1 µg por muestra. La reacción se llevó a cabo por una hora a 30 °C y se detuvo adicionando buffer de carga SDS. Después se calentaron las muestras por 10 minutos a 70 °C, y los productos de la reacción fueros separados por un gel SDS-PAGE. Los geles teñidos con azul de coomassie fueron secados al vacío a 80 °C por dos horas, posteriormente se dejaron exponiendo en una placa de europio por 24 horas, para posteriormente digitalizar con el software QuantityOne en el equipo Molecular Imager FX (BioRad, USA).

6.12. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre la longitud de las zonas así como entre los valores densitométricos en los ensayos de cantidad de proteína, se realizó una ANOVA de una vía en cada caso utilizando el programa SigmaPlot 12.5. con un nivel de probabilidad de 5 % y se realizó un prueba post-hoc Dunnett. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

7. Resultados

Se analizaron tres grupos de ejes embrionarios embebidos en sacarosa 120 mM, glucosa 120 mM y sacarosa al 2 % (58 mM) que fue considerado un control "fisiológico" en el que el ciclo celular se lleva acabo de manera similar a la semilla completa, para que de esta forma el eje embrionario tenga carbohidratos disponibles durante la imbibición, al que de aquí en adelante se le llamo control.

Aunque es posible definir diferentes zonas a lo largo de todo el eje embrionario, realizar los cortes sin un instrumento de precisión resultaría complicado y poco confiable. Se realizaron cortes histológicos longitudinales de la radícula, se tiñeron y se midió el diámetro celular (de pared a pared) desde la cofia hasta el mesocótilo, con el software Application Suite 3.0.0; además del diámetro celular, se realizó una discriminación basada en la morfología diferencial de las células ya que las células de la región meristemática y las zonas cercanas a ésta son pequeñas, desordenadas e isodiamétricas; mientras que las células lejanas a esta región aumentan de tamaño, se distribuyen de manera ordenada son cúbicas o rectangulares y forman filas a lo largo del eje embrionario. Se determinaron dos regiones (Figura 6) las cuales se denominaron: Zona A (zona meristemática) y Zona B (zona de elongación/diferenciación), esto se realizó por triplicados biológicos con tres ejes embrionarios en cada replica en cada uno de los grupos, a los diferentes tiempos estudiados.

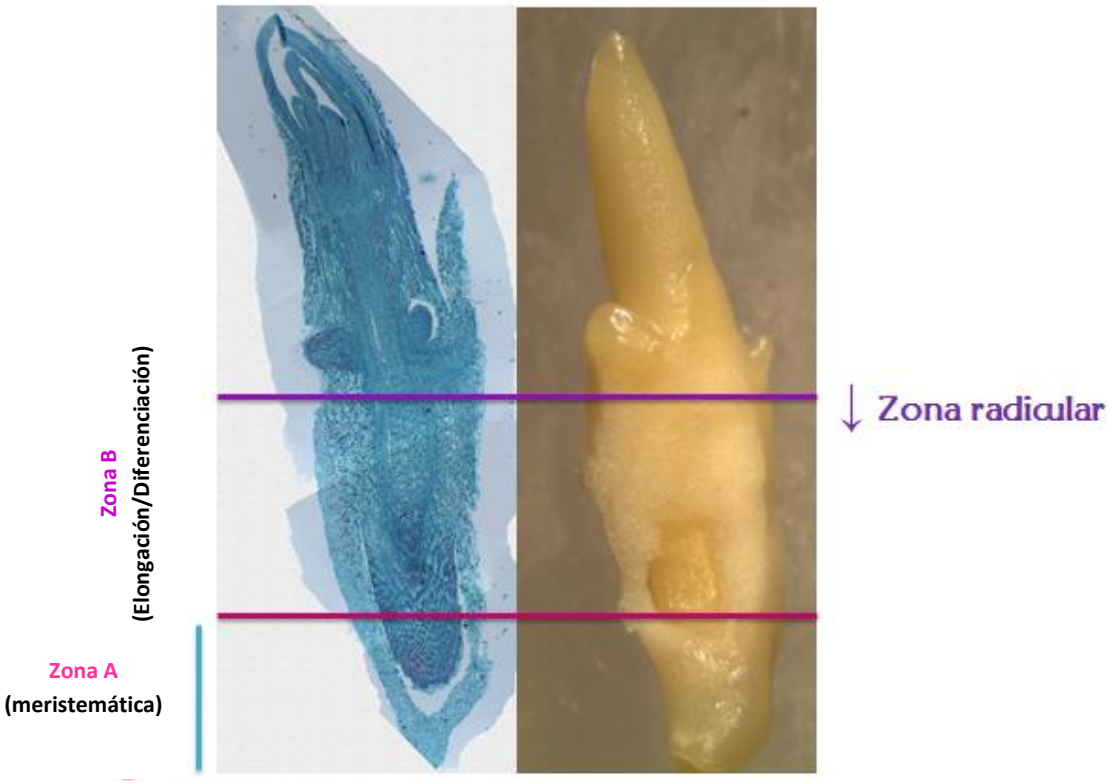

Figura 6. Zonas estudiadas (A y B) del eje embrionario de maíz. A la izquierda un corte longitudinal del eje embrionario teñido con safranina y verde rápido. Amplificación 10 X. A la derecha un eje embrionario completo, embebido con sacarosa 58 mM (control) durante 28 horas.

La longitud promedio de la zona A (incluida la cofia y la coleorriza) para los tres grupos a las 18 y 28 horas de imbibición es superior a los 2.5 mm, mientras que a las cero horas la distancia es de 2 mm (Figura 7A), por ello para definir como cortar las zonas para realizar los experimentos planteados se decidió cortar a los ejes embrionarios a los 3 mm, excepto para cero horas en las que el corte se realizó a los 2 mm. En cuanto a la distancia promedio de la Zona B (Figura 7B), se observó un comportamiento similar entre los grupos embebidos con carbohidratos en alta concentración, pero con diferencia estadísticamente significativa entre estos y el grupo control sólo a las 18 horas.

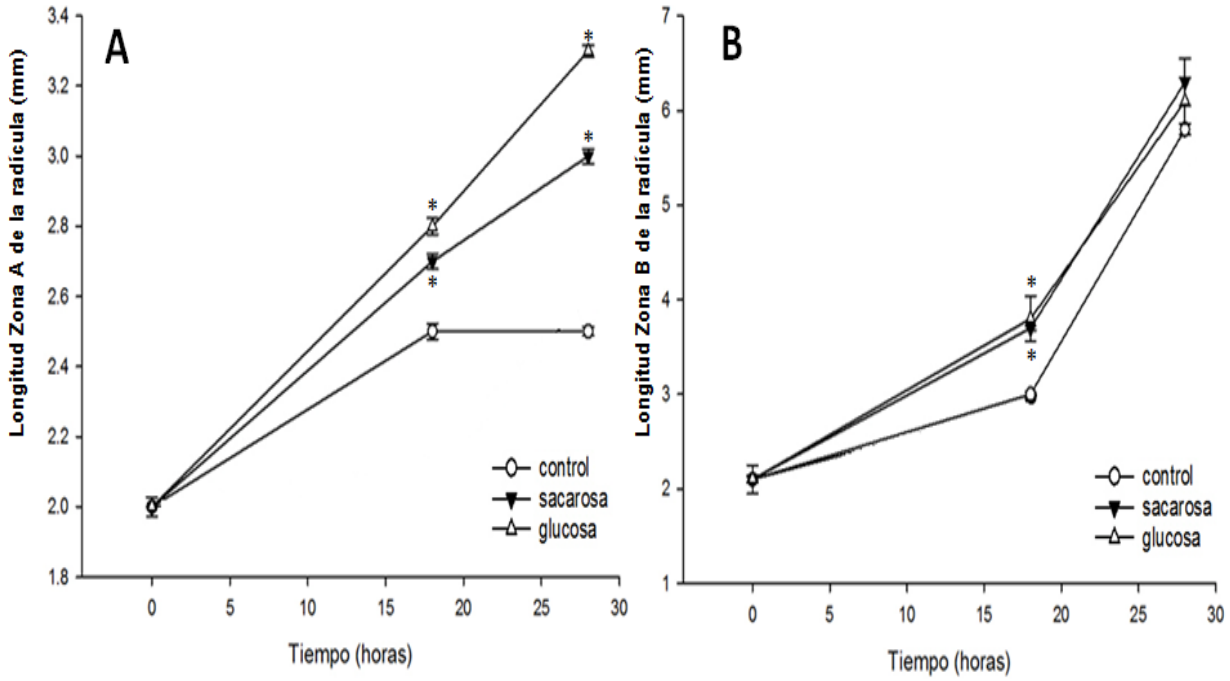

Figura 7. Longitud promedio de ambas zonas de la radícula con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM a las 0, 18 y 28 horas. **A**, Media de la distancia de la zona A ± desviación estándar**. B,** Media de la distancia de la zona B ± desviación estándar. * Indica diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo control (P ≤0.05), Los experimentos se realizaron por triplicado con 3 ejes embrionarios por cada replica, y los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía y una prueba post-hoc Dunnett.

Sabiendo que el efecto de la sacarosa y glucosa 120 mM se mantiene al menos hasta los 7 días después de imbibición, se decidió elegir 96 horas de imbibición como el tiempo más prolongado a estudiar, considerando que las células presenten diferencias entre zonas. De igual forma se confirmó que la morfología de los ejes embrionarios en los diferentes tratamientos se mantiene constante de acuerdo a lo reportado; los ejes embebidos en presencia de sacarosa muestran el inicio de la formación de pelos radiculares, mientras que los embebidos con glucosa se desarrollan de manera torcida comparados con el control (Figura 8).

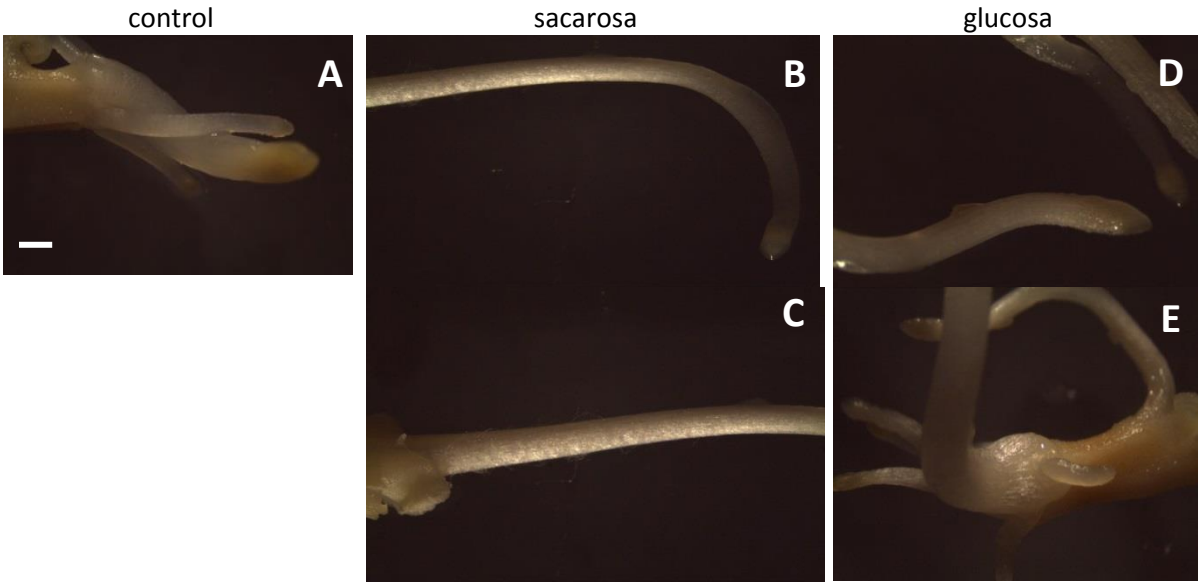

Figura 8. El cambio morfológico producido por los azúcares se mantiene a las 96 horas. A, Vista de la raíz de un eje embrionario en condiciones control**. B** y **C,** Eje embrionario embebido en presencia de sacarosa 120 mM. **B,** Vista de la raíz de eje embrionario en presencia de sacarosa; **C**, Amplificación de la raíz, muestra el inicio de la formación de pelos radiculares. **D** y **E,** Eje embebido en presencia de glucosa 120 mM**. D**, Vista de la raíz de eje embrionario en presencia de glucosa; **E,** Morfología torcida del eje embrionario. Barra de escala 1 mm.

Una vez que se decidió el tiempo más prolongado a estudiar, se verificó si la longitud de la zona A (zona meristemática) mantenía la misma longitud que se había establecido con anterioridad.
Para ello, se embebieron ejes por 96 horas en los diferentes tratamientos, se deshidrataron, incluyeron y se realizaron cortes histológicos, que se tiñeron con safranina y verde rápido, esto por triplicado biológico en cada tratamiento utilizando tres ejes embrionarios por cada replica. La Figura 9 muestra la zona radicular con diferencias morfológicas entre las células de ambas zonas. Las células más cercanas al ápice de la raíz (meristemáticas) son pequeñas, isodiamétricas y desordenadas. Conforme se alejan del ápice se vuelven cúbicas o rectangulares y forman filas, lo cual fue utilizado para determinar la transición y longitud de las zonas A y B. La longitud de la zona A en todos los tratamientos fue de 2 mm, coincidiendo con el cambio de coloración de la punta de la radícula que luce más oscura (Figura 8A) posiblemente por la mayor densidad celular en esa zona.

Por lo que se definió a la Zona A de 2 mm de longitud iniciando desde la punta de la radícula; esta medida se conservó para el otro tiempo que se decidió analizar (60 horas) para tener un curso temporal desde las 0 hasta las 96 horas.

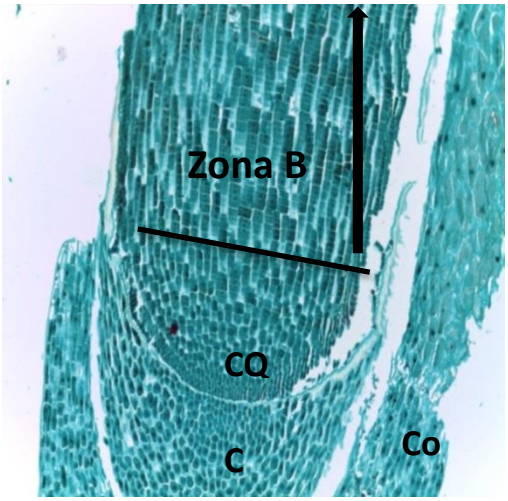

Figura 9. Corte histológico de eje embrionario mostrando la frontera entre la zona meristemática (zona A) y la zona de elongación/diferenciación (zona B). Tinción con safranina y verde rápido a las 96 horas después de imbibición en el grupo control. **Izquierda**. Donde **C**, Cofia; **Co**, Coleorriza; **CQ,** Centro quiescente; **la línea** muestra el área de transición entre las zonas A y B Amplificación 10X.

El contenido de ADN en las zonas A y B en cada uno de los tratamientos podría permitir relacionar el estadio del ciclo celular en el que se encuentran la mayoría de los núcleos analizados con la presencia y formación de complejos entre las proteínas ciclinas y CDKs encontrados y así atribuir de ser posible una relación entre la fase del ciclo celular y el efecto que tengan estos carbohidratos en las proteínas estudiadas. Lo anterior involucra realizar experimentos por citometría de flujo.

Para iniciar los experimentos de citometría de flujo se comprobó la linealidad de los láseres del citómetro, y se analizaron células L929 (tejido conectivo de ratón) con contenido de ADN diploide (Apéndice A) esto observar el comportamiento de un ciclo celular normal y uniforme.

Posteriormente se analizaron los núcleos extraídos de las zonas A y B de los ejes embrionarios de maíz embebidos en cada tratamiento en todos los tiempos estudiados por triplicados biologicos, cada replica con 25 ejes embrionarios. Antes de analizar la cantidad de yoduro de propidio incorporado en cada muestra se tiene que realizar una discriminación inicial de los núcleos que pasan por el citómetro de flujo, para ello primero se selecciona una población uniforme, posteriormente se elimina la probabilidad de que estén pasando núcleos pegados a la vez por el láser y por último se seleccionan las poblaciones que incorporaron el yoduro de propidio (Apéndice B).

Estos histogramas muestran una discriminación adecuada, observando un primer pico y un segundo pico en el doble de intensidad de fluorescencia relativa del primero, correspondientes a las fases G_1 y G_2 del ciclo celular respectivamente, dejando en medio de éstas a la fase S. Estos histogramas fueron analizados utilizando el software FlowJo 10, que permite determinar el porcentaje de núcleos en cada una de las fases G_1, G_2 y S. Las gráficas de las figuras 10 y 11 muestran el porcentaje de los núcleos en cada fase en ambas zonas del eje embrionario a

diferentes tiempos en cada uno de los tratamientos, los respectivos histogramas de cada gráfica se encuentran en al apéndice C.

En cuanto a la Zona A (Figura 10), comparando glucosa 120 mM con el grupo control se observa un cambio en el porcentaje de núcleos desde las 18 horas en las fase G_1, S y G_2, disminuyendo en las fases G_1 y S y aumentando la cantidad de núcleos en la fase G_2. Y es hasta las 60 horas en las que se vuelve a observar otra diferencia evidente entre el grupo control y glucosa, ya que con la presencia de este carbohidrato aumentan los núcleos en la fase S y disminuyen en la fase G_2; por ultimo a las 96 horas después de imbibición los núcleos extraídos de ejes embrionarios embebidos en presencia de glucosa tienen un menor porcentaje de núcleos en la fase G_1, mayor en la fase S y G_2 comparado con el grupo control.

Al comparar el grupo de sacarosa 120 mM con el grupo control en la zona A, de igual forma que con glucosa el porcentaje de núcleos en la fase G_2 aumenta a las 18 horas y disminuye en la fase S; de igual forma al otro carbohidrato, es a las 60 horas después de imbibición en el que se observa un cambio evidente del comportamiento de los núcleos comparando con el grupo control, aumentando en la fase G_1 y S, y disminuyendo en la fase G_2. Por último, a las 96 horas disminuyen los núcleos en la fase G_1 y aumentan de manera considerable en la fase S.

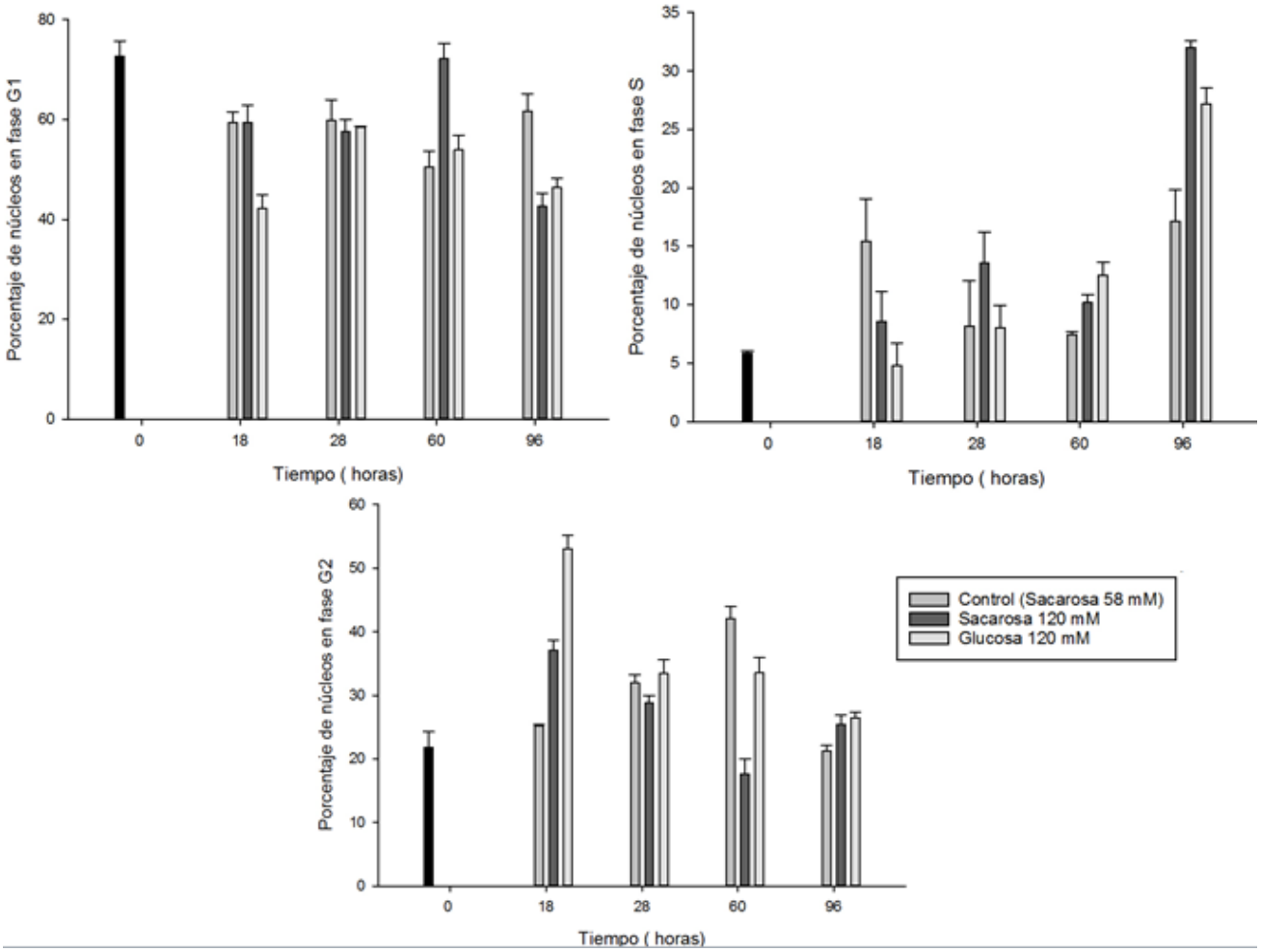

Figura 10. Porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular en la zona A en cada tratamiento desde las 0 hasta las 96 horas. Las gráficas muestran la media ± desviación estándar del porcentaje de núcleos en cada fase, los experimentos se realizaron por triplicado con 25 ejes embrionarios por cada replica.

En cuanto a la zona B (Figura 11), a diferencia de la zona A, no se observa tan claramente las diferencias en el porcentaje de núcleos con los diferentes tratamientos, excepto a las 60 horas donde los grupos con sacarosa y glucosa 120 mM aumentan el número de núcleos en la fase G_1 y disminuyen en las fases S y G_2 comparados con el control. De igual forma a las 96 horas los núcleos en la fase G_1 disminuyen con respecto al tiempo anterior; sin embargo, continúan superando a los observados en el grupo control, en la fase S disminuyen de manera más evidente respecto al grupo control y en la fase G_2 aumentan. Aunque existen estas diferencias en los diferentes tratamientos, estos muestran un patrón relativamente uniforme en los tiempos analizados a diferencia de la zona A.

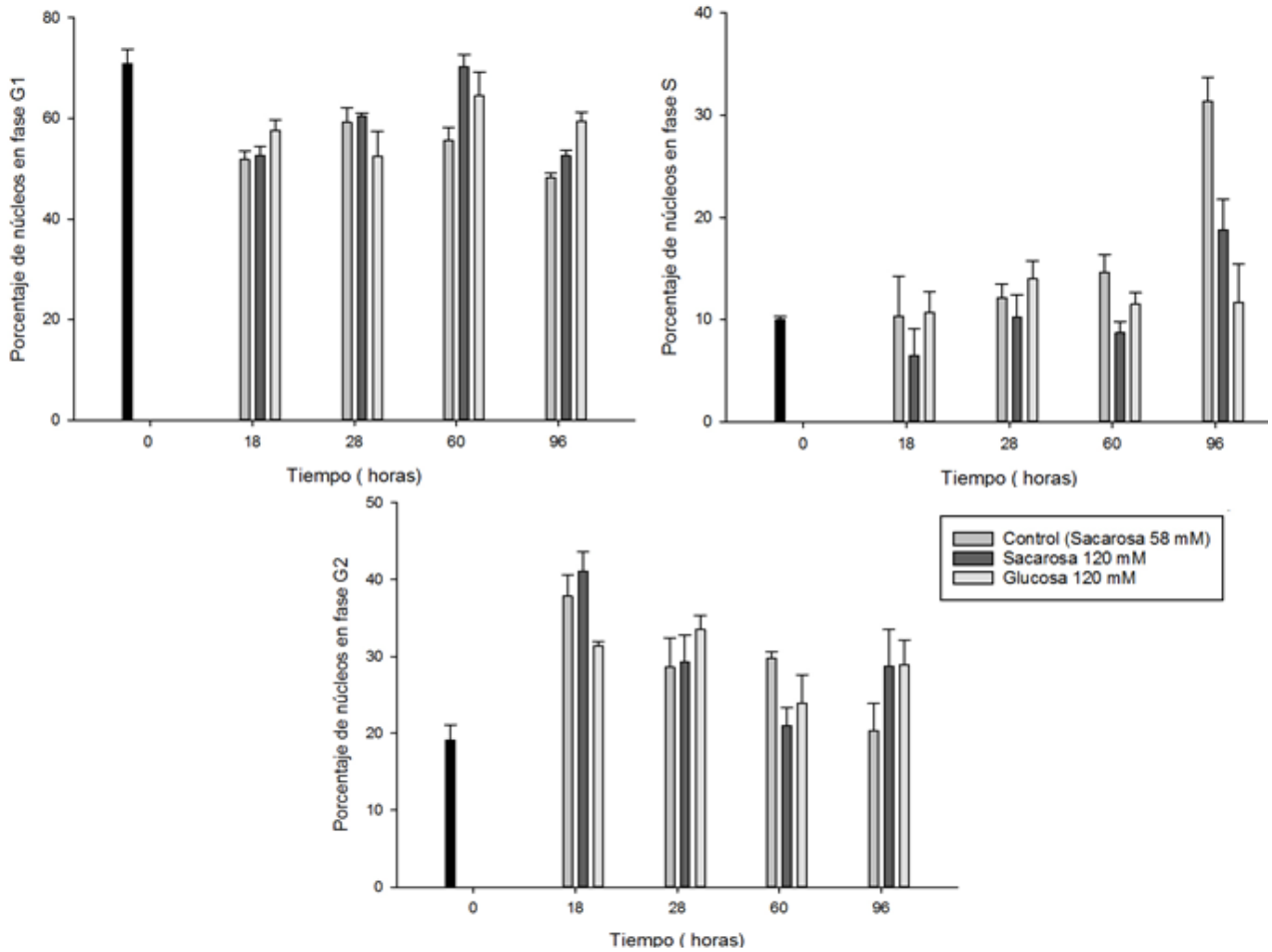

Figura 11. Porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular en la zona B en cada tratamiento desde las 0 hasta las 96 horas. Las gráficas muestran la media ± desviación estándar del porcentaje de núcleos en cada fase, los experimentos se realizaron por triplicado con 25 ejes embrionarios por cada replica.

Para analizar la abundancia proteica en las zonas A y B se realizaron ensayos de western-blot con extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos desde las 0 hasta las 96 horas, por triplicados bilógicos. Esto para determinar la abundancia proteica en ambas zonas y ser utilizados como controles para los inmunoprecipitados de la presencia de las proteínas en las condiciones estudiadas, y determinar si tienen una abundancia preferencial y si esta se modifica por la presencia de los carbohidratos.

Los resultados muestran que la abundancia de ZmCDKB1;1 de una masa aproximada de 37 KDa (Figura 12) es semejante entre zonas, y en los diferentes tratamientos de las 0 a las 28 horas, excepto por una disminución de esta proteína con sacarosa a las 18 horas en ambas zonas respecto al control.

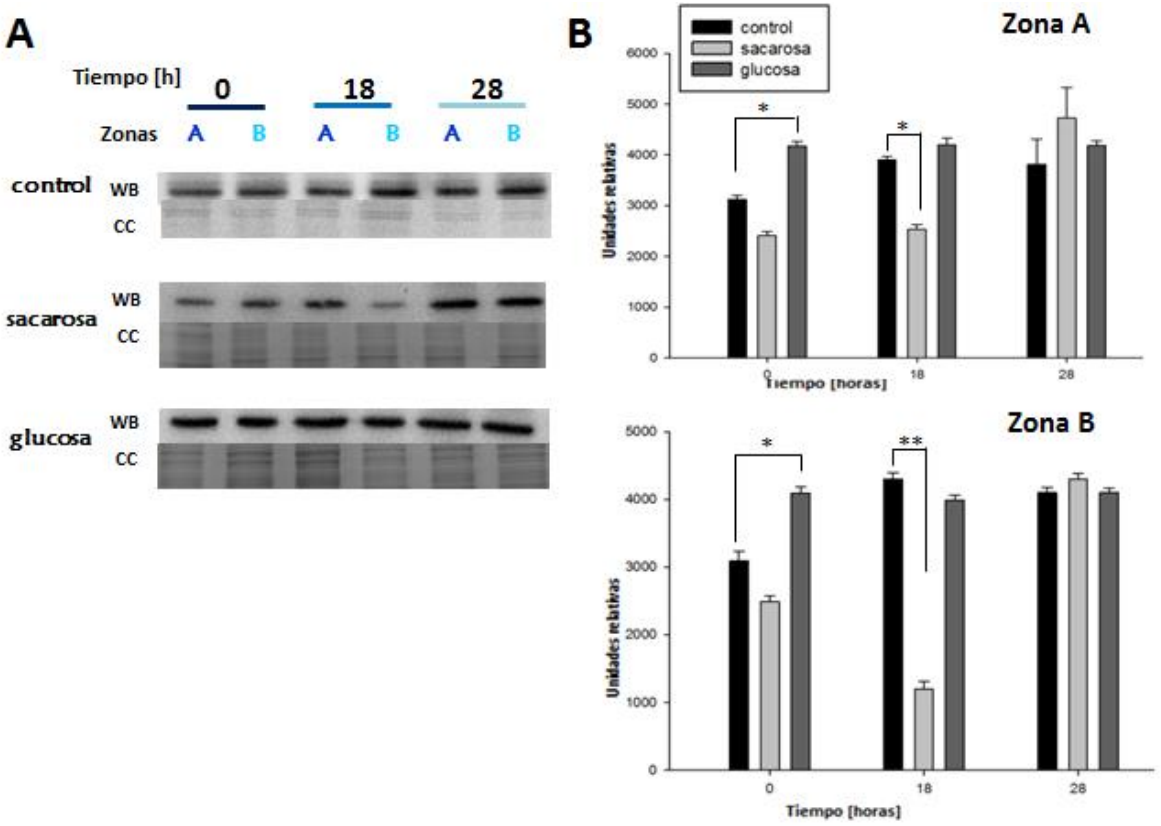

Figura 12. Abundancia de la ZmCDKB1;1 en las diferentes zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM desde las 0 hasta las 28 horas después de imbibición. **A.** Inmunodetección para determinar la abundancia de la proteína en los diferentes tratamientos, cada uno con su respectivo control de carga CC (tinción con Rojo de Ponceau), **B.** Densitometría respecto a la intensidad de cada banda. Cada barra representa el promedio ± error estándar de tres replicas biológicas, utilizando 25 ejes embrionarios por tiempo y tratamiento para preparar los extractos proteicos. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa comparado con el control al mismo tiempo (*P ≤0.05, **P ≤0.01).

A las 60 horas después de imbibición, la abundancia proteica de la ZmCDKB1;1 (Figura 13A) es diferencial entre ambas zonas analizadas, además de que se modifica por la presencia de azúcares. Mientras que en el control esta CDK es más abundante en la zona B, con sacarosa y glucosa 120 mM este patrón se invierte; a las 96 horas la proteína ZmCDKB1;1 (Figura 13B) muestra de manera más evidente el patrón diferencial de acumulación entre zonas en los diferentes tratamientos que a las 60 horas.

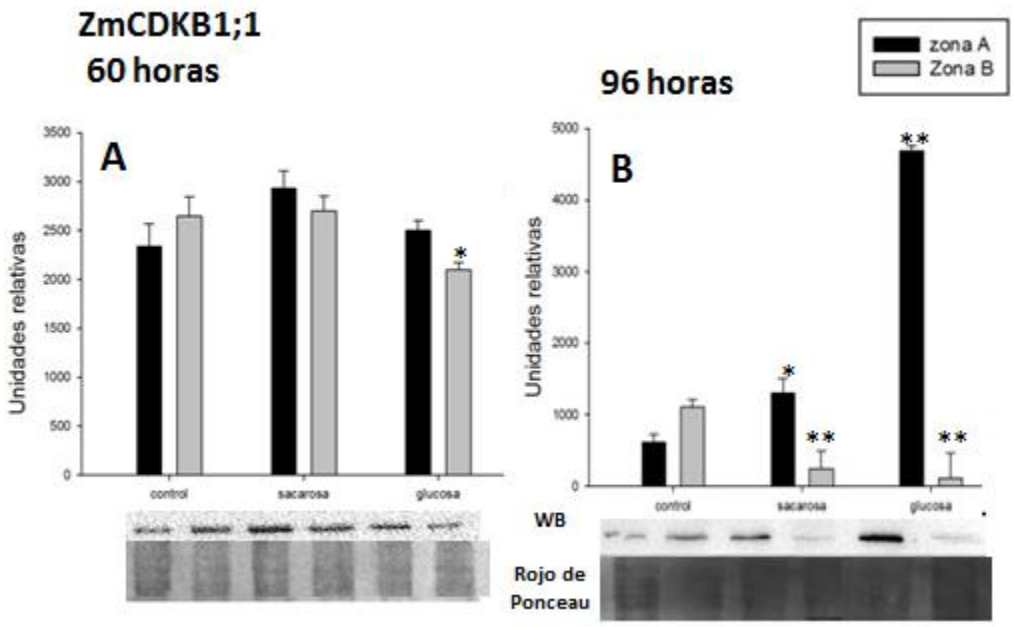

Figura 13. Abundancia de la ZmCDKB1;1 en dos zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM a 60 y 96 horas después de imbibición. Inmunodetección para determinar la abundancia de la proteína en los diferentes tratamientos, a las 60 horas (**A**) y 96 horas (**B**) cada uno con su respectivo control de carga (tinción con Rojo de Ponceau). Las gráficas muestran la densitometría respecto a la intensidad de cada banda. Cada barra representa el promedio ± error estándar de tres replicas biológicas, utilizando 25 ejes embrionarios por tiempo y tratamiento para preparar los extractos proteicos. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa comparado con el control al mismo tiempo (*P ≤0.05, **P ≤0.01).

La inmunodetección de la proteína ZmCDKA muestra de una a tres bandas, ya que este anticuerpo es capaz de detectar tres isoformas de esta proteína de 32, 34 y 36 kDa respectivamente que pueden o no encontrarse presentes en los diferentes extractos proteicos. Para realizar la densitometría únicamente se cuantifico la banda de 36 kDa en todos los tiempos analizados.
La abundancia proteica de la ZmCDKA (Figura 14) mostró un aumento a las 28 horas en ambas zonas y una disminución a las 18 horas en la zona B en presencia de sacarosa 120 mM, mientras que con el resto de los tratamientos esta proteína no muestra diferencia.

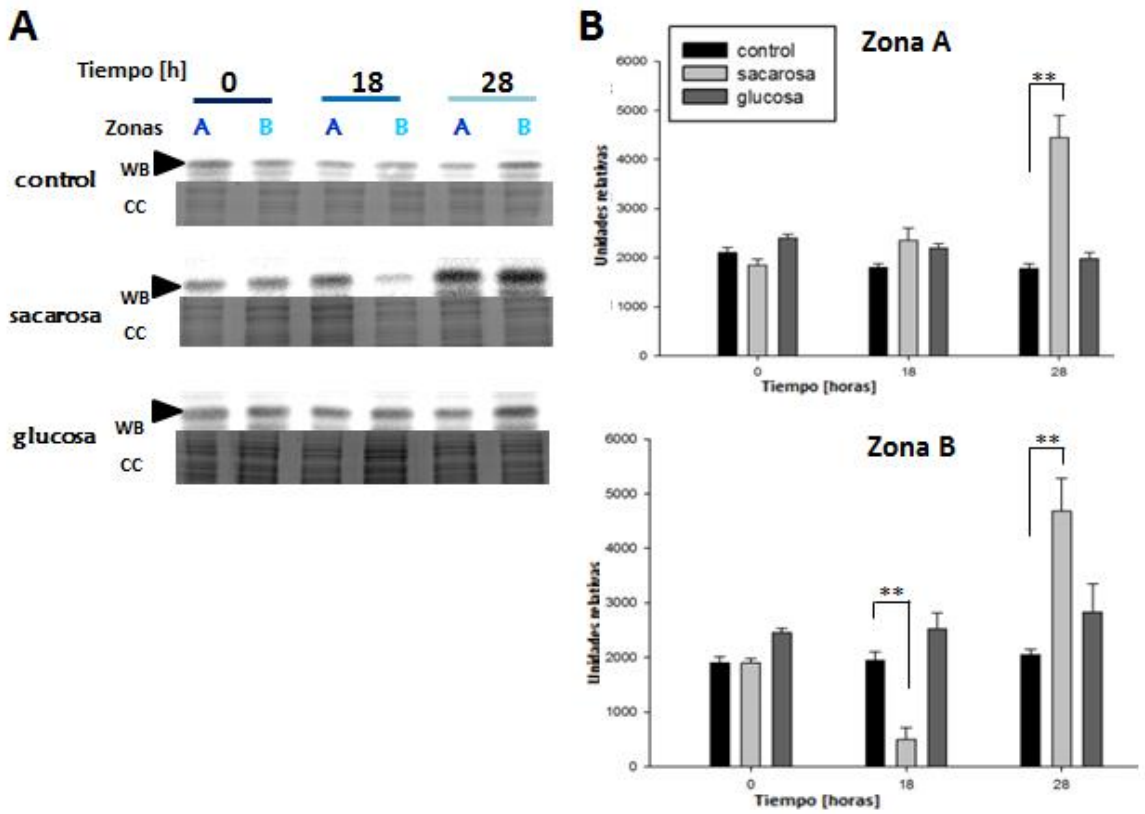

Figura 14. Abundancia de la ZmCDKA en las diferentes zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM desde las 0 hasta las 28 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 12 para detalles).

A las 60 horas la proteína ZmCDKA (Figura 15A) la presencia de sacarosa 120 mM promueve un aumento en la abundancia en ambas zonas comparando con el grupo control; este aumento producido por la sacarosa 120 mM a las 60 horas en ambas zonas se deja de observar a las 96 horas (Figura 15B), en cambio, a este tiempo el patrón de acumulación entre tratamientos en ambas zonas es similar, con una disminución en la cantidad de proteína en presencia de sacarosa y glucosa 120 mM comparando con el grupo control, siendo menor la caída en la zona B que en la A.

La glucosa a las 60 horas después de imbibición invierte el patrón de los niveles proteicos de la CDKA entre zonas comparando con el grupo control, fenómeno que se invierte a las 96 horas.

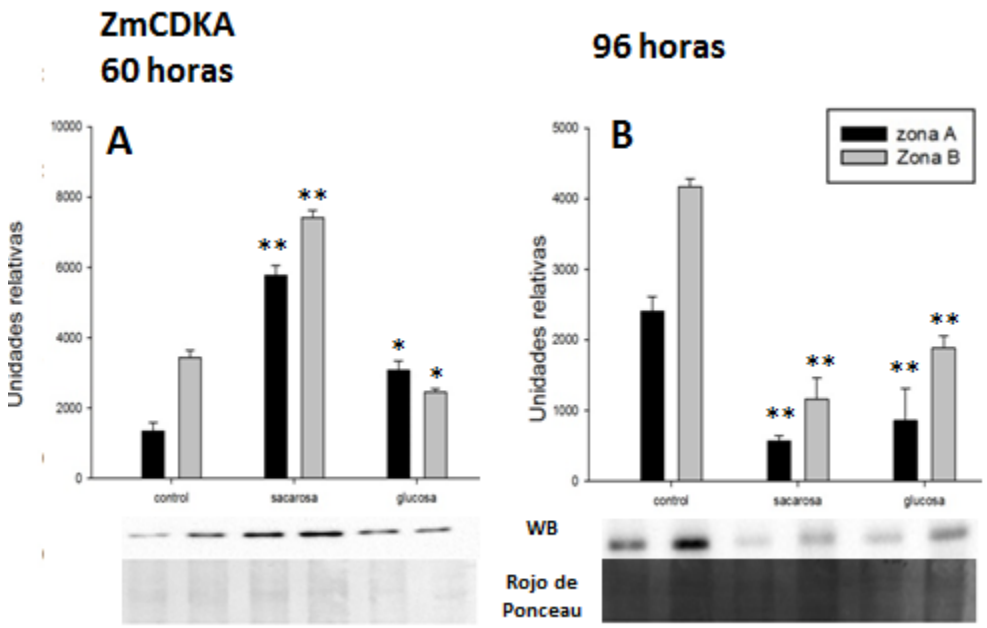

Figura 15. Abundancia de la ZmCDKA en dos zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM a 60 y 96 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 13 para detalles).

En cuanto al antígeno nuclear de células en proliferación o PCNA (25 KDa) (Figura 16 y 17), que es una proteína auxiliar para la ADN polimerasa delta y estimula tanto la actividad de la polimerasa como su procesividad (López *et al.,* 1997), mostro un patrón similar en todos los tratamientos, sólo se observa un aumento con sacarosa 120 mM y una disminución en el grupo con glucosa 120 mM a las 60 horas en ambas zonas.

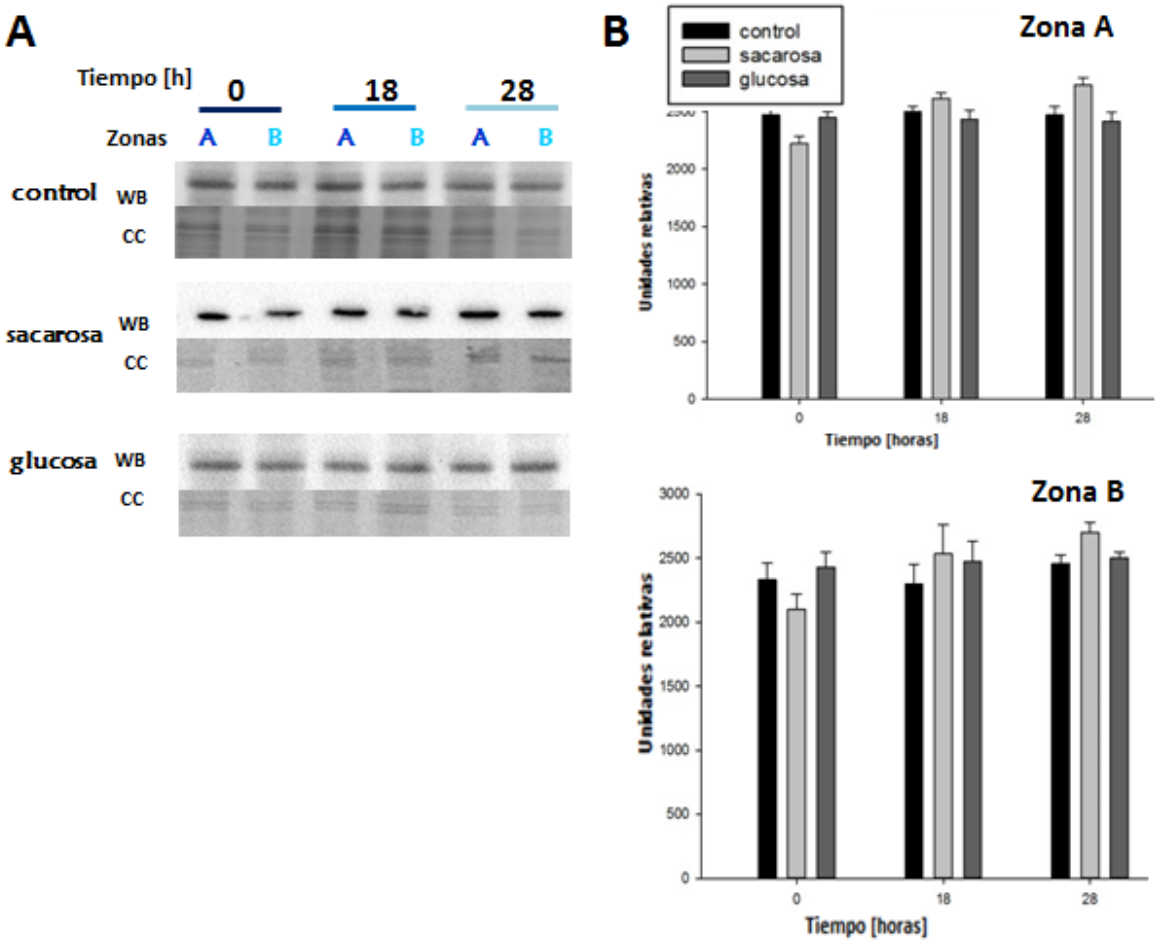

Figura 16. Abundancia de ZmPCNA en las diferentes zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM desde las 0 hasta las 28 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 12 para detalles).

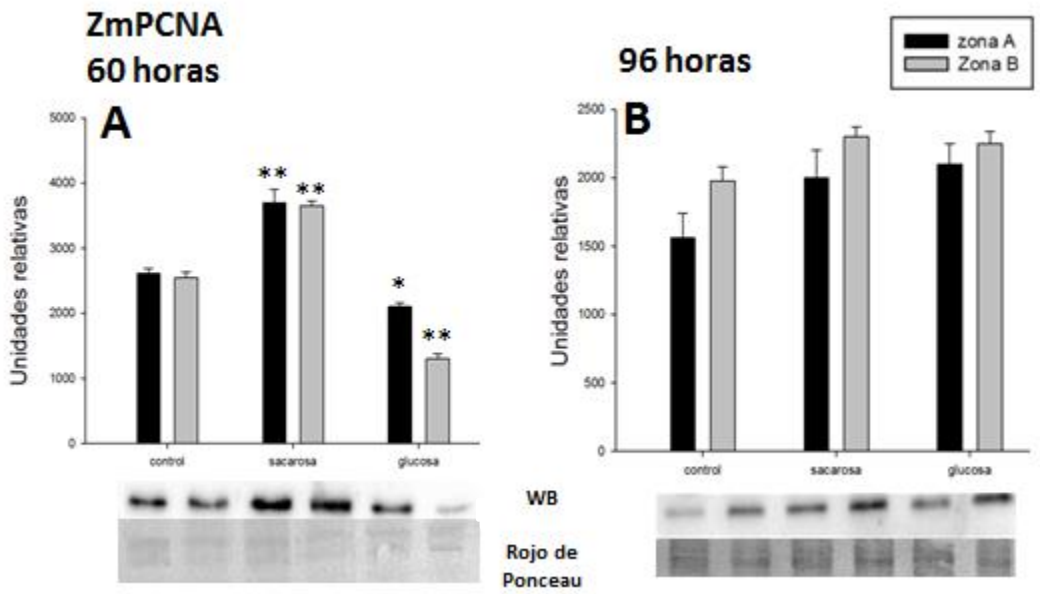

Figura 17. Abundancia de la ZmPCNA en dos zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM a 60 y 96 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 13 para detalles).

Los niveles proteicos de la ZmCycD3;1 (40 KDa) (Figura 18) no cambian de manera significativa en las zonas A y B de las 0 a las 28 horas en los grupos con sacarosa (120 mM) y control (sacarosa 58 mM), Con glucosa disminuye la cantidad de esta proteína en ambas zonas a las 28 horas, respecto al tiempo anterior del mismo tratamiento y al control. A las 18 horas se observa una diferencia entre los grupos de azúcares 120 mM respecto al control sin embargo comparando con el tiempo anterior del mismo tratamiento respectivamente no se observa diferencia.
A las 60 horas (Figura 19A) y 96 horas (Figura 19B) esta ciclina muestra un patrón similar entre zonas y tratamientos.

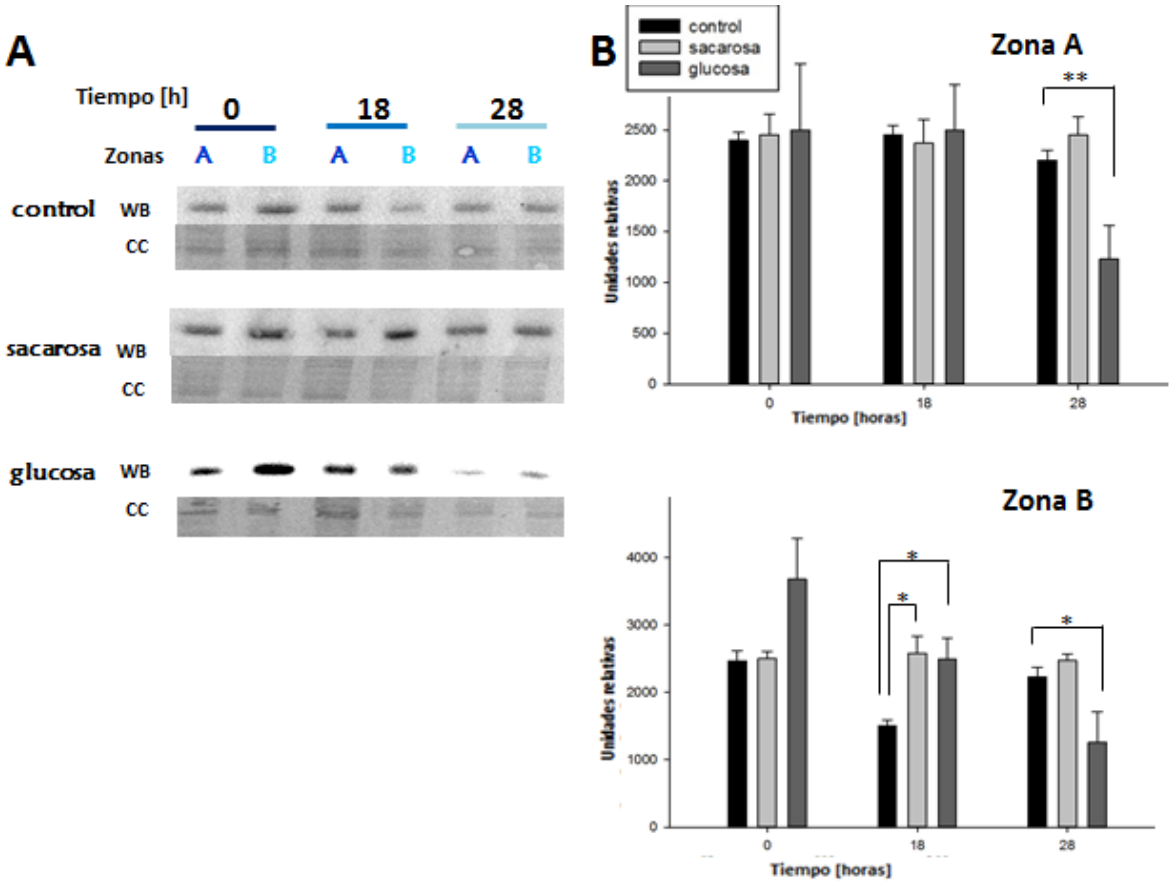

Figura 18. Abundancia de la ZmCycD3;1 en las diferentes zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM desde las 0 hasta las 28 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 12 para detalles).

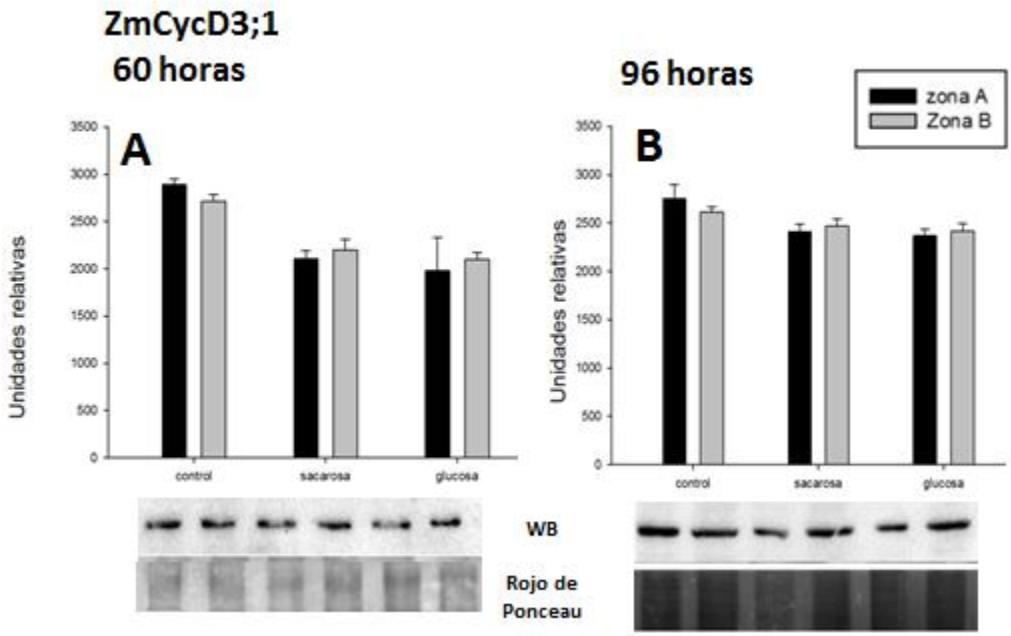

Figura 19. Abundancia de la ZmCycD3;1 en dos zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM a 60 y 96 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 13 para detalles).

La proteína ZmCycB1;2 (cuantificando la banda en la masa esperada de 50 KDa) mostro un cambio en su comportamiento en presencia de sacarosa y glucosa 120 mM. En presencia de glucosa disminuye la abundancia de esta proteína desde las 18 horas en la zona A respecto al control, pero aumenta el nivel respecto al tiempo anterior del mismo tratamiento y solo a las 28 horas la glucosa promueve un aumento en ambas zonas. Por otro lado, con sacarosa se observa una disminución a las 18 y 28 horas en ambas zonas (Figura 20).

ZmCycB1;2 muestra un patrón diferente entre zonas a las 60 horas después de imbibición (Figura 21A), y un cambio muy evidente de este patrón se observa en el grupo con glucosa en el que se invierte esta distribución comparado tanto con el control como con sacarosa 120 mM. Con sacarosa 120 mM se mantiene la distribución pero aumenta la cantidad de la proteína en ambas zonas. A las 96 horas (Figura 21B) ya no se observa el patrón invertido en el grupo con glucosa que se observa en el tiempo anterior, sin embargo se mantiene el patrón diferencial entre zonas con todos los tratamientos con una disminución en la cantidad de proteína en la zona A en los grupos con sacarosa y glucosa 120 mM comparado con el control.

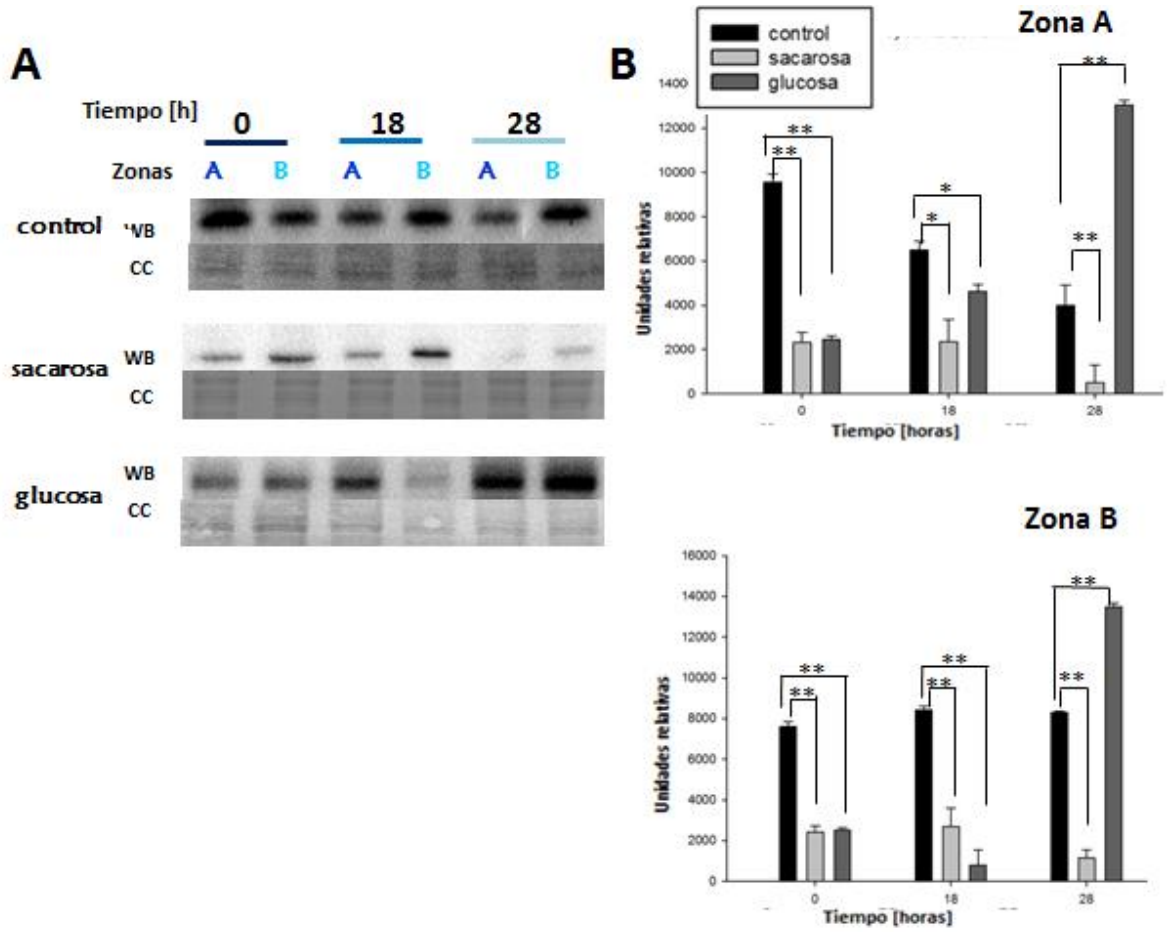

Figura 20. Abundancia de la ZmCycB1;2 en las diferentes zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM desde las 0 hasta las 28 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 12 para detalles)

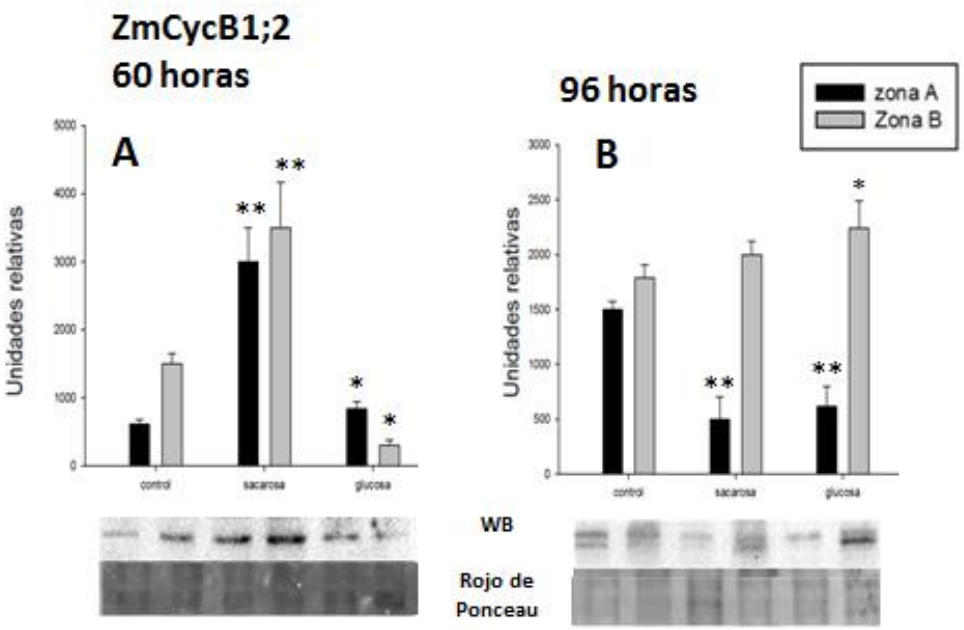

Figura 21. Abundancia de la ZmCycB1;2 en dos zonas de ejes embrionarios de maíz con sacarosa 58 mM (control), sacarosa 120 mM, y glucosa 120 mM a 60 y 96 horas después de imbibición. (ver pie de Figura 13 para detalles).

Presencia de complejos Cyc-CDK en extractos nucleares

Para conocer si las ciclinas interaccionan con las CDKs a las 28, 60 y 96 horas, tiempos en los que se observan evidentes diferencias en la abundancia proteica entre zonas y tratamientos, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con extractos nucleares por duplicado.

Para realizar los inmunoprecipitados primero se embebieron los ejes embrionarios en cada tratamiento el tiempo necesario, se realizó una extracción nuclear de cada zona definida y una vez verificada la correcta extracción (Apéndice D) y cuantificado este extracto por el método de Bradford se dejó interaccionar 50 µg del extracto con la proteína agarosa que previamente se incubo ya sea con el anticuerpo anti-ZmCycB1;2 o anti-ZmCycD3;1, se realizaron los lavados necesarios y posteriormente se realizó un Western blot inmunodetectando con el anticuerpo anti-ZmCDKA o anti-ZmCDKB1;1.

Como controles negativos para estos experimentos se cargó en el gel para la inmunodetección un inmunoprecipitado sin extracto nuclear, solamente la agarosa más el anticuerpo (R+α) en el que se puede observar solamente las inmunoglobulinas de alto peso molecular. Por otro lado se cargó un inmunoprecipitado en el que solamente se dejó interaccionar la agarosa con el extracto nuclear (R+E) sin la previa incubación con el anticuerpo, esto para descartar interacciones inespecíficas. Y

como control positivo se cargaron 50 µg de extracto nuclear (EN) en el que se puede observar claramente la presencia de las CDKs.

En cuanto a la interacción de la ZmCycD3;1 con ZmCDKA (Figura 22), se observa una interacción diferencial a las 28 horas en presencia de los sacarosa y glucosa 120 mM. Mientras que con sacarosa no se observa interacción, con glucosa se observa interacción de igual forma que en el control, a las 60 y 96 horas existe interacción en todos los tratamientos en ambas zonas.

La interacción de la ZmCycD3;1 con ZmCDKB1;1 (Figura 23), al igual que con ZmCDKA, es diferencial en presencia de sacarosa y glucosa 120 mM a las 28 horas; mientras que con el primer carbohidrato no se observa interacción, con el segundo está presente la interacción en ambas zonas del eje embrionario, comparando con el control que sólo muestra interacción en la zona A; a las 96 horas al contrario de las 28, se observa en el grupo control interacción de estas proteínas (CycD3;1-CDKB) en ambas zonas y sólo en la zona A del grupo con glucosa,

La interacción de la ZmCycB1;2 con ZmCDKA (Figura 24) es similar a lo largo de los tiempos analizados en todos los tratamientos y en ambas zonas, con excepción de glucosa a las 96 horas en la zona B donde la interacción no se observó. El inmunocomplejo con la ZmCDKB1;1 muestra diferencias a las 96 horas (Figura 25); en el grupo control se encuentra presente en ambas zonas, de igual forma que con glucosa, pero no así con sacarosa 120 mM.

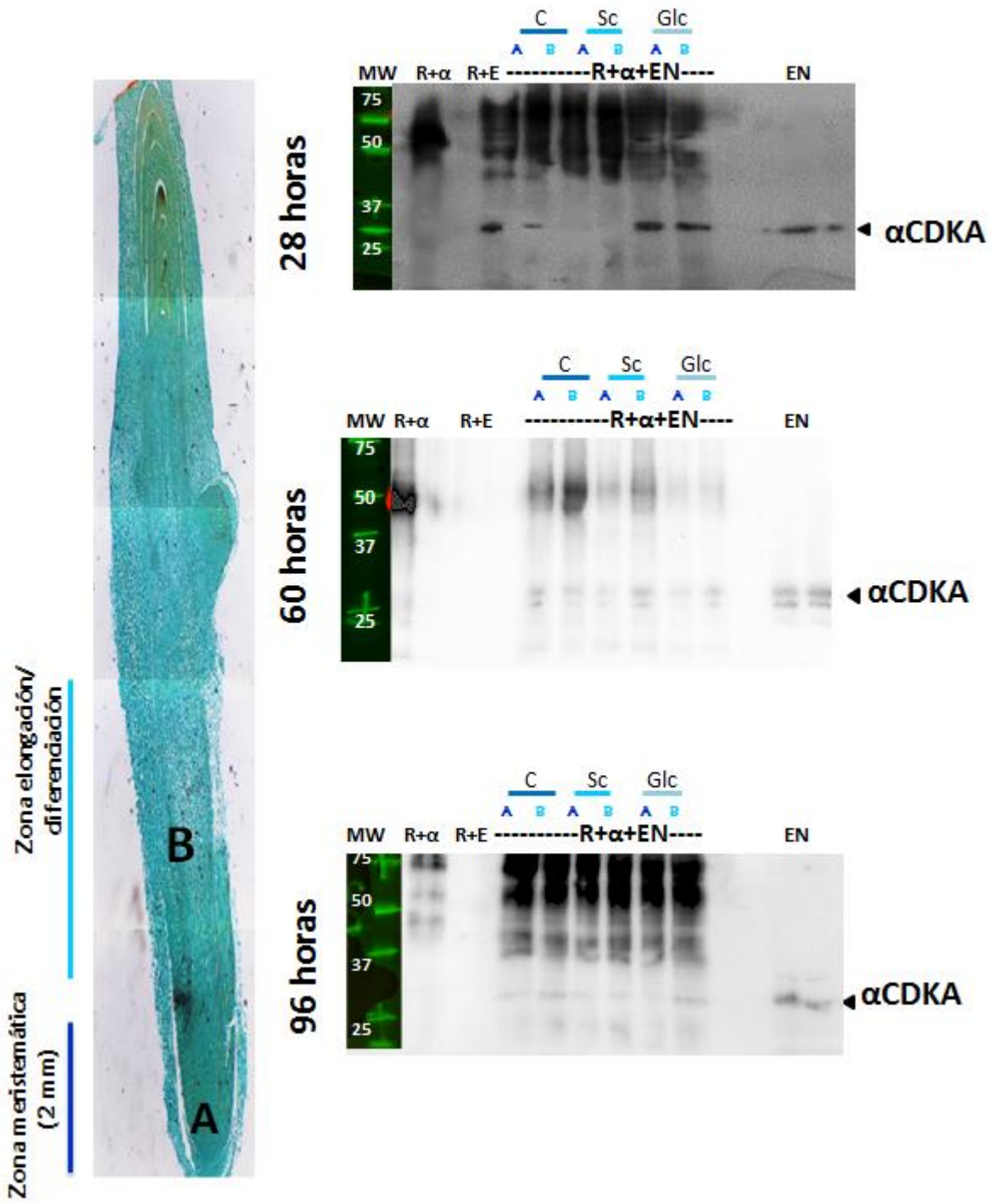

Figura 22. Ensayos de Western blot de inmunoprecipitados de la ZmCycD3;1 revelado contra ZmCDKA. MW. Marcadores de masa molecular; **R+α**, Resina + anticuerpo ZmCycD3;1 ; **R+E,** Resina + Extracto nuclear; **EN**, Extracto nuclear; **R+α+EN**, Resina+ anticuerpo ZmCycD3;1+ extractos nucleares, de cada zona en cada tratamiento C (control sacarosa 58 mM), Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM). La figura muestra una imagen representativa de un duplicado biológico, utilizando 100 ejes embrionarios por tiempo y tratamiento para preparar los extractos nucleares.

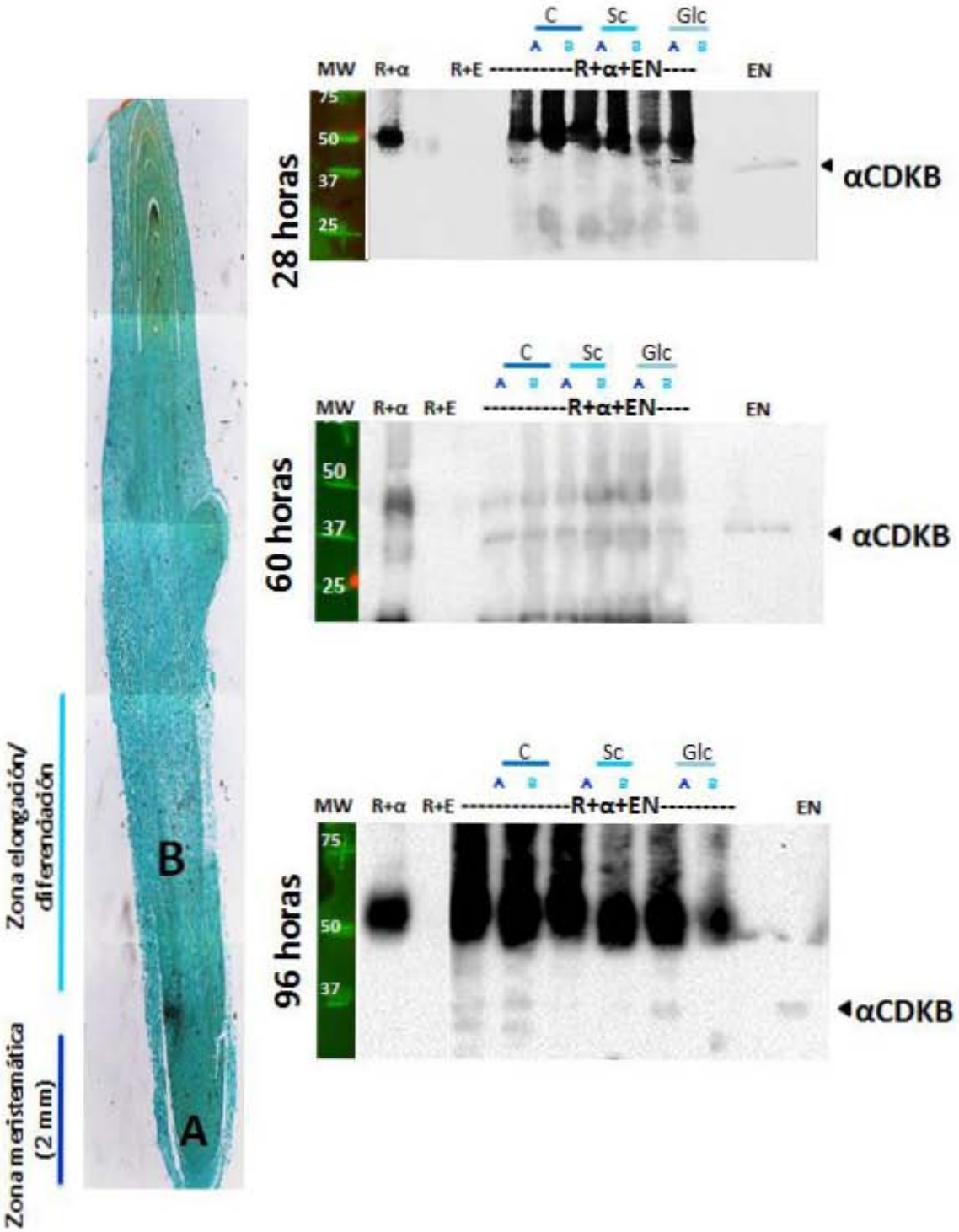

Figura 23. Ensayos de Western blot de inmunoprecipitados de la ZmCycD3;1 revelado contra ZmCDKB1;1. MW.Marcadores de masa molecular; **R+α**, Resina + anticuerpo ZmCycD3;1 ; **R+E,** Resina + Extracto nuclear; **EN**, Extracto nuclear; **R+α+EN**, Resina+ anticuerpo ZmCycD3;1+ extractos nucleares, de cada zona en cada tratamiento C (control sacarosa 58 mM), Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM).

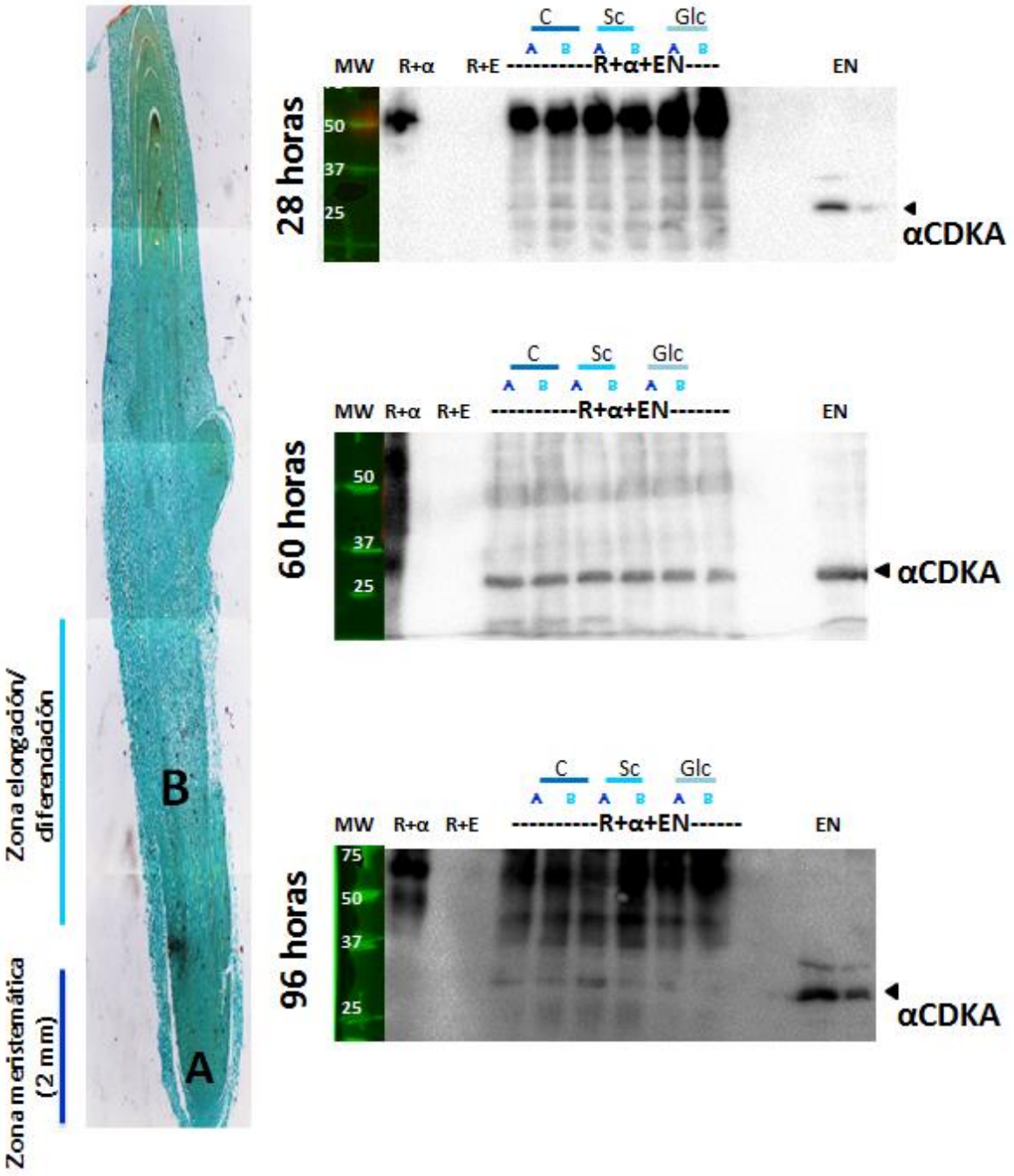

Figura 24. Ensayos de Western blot preliminar de inmunoprecipitado de la ZmCycB1;2 revelado contra ZmCDKA. MW. Marcadores de masa molecular; **R+α**, Resina + anticuerpo ZmCycB1;2; **R+E,** Resina + Extracto nuclear; **EN**, Extracto nuclear; **R+α+EN**, Resina+ anticuerpo ZmCycB1;2 + extractos nucleares, de cada zona en cada tratamiento C (control sacarosa 58 mM), Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM).

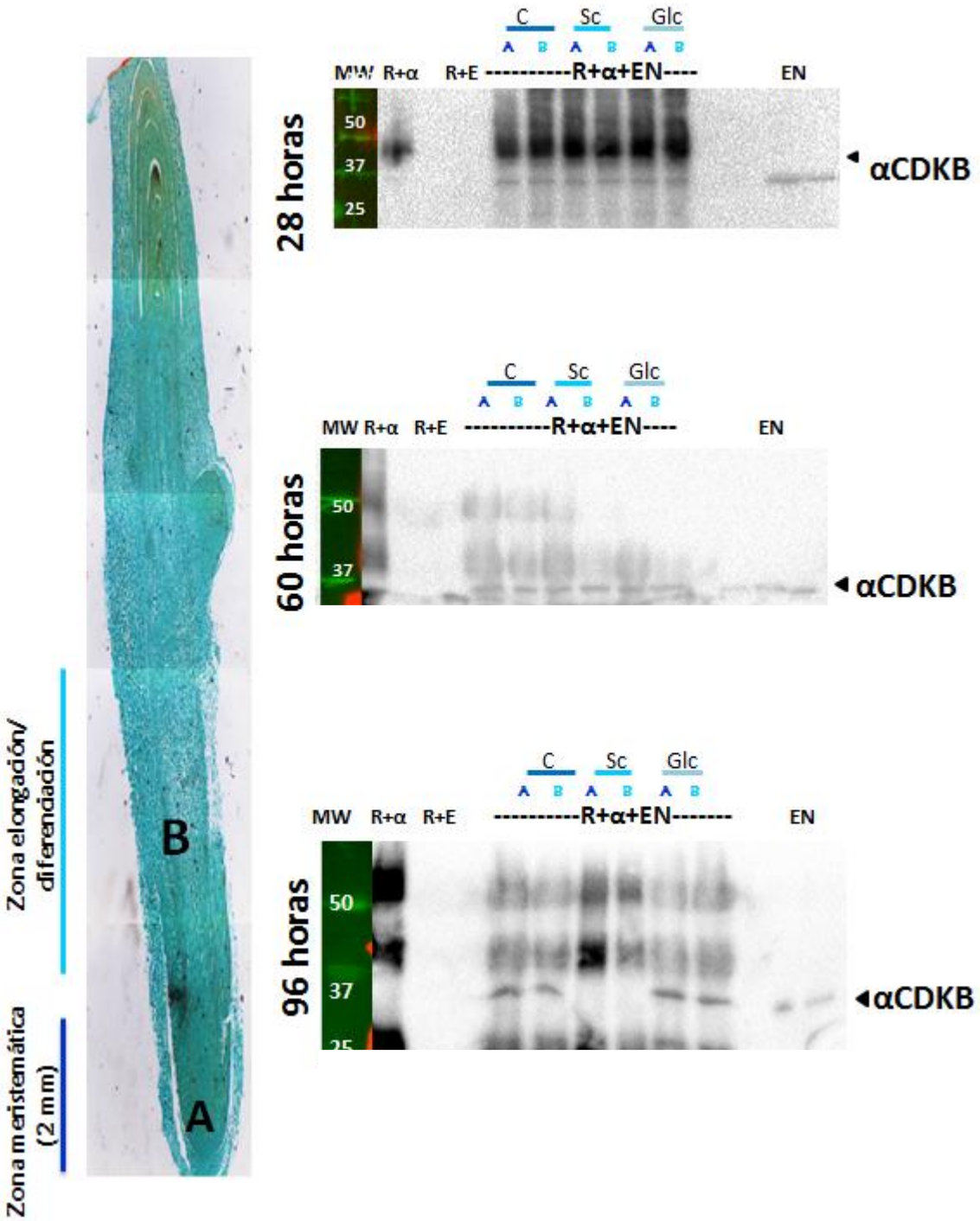

Figura 25. Ensayos de Western blot preliminar de inmunoprecipitado de la ZmCycB1;2 revelado contra ZmCDKB1;1. MW. Marcadores de masa molecular; **R+α**, Resina + anticuerpo ZmCycB1;2; **R+E,** Resina + Extracto nuclear; **EN**, Extracto nuclear; **R+α+EN**, Resina+ anticuerpo ZmCycB1;2 + extractos nucleares, de cada zona en cada tratamiento C (control sacarosa 58 mM), Sc (sacarosa 120mM), Glc (Glucosa 120mM).

Más allá de la interacción que pueda existir en presencia de sacarosa 58 y 120 mM y glucosa 120 mM, resulta importante saber si los complejos de la ZmCycD3;1 y de la ZmCycB1;2 con CDKs son activos. Para ello se realizó el ensayo de actividad de cinasa asociada a los inmunoprecipitados de cada una de las ciclinas usando como sustrato histona H1 por duplicado utilizando 100 ejes embrionarios embebidos por 96 horas en cada tratamiento para preparar el extracto nuclear, ya que a este tiempo se observa una gran diferencia tanto en los niveles de las diferentes proteínas por zona y tratamiento, como en la formación de complejos ciclina-CDK presentes.

Para realizar estos experimentos se realizó un inmunoprecipitado tanto de la ZmCycD3;1, como de la ZmCycB1;2 como se menciona en el punto 6.11, utilizando como controles negativos la agarosa más el anticuerpo, y la agarosa más el extracto nuclear en los que no se observa la fosforilación del sustrato, esto porque no hay presentes complejos activos sobre histona H1 descartando así interacciones inespecíficas. Como control positivo se utilizó un complejo recombinante de la CycD2;2/CDKB que se sabe es activo sobre este sustrato (Lopéz-Hernández, datos sin publicar, 2016). En la Figura 26 se observa que los inmunoprecipitados de ambas ciclinas son activos en todos los tratamientos en ambas zonas a las 96 horas fosforilando a la histona H1, aunque se observan dos bandas fosforiladas una de ellas es una fosforilación inespecífica que se encontraba presente en los extractos.

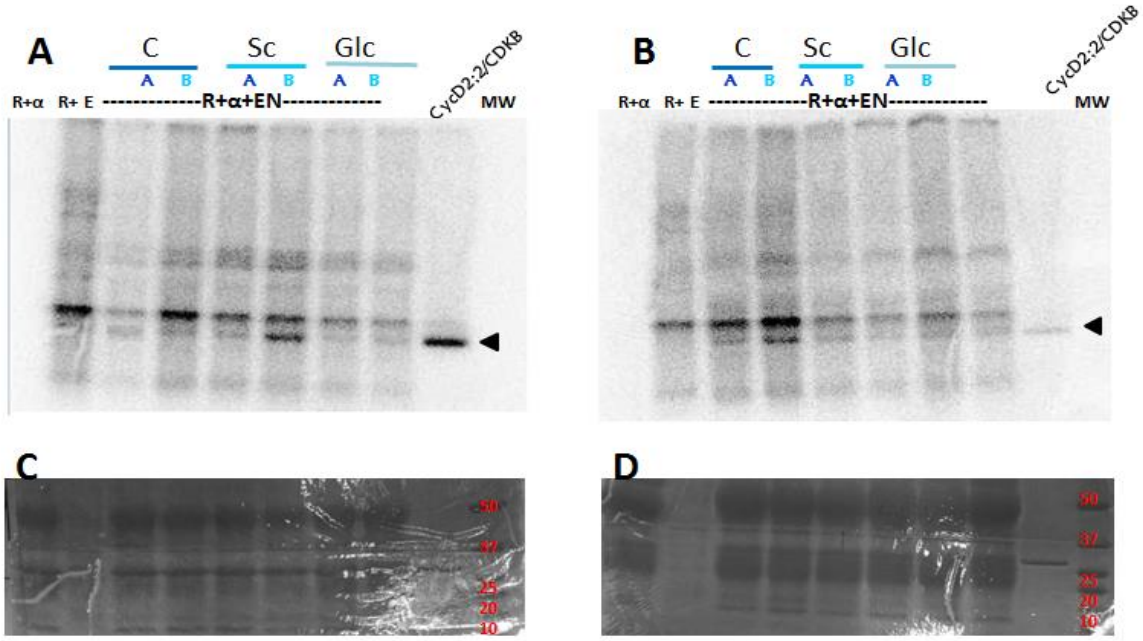

Figura 26. Actividad de cinasa asociada a las ciclinas B1;2 y D3;1 sobre Histona H1 a las 96 horas. Inmunoprecipitados de la CycB1;2 (Izquierda) y de la CycD3;1 (Derecha). **A** y **B**, Actividad de cinasa asociada a CycB1;2 y CycD3;1, en el recuadro se observa la fosforilación de H1 (25KDa); **C** y **D,** Gel teñido con azul de Coomassie como control de carga. **MW,** Marcadores de masa molecular; **R+α**, Resina + anticuerpo; **R+E,** Resina + Extracto nuclear; **R+α+EN**, Resina+ anticuerpo + extractos nucleares, de cada zona en cada tratamiento C (control sacarosa 58 mM), Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM); **CycD2;2/CDKB**, complejo recombinante utilizado como control positivo; **Cabeza de flecha.** Indica la fosforilación de la histona H1.

8. Discusión

Se lograron definir dos zonas en la radícula del eje embrionario de maíz desde las 0 hasta las 96 horas después de imbibición basándose en la morfología de las células, al realizar esta discriminación en el que una de las zonas (zona A) incluyera a la región meristemática y el centro quiescente indica que especialmente esta zona tiene una proliferación mayor a la zona que se aleja del ápice de la radícula (zona B) que incluiría en su mayoría a las células de elongación y diferenciación en el que las células aumentan de tamaño para su posterior diferenciación pero no proliferan. Además, considerando las referencias de Hochholdinger, 2009 y Jiang *et al.,* 2003 sobre la ubicación del centro quiescente y el meristemo proximal en dos variedades de maíz en diferentes tiempos de germinación, y las mediciones realizadas para determinar la longitud de la zona A en este proyecto, se podría decir que la aproximación para esta zona desde el ápice del eje embrionario resulta bastante adecuada.

Por otro lado Lara-Núñez y colaboradores en 2017 reportaron que la presencia de sacarosa y glucosa 120 mM en el medio de imbibición aumentan el número de células en el meristemo radicular de ejes embrionarios de maíz desde las 12 horas después de imbibición, a la vez que disminuye el tamaño de las células en esta región. Lo que sugiere que las células adquieren una disposición ordenada y más compacta en las zonas meristemáticas cuando los ejes embrionarios son embebidos en presencia de estos azúcares, fenómeno que se observa de manera más evidente con glucosa. Por lo tanto, se podría prever que la glucosa podría desencadenar un aumento en el número de células a través de eventos más rápidos de división celular.

Lo anterior correlaciona con la distancia determinada para la zona A desde las 0 a las 28 horas como se observa en la Figura 7, la longitud de esta zona es mayor en el grupo con glucosa, seguido del grupo con sacarosa 120 mM comparándolos con el grupo control. Que la longitud sea mayor podría deberse a este aumento en el número de las células en la región meristemática radicular debido a la presencia de los carbohidratos. De igual forma este patrón de longitud se mantuvo para los tiempos posteriores en los que también se observó que la longitud de la zona A de ejes embrionarios embebidos con sacarosa y glucosa 120 mM tienen una longitud ligeramente mayor respecto al control (datos no mostrados).

Poder definir dos zonas con diferentes capacidades proliferativas y que a su vez se modifican (al menos la zona A (Lara-Núñez *et al*., 2017; García-Ayala, 2015)) por la presencia de carbohidratos, nos da un modelo en el que se podría esperar una regulación diferente del ciclo celular modificando el contenido de ADN de las células en cada región y observar diferentes patrones de abundancia de algunas proteínas que participan en el ciclo celular.

En cuanto al contenido de ADN, se ha hipotetizado que la activación del ciclo celular (particularmente la fase G_1) es requerida para el avance de la germinación y posterior desarrollo de la plántula (Cruz-García *et al*., 1998; de Castro *et al*., 2000; Sánchez *et al*., 2005; Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Aunque el metabolismo de las semillas varía enormemente, dependiendo de las especies, algunos resultados sostienen la hipótesis: (i) Las células embebidas de semillas latentes, aunque metabólicamente activas, se mantienen en la fase G_1 hasta que la latencia se termina (de

Castro *et al*., 2001); (ii) las células meristemáticas en semillas osmoacondicionadas tienden a mantenerse en la fase G_1 por varios días o incluso semanas (Lanteri *et al.,* 1994; Cruz-García *et al*., 1995; Liu *et al*., 1996; Sánchez-Jiménez *et al*., 1997; Gurusinghe *et al*., 1999; de Castro *et al*., 2000); después de remover el agente osmótico y embeber las semillas en agua aumenta la síntesis de ADN y el avance del ciclo celular es rápidamente desencadenado (Cruz-García *et al*., 1995; de Castro *et al*., 2000) y (iii) En una semilla deteriorada o con baja viabilidad, el inicio de la fase S en las células meristemáticas asi como la protrusión de la radícula pueden retrasarse notablemente en comparación con los tiempos que toma a las células de semillas altamente viables. (Sen y Osborne, 1974; Elder *et al*., 1987; Gutiérrez *et al* ., 1993)

Mientras que el inicio de la actividad del ciclo celular normalmente acompaña a la germinación, la entrada del ciclo celular no es absolutamente necesaria para la expansión temprana del embrión asociada con la germinación. Pero la proliferación celular es absolutamente necesaria para continuar con el crecimiento y el establecimiento de la plántula (Sánchez *et al*., 2005) en el caso de los ejes embrionarios embebidos *ex situ* no forman una plántula ya que al incubarse en oscuridad el desarrollo del vástago no sucede de manera normal sin embargo continua el crecimiento.

La cantidad de núcleos en ejes embrionarios secos con contenido de ADN 2C (fase G_1) en la zona A es de 70.86 % y en la zona B es de 72.64 %; los núcleos en la fase G_2 con un contenido de ADN 4C (fase G_2) es de 19.15 y 21.81 % respectivamente (Figura 10). Estos resultados concuerdan con los reportados por Sánchez *y* colaboradores (2005) en ápices de raíz de ejes de semilla seca de maíz, con un 82 % de núcleos en G_1 y 17 % en G_2. Por lo tanto, no existe diferencia con ejes embrionarios secos quizá porque las células en ambas regiones se encuentran en un estado similar de latencia.

El establecimiento de la fase G_1 del ciclo celular es un proceso temprano en la germinación de ejes embrionarios de maíz, sin embargo se necesita tener presente que las células en la radícula del eje embrionario de maíz son asincrónicas.
La glucosa puede acelerar la germinación en ejes embrionarios de maíz, en parte, por la estimulación de la progresión del ciclo celular, mientras que la sacarosa tiene un efecto similar afectando la progresión del ciclo celular, pero en menor medida comparada con la glucosa como se observa en el aumento en la síntesis *de novo* de ADN en la radícula de ejes embrionarios (Lara-Núñez *et al.,* 2017); esta estimulación producida por los carbohidratos se ve reflejada en el porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular en cada tiempo analizado, lo cual indica que estos carbohidratos modulan la progresión del ciclo celular.

Nuestros resultados indican que a las 18 horas en todos los tratamientos en la zona A disminuye el porcentaje de núcleos en la fase G_1 comparado con 0 horas, lo que muestra que el ciclo celular está progresando. Al analizar el aumento del porcentaje de núcleos tanto en la fase S como G_2, observamos que a partir de esta hora la progresión del ciclo celular se modifica por la presencia de la sacarosa y la glucosa 120 mM. En el grupo control aumentan los núcleos en la fase S hasta el 15.43 %, sugiriendo que en esta zona atraviesan especialmente por esta fase, que correlaciona con lo reportado previamente en maíz, donde mencionan que el inicio de la replicación de ADN comienza entre las 12-15 horas (Baiza *et al*., 1989; Sánchez *et al*., 2005), lo que indicaría que el

grupo control se encuentra principalmente en la fase S; mientras que en el grupo con glucosa disminuyen en mayor medida los núcleos en la fase G_1, aumentando los núcleos en la fase G_2 hasta el 53.04 %, lo que podría sugerir que la glucosa está acelerando el ciclo celular comparado con el control, promoviendo la entrada de los núcleos a la siguiente fase G_2.

A las 28 horas la fase G_2 aumenta hasta el 30 % en los núcleos en el grupo control, sugiriendo que el ciclo celular progresa hacia las fases $G_2 \rightarrow$ M, lo que concuerda por lo reportado por Baiza *et al.,* 1989, quienes observaron las primeras figuras mitóticas en ejes embrionarios de maíz a las 24 horas. En presencia de glucosa disminuye la cantidad de núcleos que se encontraban en la fase G_2 a las 18 horas del 53.04 al 33.47 % a las 28 horas, aumentando de nuevo los núcleos en la fase G_1 al 58.48 %, lo que sugeriría que el ciclo celular continua progresando a la siguiente fase y no se mantienen estos núcleos detenidos entre G_2 y M; mientras que con sacarosa continúan aumentando los núcleos en la fase de síntesis.

Lo anterior sugiere que la glucosa afecta el avance del ciclo celular acelerándolo de manera evidente, mientras que la sacarosa de igual forma afecta la progresión de éste aunque en menor escala, comparándolos con el grupo control.

A las 60 horas, se continúa observando un patrón diferencial en el avance del ciclo celular con los diferentes tratamientos en la zona A, pero a este tiempo no se podría asegurar cuantos ciclos completos se han llevado a cabo desde las 28 horas; sin embargo se observa que aún mantienen un estadio diferente en el avance del ciclo celular entre los tres tratamientos, aumentando considerablemente los núcleos en la fase G_2 del grupo control, aumentando los núcleos en la fase G_1 en presencia de sacarosa, y con glucosa se visualiza un aumento en la fase de síntesis, comparando con el tiempo anterior, indicando de nuevo que estos azúcares están acelerando diferencialmente el ciclo celular a este tiempo de imbibición.

De igual forma a las 96 horas no se podría asegurar cuantos ciclos celulares se han completado, pero sí se podría decir que el ciclo celular continua progresando en la zona A, ya que de nuevo existe un cambio en los porcentajes de núcleos en cada fase en todos los tratamientos (Apéndice E), indicando que los carbohidratos no detienen el ciclo celular y que además continúan afectando de manera diferencial esta zona.

En cuanto a la zona B (Figura 11) a las 18 horas se puede observar una disminución de los núcleos en la fase G_1 en todos los tratamientos, indicando la activación del ciclo celular. Sin embargo, entre los tratamientos no existe un patrón diferencial evidente (Figura 26). Analizando los tiempos posteriores se observa un cambio en la cantidad de núcleos en cada fase, indicando que el ciclo celular progresa pero en ninguno de los tiempos analizados se observa una diferencia clara producida por los carbohidratos como sucede en la zona meristemática.

Este análisis podría sugerir que la presencia de la sacarosa o la glucosa afecta principalmente a la zona meristemática (zona A) del eje embrionario desde tiempos tempranos, hasta al menos 96 horas después en presencia de carbohidratos, modificando la tasa de proliferación celular, por lo tanto modificando la velocidad en la que se realizan los ciclos celulares y posiblemente

disminuyendo la duración de la fase G_1 como sucede en presencia de benziladenina, que regula de manera positiva el ciclo celular y la germinación, disminuyendo la fase G_1 en puntas de raíz de maíz (Sánchez *et al*., 2005).

Que exista una diferencia en el estadio de proliferación podría sugerir que estos azúcares afectan la regulación de diferentes proteínas que participan en el ciclo celular.

Observamos que la ZmCDKB1;1 en los tiempos tempranos (0-28 horas) solo muestra una disminución a las 18 horas con sacarosa 120 mM (Figura 12), mientras que en tiempos posteriores (60-96 horas) muestra un patrón diferencial entre zonas y además este se invierte por la presencia de sacarosa y glucosa aumentando la presencia de esta proteína en la Zona A (Figura 13), posiblemente indicando que estos carbohidratos promueven un cambio en el ciclo celular haciendo mayormente necesaria la presencia de esta proteína típica de las fases G_2-M en la zona A, zona que incluye la región meristemática, lo que podría sugerir que estos azúcares aumentan la proliferación celular en esta zona por lo que la células realizan más ciclos mitóticos por ello requiriendo una mayor presencia de esta proteína.

La abundancia de la ZmCDKA muestra un aumento a las 28 y 60 horas en ambas zonas en presencia de sacarosa 120 mM (Figuras 14 y 15A), la presencia de sacarosa no modifica los niveles proteicos de ZmCDKA en extractos de ejes embrionarios de maíz completos en las primeras 24 horas de germinación (Garza-Aguilar *et al*., 2017). Lo aquí reportado sugeriría que la presencia de sacarosa afecta al eje embrionario después de las 24 horas promoviendo un aumento en sus niveles proteicos, de manera similar a lo reportado por Planchais y colaboradores (2004) en células de Arabidopsis, sin embargo no muestra un patrón diferencial de acumulación entre zonas hasta las 28 horas sugiriendo que no tiene una regulación muy estricta entre estas, aunque también es necesario recordar que esta proteína a pesar de tener principalmente una función en las fases G_1 y S, también se encuentra presente en G_2 y M.

Mientras que a las 96 horas (Figura 15B) se observa un patrón de acumulación entre tratamientos en ambas zonas similar, con una disminución en la cantidad de proteína en presencia de carbohidratos 120 mM añadidos comparando con el grupo control, siendo menor la caída en la zona B que en la A. Lo que sugiere que, la regulación de esta proteína no se afecta diferencialmente por la presencia de azúcares a este tiempo comparando con el grupo control, sin embargo la sacarosa y la glucosa tienen un efecto diferencial sobre esta proteína en cada región de la radícula.

En cuanto a la ZmCycD3;1 los niveles proteicos no cambian de manera significativa en las zonas A y B en los tiempos tempranos (Figura 18) en los grupos con sacarosa (120 mM) y control (sacarosa 58 mM), esto concuerda con los resultados de Planchais (2004) que analizó los niveles proteicos de la CycD3;1 en Arabidopsis, en presencia de sacarosa 0.3, 3 % y en ausencia de ésta, y sus resultados mostraron que la presencia de sacarosa evita una rápida caída en la abundancia proteica de esta ciclina. Con glucosa disminuye la cantidad de esta proteína en ambas zonas comparando con la cantidad a las 18 horas del mismo tratamiento y respecto al grupo control, pero esto sucede a las 28 horas. Esta disminución a las 28 horas bajo ambos tratamientos coincide

con lo reportado por Garza-Aguilar y colaboradores (2017), donde observa una disminución en la abundancia de esta proteína hacia las 24 horas de imbibición; este es un patrón similar al mostrado por la mayoría de las otras ciclinas tipo D de maíz estudiadas durante el proceso de germinación (Lara-Núñez *et al*., 2008, Godínez-Palma *et al*., 2013). En cuanto a las 60 y 96 horas no se observa una diferencia evidente entre zonas o tratamientos, sugiriendo que los carbohidratos no afectan la regulación de esta proteína a lo largo de la radícula en estos tiempos.

La ZmCycB1;2 al igual que la ZmCycD3;1 muestra un cambio en su comportamiento en presencia de sacarosa y glucosa 120 mM. En presencia de glucosa aumenta la abundancia de esta proteína desde las 18 horas en la zona A y solo a las 28 horas en ambas zonas (Figura 20).Por otro lado, con sacarosa se observa una disminución a las 28 horas en ambas zonas; sugiriendo que estos carbohidratos tienen un efecto diferencial en la regulación de esta proteína en los tiempos estudiados, lo que podría correlacionar con el aumento en el porcentaje de núcleos en la fase G_2, en cada zona a las 18 y 28 horas cabe recordar que esta proteína es típica de las fases G_2-M, lo que podría sugerir que el aumento de esta proteína por la presencia de glucosa sugeriría que este carbohidrato está modificando el estado fisiológico del ciclo celular de la radícula comparado con el grupo control.

A las 60 horas después de imbibición la ZmCycB1;2 muestra un patrón diferente entre zonas (Figura 21A), y un cambio muy evidente de este patrón se observa en el grupo con glucosa en el que se invierte esta distribución comparado tanto con el control como con sacarosa. Con sacarosa se mantiene la distribución pero aumenta la cantidad de la proteína en ambas zonas, lo que sugiere que sacarosa y glucosa (120 mM) tienen efectos diferentes en la regulación de esta proteína, modificando su distribución a lo largo de la zona radicular (glucosa) así como su abundancia (sacarosa). Mientras que a las 96 horas (Figura 21B) cambia en presencia de glucosa comparado con el patrón que se observó a las 60 horas, lo que indica que la glucosa afecta de una manera diferente en este tiempo, modificando los procesos metabólicos llevados a cabo en las diferentes zonas, manteniendo la síntesis o disminuyendo su degradación para aumentar los niveles de esta proteína en ambas zonas.

ZmPCNA (Figuras 16 y 17) no muestra ningún cambio en su patrón de abundancia ni por zona ni por tratamientos a las 0, 18, 28 y 96 horas lo que podría indicar que su regulación no está mediada por carbohidratos o quizá su regulación es tan estricta que la presencia de éstos no la modifica a estos tiempos en los diferentes tejidos. En cuanto a las 60 horas se observa un aumento con sacarosa 120 mM, aunque este aumento también se observa con ZmCDKA y ZmCycB1;2 en ambas zonas, cada una de estas proteínas modificadas por la presencia de este carbohidrato a las 60 horas son típicas de diferentes fases del ciclo celular, PCNA de la fase S, CDKA de las fases G_1-S y CycB1;2 de G_2-M, lo que indicaría que a este tiempo la sacarosa produce un gran cambio en la regulación del ciclo celular, no solo favoreciendo la acumulación de proteínas de una sola fase.

En cuanto a la interacción de la ZmCycD3;1 con ZmCDKA (Figura 22), se observa una interacción diferencial a las 28 horas en presencia de los carbohidratos. Mientras que con sacarosa no se observa interacción, con glucosa se observa interacción de igual forma que en el control,

sugiriendo que estos carbohidratos regulan de manera diferencial la formación de complejos a este tiempo. A las 60 y 96 horas se observa interacción en todos los tratamientos en ambas zonas, sugiriendo que el efecto que pudieran tener la sacarosa y la glucosa en la formación de este complejo es diferencial sólo a tiempos más tempranos.

La interacción de la ZmCycD3;1 con ZmCDKB1;1 (Figura 23), al igual que con ZmCDKA, es diferencial en presencia de sacarosa y glucosa a las 28 horas. Mientras que con el primer carbohidrato no se observa interacción, con el segundo está presente la interacción en ambas zonas del eje embrionario, comparando con el control que sólo muestra interacción en la zona A; lo anterior sugeriría que la formación de complejos es afectada por la presencia de la glucosa, y que además ésta estimula especialmente a la zona B favoreciendo la formación de este complejo, lo que podría sugerir que estos carbohidratos modifican el estado de proliferación celular en cada región del eje embrionario modificando la formación de complejos ciclinas-CDK que impulsan transiciones cruciales del ciclo celular.

A las 96 horas al contrario de las 28, se observa en el grupo control interacción de estas proteínas en ambas zonas y sólo en la zona A del grupo con glucosa, lo que sugiere que este complejo tipico de las fases G_1 y S se requiere en diferentes regiones dependiendo del tiempo de imbibición y del estadio celular en el que se encuentre el eje embrionario; mientras que en tiempos tempranos en el grupo control sólo es necesario en la zona meristemática, a las 96 horas tambien es requerido en la zona de crecimiento, indicando que la formación y posiblemente el uso de este complejo varia con el tiempo y del estado fisiologico de cada tejido. Con glucosa a las 96 horas, sólo se observa interacción en la zona A, sugiriendo que la glucosa afecta principalmente la dinámica de estas proteinas en la zona de crecimiento en tiempos prolongados.

Se ha reportado que el gen de la CycD3;1 en Arabidopsis se expresa sólo en el estado post-germinativo y no parece promover la activación del meristemo de la raíz (Masubelele *et al*., 2005); en nuestros experimentos se observa que la presencia de glucosa afecta a la formación de complejos con esta ciclina en la zona meristemática de maíz.

Además, cabe mencionar que la expresión de algunas ciclinas (incluida la ciclina D3;1) es modulada por citocininas, auxinas, y ABA (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos 2006). Mientras que la adición de ácido indolacético (IAA) estimula la síntesis de ADN e induce la expresión de varios genes de ciclinas D, entre los que se encuentran el de la ZmCycD3;1, éstos no se ven afectados por la presencia de sacarosa o glucosa. Como se mencionó anteriormente, la sacarosa y la glucosa también estimulan la síntesis de ADN, sin embargo no afectan la expresión génica de la ZmCycD3;1 como lo hace el IAA, pero estos azúcares inducen de manera importante la expresión de ZmCDKA1;1 a las 24 horas (Lara-Núñez *et al*., 2017). Aunque no existan reportes de que la presencia de sacarosa o glucosa afecten la expresión génica de esta ciclina, podemos observar que afecta la formación de complejos en dos zonas del eje embrionario de maíz.

La interacción de la ZmCycB1;2 con ZmCDKA (Figura 24) es similar a lo largo de los tiempos analizados en todos los tratamientos y en ambas zonas, con excepción de glucosa a las 96 horas en la zona B, donde la interacción no se observa, indicando que este carbohidrato está afectando de

manera diferencial entre regiones de la zona radicular. El inmunocomplejo con la ZmCDKB1;1 muestra diferencias a las 96 horas (Figura 25); en el grupo control se encuentra presente en ambas zonas, de igual forma que con glucosa, lo que sugiere que la sacarosa es el carbohidrato que más afecta la dinámica de estas proteínas en ambas zonas, haciendo innecesaria la presencia de este complejo, debido posiblemente a un cambio en la regulación de este complejo típico de las fases $G_2 \rightarrow M$.

Se podría decir que la presencia de sacarosa y glucosa 120 mM modifica la formación de complejos con ciclina D, principalmente a las 28 horas con ambas CDKs, mientras que con la ciclina B lo hace a las 96 horas. Se ha reportado que ambas ciclinas forman complejos con ambas CDKs a lo largo de la germinación (Ayub-Miranda 2015; Garza-Aguilar *et al.,* 2017) en condiciones control.

La diferencia en la formación de complejos podría sugerir que los carbohidratos promueven un uso diferencial de ciclinas entre zonas, dependiendo del tiempo analizado y del carbohidrato en el que se embeban los ejes embrionarios de maíz. Otras posibles hipótesis sobre la formación diferencial de complejos que se observa en presencia de carbohidratos son: i) los carbohidratos promueven una asociación rápida entre las Cyc-CDK y por ello no se observa la presencia del inmunocomplejo en determinados tiempos; ii) la interacción Cyc-CDK podría estar restringida por una diferencia en los compartimientos (núcleo o citoplasma) en el que se encuentre cada una de las proteínas, lo que podría evitar la presencia del complejo en los extractos nucleares, como podría suceder con la ZmCycB1;2 que se ha reportado que la presencia de sacarosa y glucosa 120 mM promueven un cambio de localización de esta proteína en ejes embrionarios de maíz (García-Ayala, 2015) o iii) los carbohidratos afectan la regulación de estas proteínas promoviendo una rápida degradación de las ciclinas.

La ausencia de complejos en el grupo con sacarosa 120 mM (CycD3;1-CDKA a las 28 horas , CycD3;1-CDKB a las 28 y 96 horas; CycB1;2-CDKB a las 96 horas) sugeriría que el efecto que tiene este azúcar cambia a una concentración de 60 y 120 mM , esto fenómeno podría ser un efecto dependiente de la concentración, ya que si se observa la formación de complejos en el grupo control (sacarosa 58 mM); otra posible explicación a la ausencia de estos complejos es que la presencia de estas proteínas en extractos nucleares es mínima y por ello no se logra observar en la inmunodetección. El efecto dosis-dependiente de la sacarosa se ha reportado en diferentes sistemas, por ejemplo Feng Xu y colaboradores (2010) determinaron que el efecto en semillas de *Brassica napus* embebidas en medio suplementado con sacarosa es dependiente de la concentración, ya que una concentración de 167 mM retrasa la germinación de las semillas, además de inhibir el desarrollo del hipocótilo; a una concentración de 333 mM de sacarosa no modificó la tasa de germinación ni el desarrollo de las plántulas, lo que indica que con sacarosa es necesario superar un determinado umbral de concentración dependiendo el modelo de investigación para las respuestas producidas (Tognetti *et al.*, 2013).

El efecto que tiene la glucosa tanto en los niveles proteicos como en la formación de complejos Cyc-CDK en las diferentes regiones de la radícula puede deberse a la señalización que desencadena esta molécula. Algunas de las vías por las que se medían las respuestas de azúcares que se han

identificado en plantas: son la vía de la hexocinasa (HXC), la vía de la trehalosa 6 fosfato (T6P), y la vía de TOR (target of rapamycin) (Smeekens *et al.,* 2010).

Se sabe que la cinasa TOR se activa por señalización de glucosa y puede promover la salida de quiescencia de los meristemos de raíz, además de activar muchos genes típicos de la transición G_1-S como lo son los blancos putativos del factor transcripcional E2F1 en Arabidopsis (Vandepoele *et al*., 2005; de Jager *et al.*, 2009; Naouar *et al*., 2009; Xiong *et al*., 2013).
La fosforilación directa de E2Fa por la cinasa TOR es esencial para la activación de los genes de la fase S. Este descubrimiento sugiere una función de TOR en la regulación transcripcional del ciclo celular y proporciona un nuevo mecanismo convincente de como la señalización inducida por glucosa de la vía mediada por TOR controla la transcripción de los genes en la fase S y el ciclo celular para promover la activación y crecimiento de los meristemos radiculares. Este mecanismo molecular de la señalización TOR-E2Fa es distinto de las funciones convencionales de TOR en estimular la traducción de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular a través de S6k1 y 4E-BP en mamíferos (Dowling *et al.,* 2010; Xiong *et al.* 2013; Xiong y Sheen 2013; Yuan *et al*. 2013; Xiong y Sheen 2014).

Los estudios realizados en Arabidopsis sobre la señalización de TOR por glucosa ilustran cómo la proliferación es activada a través de la coordinación de nutrientes entre los tejidos para controlar la transición del desarrollo y crecimiento (Xiong *et al*., 2013, Xiong y Sheen 2013, Xiong y Sheen 2014).

Conociendo los procesos metabólicos que induce la señalización por glucosa en plantas no resulta extraña la evidente modificación que sufre la radícula del eje embrionario de maíz afectando principalmente la formación de complejos en la zona de crecimiento (Zona B), así como los diferentes niveles de las proteínas estudiadas.

La función de la sacarosa como molécula de señalización en plantas fue descrita hace varias décadas por Potis en 1978 y más recientemente por Koch y Wind (Koch 2004, Wind 2010). Sin embargo, ha habido un largo debate sobre si la sacarosa realmente merece tal estatus, a diferencia de la glucosa que se ha reconocido como molécula de señalización en plantas durante mucho tiempo, especialmente en relación con las vías anteriormente mencionadas.

El papel de la sacarosa como tal ha sido poco estudiado, se ha argumentado que la razón para no dar a la sacarosa un papel como molécula señalizadora es porque se metaboliza rápidamente, y por lo tanto es incierto si las repuestas de las plantas son atribuibles a la molécula por sí misma o al producto de su degradación, es decir la glucosa (Hummel *et al.,* 2009).

Sin embargo, la situación ha cambiado últimamente ya que la evidencia acumulada indica que muchos ARNm y enzimas se sintetizan *de novo* cuando el nivel de este disacárido excede cierto umbral (Pollock *et al*., 2003). El papel dual de la sacarosa se ha evidenciado más claramente en experimentos con la adición directa de sacarosa a plantas en las que las respuestas no pueden ser imitadas por la adición de hexosas (Tognetti *et al.,* 2013), fenómeno que también se observa con el cambio en la morfología, así como en la modificación en síntesis *de novo* de ADN en la radícula

de ejes embrionarios de maíz extraídos de semilla madura embebidos en un medio enriquecido con sacarosa 120 mM (Lara-Núñez *et al.*, 2017; García-Ayala, 2015).

Al analizar la actividad de cinasa asociada a los inmunocomplejos de la ZmCycD3;1 y ZmCycB1;2 con las CDKs a las 96 horas (Figura 26) se observa que en ambas zonas en todos los tratamientoss son activos, aunque anteriormente se mostró que a este tiempo no se observa interaccion Cyc-CDK en algunos tratamientos, dado que al inmunoprecipitar a las ciclinas cualquiera de las cinasas puede estar presente, no se puede determinar a cuál de ellas corresponde la actividad, por lo que este experimento no nos brinda información para conocer si los carbohidratos además de modificar la formación de complejos modifica la actividad de estos. Por esta razón resultaría muy conveniente realizar inmunoprecipitados secuenciales en el cual inicialmente se realizaría un inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-ZmCycD3;1 o anti-ZmCycB1;2, seguido de una segunda inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-ZmCDKB1;1. Luego el sobrenadante seria inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-ZmCDKA y de esta forma al realizar los experimentos de actividad de cinasa, se podría saber con certeza que complejos se encuentran presentes así como su actividad.

Este cambio en la dinámica del ciclo celular sugiere que los carbohidratos modifican una gran variedad de procesos realizados en el eje embrionario de maíz durante la germinación y en etapas posteriores a ésta, modificando no solo la distribución y abundancia de diferentes proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, sino también en la posible formación de complejos entre éstas. Estos fenómenos se pueden relacionar con el cambio producido por los azúcares en la proliferación celular (contenido de ADN) en cada región en los diferentes tiempos de imbibición analizados, sugiriendo que estos modifican la velocidad en la que se llevan a cabo las diferentes fases del ciclo celular.

9. Conclusión

- ✓ Dos zonas de la radícula del eje embrionario de maíz mostraron diferencias en su capacidad proliferativa (contenido de ADN) y en los niveles proteicos de la ZmCycB1;2, ZmCDKB1;1 y ZmCDKA, sugiriendo que a lo largo de la radícula la regulación del ciclo celular es diferencial.

- ✓ La presencia de sacarosa y glucosa (120 mM) modifican la proliferación celular especialmente en la zona que incluye a la región meristemática. Asimismo modifican la abundancia de la ZmCycB1;2 y la ZmCDKB1;1, y la formación de complejos entre las ZmCycD3;1 y ZmCycB1;2 con las CDKs en ambas zonas, sugiriendo que estos azúcares afectan principalmente la regulación de las proteínas típicas de las fases G2 y M.

10. Perspectivas

- Realizar ensayos de actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados secuenciales, para determinar si la actividad de los complejos es diferencial, dependiendo de la CDK a la que se encuentre asociada la ciclina, en ambas regiones del eje embrionario.
- Verificar la localización de los complejos proteicos en núcleos, por citometría de flujo utilizando anticuerpos acoplados a un flouróforo.
- Realizar citometría de flujo para determinar el contenido de ADN en intervalos de tiempos menores, para determinar con precisión como se modifica el ciclo celular.
- Utilizando el citómetro de flujo verificar la síntesis *de novo* de ADN en núcleos aislados utilizando 5-etinil-2'-desoxiuridina (EDU), un análogo de la timidina, para determinar en qué medida los carbohidratos afectan la síntesis y si lo hacen de igual manera en ambas zonas.
- Utilizar otros marcadores típicos de ciclo celular (Otras CycD, KRPs, E2F, entre otros) para determinar si se modifican por los carbohidratos y si estos tienen una presencia preferencial en alguna zona del eje embrionario.

11. Referencias

Arellano Y.; García E.; Vázquez-Ramos JM. Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia*. **2008,** 42, 637-644.

Ayub-Miranda MF. Caracterización de Ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 en ejes embrionarios durante la germinación de maíz. *Tesis de licenciatura*. **2015**, Facultad de Química. UNAM. México.

Baiza MA.; Vázquez-Ramos JM.; Sánchez de Jiménez E. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Plant Physiol.* **1989**, 135, 416-421.

Beeckman T.; Burssens S.; Inzé D. The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *J Exp Bot*. **2001**, 52, 403-411.

Bewley JD. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*. **1997,** 9, 1055-1066.

Bewley JD.; Black M. Seeds: Physiology of development and germination. New York: Plenum Press. **1994,** 221-230.

Boniotti MB.; Gutierrez C. A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*. **2001**, 28 (3), 341-350.

Borisjuk L.; Rolletschek H.; Wobus U.; Weber H. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J Exp Bot.* **2003**, 54, 503-512.

Ching TM. Metabolism of germination in seeds, In T. T. Kozlowski, Seed Biolgy. **1972**. Vol. 3, Academic Press. 115-117.

Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. **2004**. 18; 24 (17): 2796-809.

Cruz-García F.; Zúñiga-Aguilar JJ.; Vázquez-Ramos JM. Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiologia Pantarum*. **1998**, 102: 573-581.

De Jager SM.; Scofield S.; Huntley RP. Robinson AS.; den Boer BG.; Murray JA. Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD#;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol Biol*. **2009**. 71:345-365.

De Veylder L.; Joubès J.; Inzé D. Plant cell cycle transitions. *Curr Opin Plant Biol.* **2003**, 6, 536–543.

Dimova DK.; Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances whit new faces. *Oncogene*. **2005**. 18; 24(17): 2810-26

Doria J. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*. **2010**, 31 (1) 74-85.

Dudits D.; Cserháti M.; Miskolczi P.; Horváth VG. The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation. In Inzé D, editor. *Cell Cycle control and plant development*. Oxford: Blackwell Publishing; **2007**. Pp. 1-30.

Dowling RJ.; Topisirovic I.; Alain T.; Bidinosti M.; Fonseca BD.; Petroulakis E.; Wang X.; Larsson O.; Selvaraj A.; Liu Y.; Kozma SC.; Thomas G.; Sonenberg N. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. **2010.** 328:1172-1176.

Eveland AL.; Jackson DP. Sugars, signaling, and development. *J Exp Bot*. **2012**, 63, 3367-77.

Ferreria PC.; Hemerly AS.; Villarroel R.; Van Montagu M.; Inzé D. The Arabidopsis functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell*. **1991**, 3(5), 531-40.

Frolov MV.; Dyson NJ. Molecular mechanisms of E2F-dependet activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*. **2004.** 1; 117(Pt11): 2173-81-

García-Ayala BB. Influencia de los carbohidratos en el ciclo celular durante la germinación de maíz. *Tesis de Licenciatura*; **2015**. Facultad de Química. UNAM. México.

Garza AS.; Sánchez CV.; Godínez PS.; Lara-Núñez A**.** Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas. *Revista de Educación Bioquímica.* **2014**, 32, 39-47.

Garza AS.; Lara-Núñez A.; García-Ramirez E.; Vazquéz-Ramos JM. Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physioll. Plantaru.*. **2017,** 160: 84–97.

Gibson SI. Plant Sugar-Response Pathways. Part of a Complex Regulatory Web. *Plant Physiol.* **2000,** 124,1532-1539.

Gibson SI. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot.* **2004,** 55, 253-264.

Gibson SI. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant* Biol. **2005**. 8, 93-102.

Godínez-Palma SK.; García E.; Sánchez MP.; Rosas F.; Vázquez-Ramos JM. Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J Exp Bot*. **2013**. 64:5661–5671.

Grafi G y Avivi Y. Stem cells: a lesson from dedifferentiation. *Trends Biotechnol*. **2004.** 22: 388-389.

Gutierrez C. Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat Cell Biol*. **2005.** 7: 535-541-

Gutierez C. The Arabidopsis Cell Division Cycle. *Arabidopsis Book*. **2009**. 7:e0120.

Gutierrez C.; Ramirez-Parra E.; Castellano MM.; del Pozo JC. G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin Plant Biol*. **2002,** 5, 480-6.

Hartig K. Zellteilungsregulation meristematischer Wurzel-zellen (Tabak BY-2) durch Phytohormone und Zucker. *DPhil Thesis*. **2005.** University of Bayreuth.

Hartig, K., Beck, E. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol*. **2006** 8, 389e396.

Hochholdinger F.; Woll K.; Sauer M.; Dembinsky D. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific development programmes. *Ann Bot*. **2004b**, 93, 359-368.

Hummel M.; Rahmani F.; Smeekens S.; Hanson J. Sucrose-mediated translational control. *Ann Bot* **2009**. 104:1-7.

Inzé D y De Veylder L. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu Rev Genet*. **2006**. 40: 77-105.

Ishikawa H.; Evans ML. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* **1995,** 109, 725-727.

Jiang K.; Meng YL.; Feldman LJ**.** Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development.* **2003,** 130, 1429-1438.

John PC.; Mews M.; Moore R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma*. **2001,** 216,119-42.

Jürgens G. Cytokinesis in higher plants. *Rev Plant Biol.* **2005**. 56: 281-299.

Kim JL.; Oh SA.; Brownfield L.; Hong SH.; Ryu H.; Hwang I.; Twell D.; Nam HG. Control of plant fermline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature*. **2008.** 455:1134-1137.

Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol*. **2004**. 7: 235-46.

Komaki S., Sugimoto K. Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol*. **2012**. 533 (6). 953-964.

Lara-Núñez A.; De Jesús N.; Vázquez-Ramos JM. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant*. **2008.** 132: 79–88.

Lara-Núñez A.; García-Ayala BB.; Garza-Aguilar SM.;Flores-Sánchez J.; Bravo CE.; Sánchez-Camargo V.; Vázquez-Santana S.; Vázquez-Ramos JM. Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiol Biochem* **2017**. 113, 20-31.

López I.; Khan S.; Vázquez J.; Hussey PJ. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family Zea mays is composed of two members that have similar expression programmes. *Biochim Biophys Acta*. **1997**, 1353(1), 1-6.

MASISH: Maize Seeds In Situ Hybridization Database (http://masish.uab.cat/masish/) Consultado: Septiembre, 2017.

Mayer KF.; Schoof H.; Haecker A.; Lenhard M.; Jürgens G.; Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*. **1998**. 95, 805-15.

Menges M.; de Jager SM.; Gruissem W.; Murray JA. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **2005**, 41,546–566.

Mironov V V.; De Veylder L.; Van Montagu M.; Inzé D. Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants— The Nexus . *Plant Cell*, **1999**, 11, 509–522.

Nannas NJ.; Dawe RK. Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. *Genetics*. **2015**, 199, 655-669.

Naouar N.; Vandepoele K.; Lammens T.; Casneuf T.; Zeller G.; van Hummelen P.; Weigel D.; Ratsch G.; Inze D.; Kuiper M.; De Veylder L.; Vuylsteke M. Quantitative RNA expression new E2F target genes. *Plant J.* **2009**. 57:184-194.

Nieuwland J.; Menges M.; Murray J.A. 2 The plant cyclins. In *Cell Cycle Control and Plant Development* . Edited by Dirk Inzé. B*lackwell* Publishing Ltd. **2007.**

Oakenfull EA.; Riou-Khanmlichi C.; Murray JAH. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **2002**, 357(1422), 749-760.

Orsbone DJ. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can J Botanic*. **1983**. 61: 3568.

Paliwal RL. Introducción al maíz y su importancia. Depósito de documentos de la FAO. Departamento de Agricultura, **2001.**

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. **1989,** 246, 603-608.

Planchais S.; Glab N.; Tréhin C.; Perennes C.; Bureau JM.; Meijer L.; Bergounioux C. Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *Plant J*. **1997**. 12, 191-202.

Planchais S.; Samland AK.; Murray JAH. Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J*. **2004**, 38 (4) 616-25.

Pollock C.; Farrar J.; Tomos D.; Gallagher J.; Lu C.; Koroleva O. Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *J Exp Bot*. **2003**. 54:489-94.

Polyn S.; Willems A:; De Veylder L. Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr Opin Plant Biol*. **2015**. 23, 1-7.

Ramírez-Parra E.; Corinne Frunt y Gutierrez C. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J*. **2003**. 33, 801-811.

Riou-Khamlichi C.; Menges M.; Healy JM.; Murray JA. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol*. **2000**. 20, 4513-4521.

Pontis HG. On the scent of the riddle of sucrose. *Trends Biochem Sci*. **1978**. 3:137-9.

Sabelli PA.; Dante RA.; Leiva-Nieto JT.; Jung R.; Gordon-Kamm WJ.; Larkins BA. RBR#, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**. 102(37): 13005-13012.

Sabelli PA.; Dante RA.; Nguyen HN.; Gordon-Kamm WJ.; Larkins BA. Expression, regulation and activity of a B2-type cyclin in mitotic and endoreduplicating maize endosperm. *Front Plant Sci.* **2014**, 5, 561.

Sánchez MP.; Torres A.; Boniotti MB.; Gutierrez C.; Vázquez-Ramos JM. PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol Biol*. **2002**, 50(2), 167-175.

Sánchez MP.; Gurusinghe SH.; Badford KJ.; Vázquez-Ramos JM. Differential response of PCNA and CdK-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J Exp Bot*. **2005**- 56(412): 515-23.

Scanlon MJ.; Takacs EM. Kernel biology. In Bennetzen J, Hake S, editors. , eds, Handbook of Maize: Its Biology. Springer, New York, **2009,** 121–14.

Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol***.** **2007**. 9 345-354

Shen WH. The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci*. **2002**. 7, 505-11.

Smeekens S.; Ma J.; Hanson J.; Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol*. **2010**. 13(3): 274-9.

Stevens C.; La Thangue NB. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys*. **2003**. 15; 412 (2): 157-69.

Tognetti JA.; Pontis HG.; Martínez-Nöel GMA. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant Signal Behav*. **2013**. 8(3): e23316. doi:10.4161/psb.23316.

Vanndepoele K.; Raes J.; De Veylder L.; Rouze P.; Rombauts S.; Inzé D. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell*. **2002.** 14: 903-916.

Vandepoele K.; Vlieghe K.; Florquin K.; Henning L.; Beemster GT.; Gruissem W.; Van de Peer Y.; Inze D.; De Veylder L. Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Phy*. **2005**. 139: 316-328.

Vazquez-Ramos JM. El ciclo celular. En: Jimenez Garcia LF y Merchant Larios H, coords. Biologia celular y Molecular. 1era ed. Mexico: Pearson educacion, **2003.** P. 595-616.

Vázquez-Ramos JM.; Sánchez MP. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* **2003,** 02, 113–130.

Vela E. El maíz. *Arqueología Mexicana*. **2011,** 38: 10-15.

Wang G.; Kong H.; Sun Y.; Zhang X.; Zhang W.; Altman A.; DePamphilis CW. Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* **2004a ,** 135, 1084–1099.

Wang L.; Ruan YL. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signalin. *Front Plant Sci*. **2013.** 4, 163.

Wind J.; Smeekens S.; Hanson J. Sucrose: metabolite and singnaling molecule. *Phytochemistry.* **2010**. 71: 1610-4.

Xiong Y. McCormack M. Li L.; Hall Q.; Xiang C.; Sheen J. Glucose-TOR signaling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*. **2013**. 496:181-186

Xiong Y.; Sheen J. Moving beyond translation: glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. *Cell Cycle*. **2013**. 12: 1989-1990.

Xiong Y.; SheenJ. The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol*. **2014**. 164: 499-512.

Xu F.; Tan X.; Wang Z. Effects of sucrose on germination and seedling development of Brassica Napus. *Int J Biol Sci.* **2010**. 2(1).

Yuan HX.; Xiong Y.; Guan KL. Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Mol Cell*. **2013.** 49: 379-387.

Apéndice A

Se comprobó la linealidad del citómetro; para ello se hicieron pasar eritrocitos de pollo, ya que es una muestra con un contenido de ADN conocido (Figura 33), en el cual la presencia de un pico agudo corrobora la linealidad del equipo.

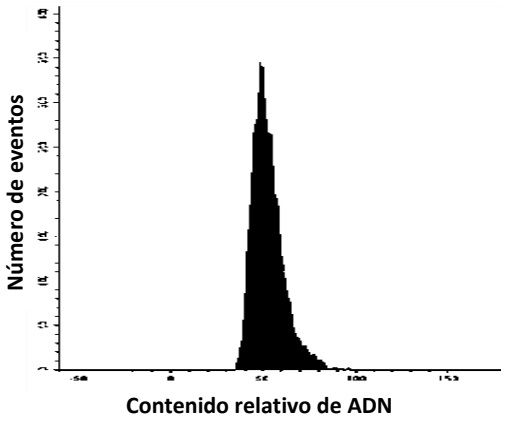

Figura 28. Histograma del contenido de ADN de eritrocitos de pollo. El histograma muestra en el eje de las abscisas la fluorescencia relativa del yoduro de propidio (IP) unido al ADN, y en eje de las ordenadas el número de eventos cuantificados.

Asimismo se analizaron células L929 (tejido conectivo de ratón) con contenido de ADN diploide (Figura 34A). En este caso la presencia de dos picos agudos, el segundo al doble del primero indican la fase G_1 del ciclo celular (2C) y la fase G_2 (4C) respectivamente; al agregar nocodazol que impide la polimerización de los microtúbulos, se observa (Figura 34B) el arresto producido en la fase G_2/M, aumentando el segundo pico en el histograma. Esto indica que con el equipo podemos observar el comportamiento del ciclo celular.

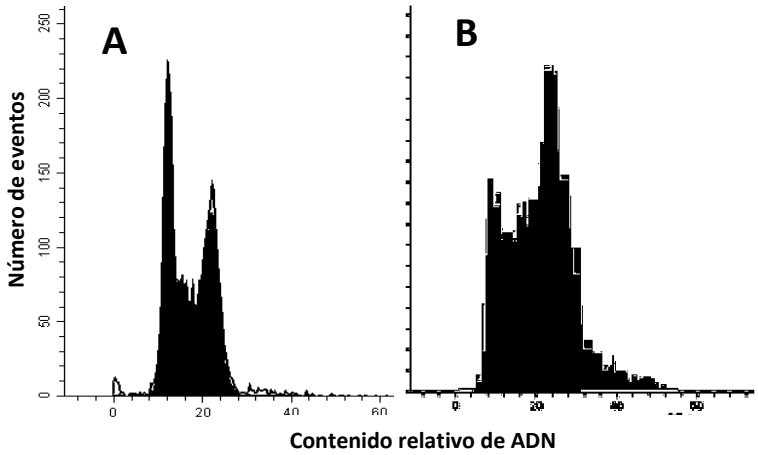

Figura 29. Histogramas de citometría de flujo de células L929 con diferente contenido relativo de ADN. A. Ciclo celular normal de células L929 teñidas con yoduro de propidio; **B.** Arresto de las células L929 en la fase G_2, al adicionar nocodazol. El histograma muestra en el eje de las abscisas la fluorescencia relativa del yoduro de propidio (IP) unido al ADN, y en eje de las ordenadas el número de eventos cuantificados.

Apéndice B

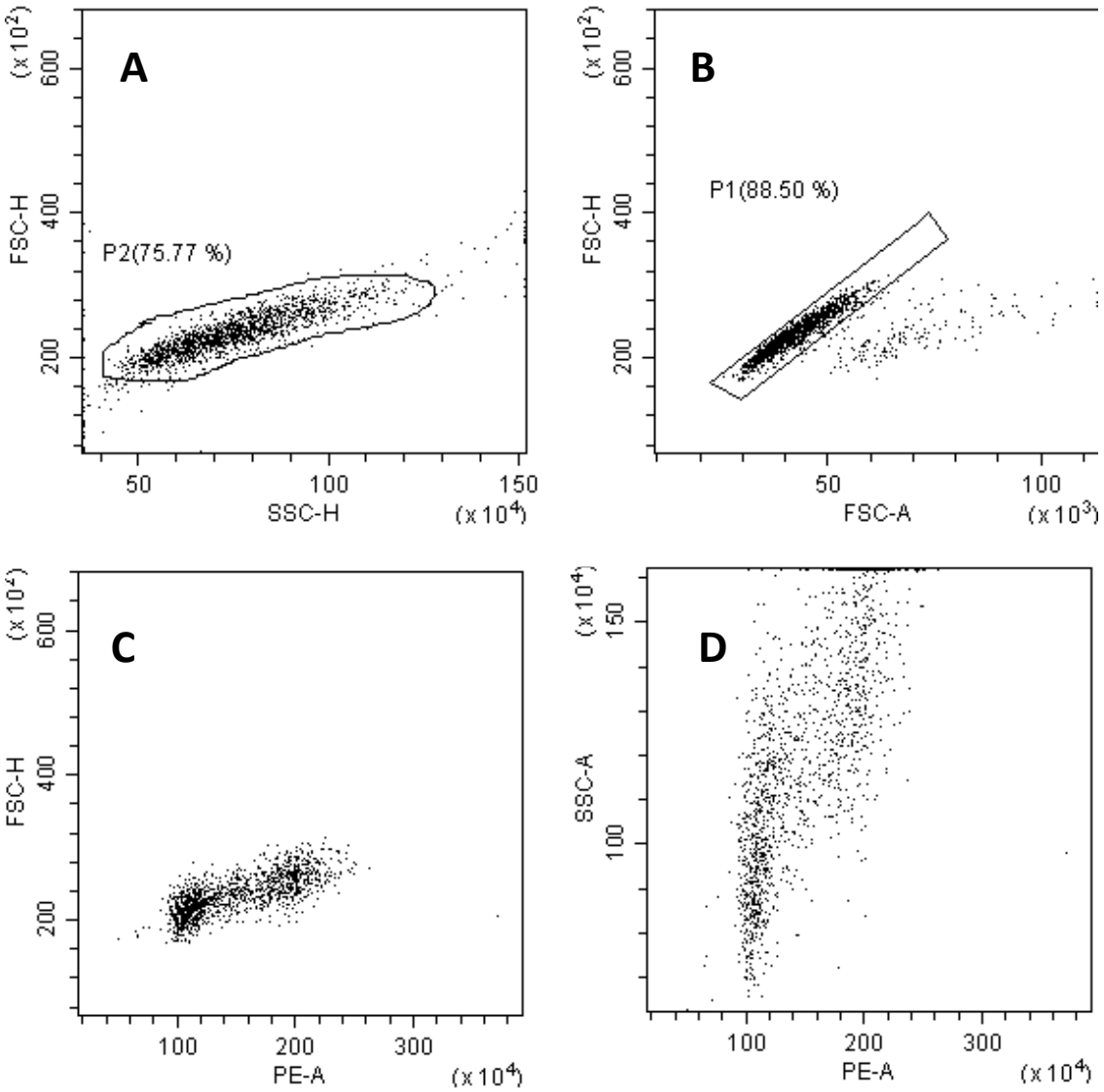

Figura 30. Discriminación de núcleos para análisis de contenido de ADN. A. Histograma de tamaño (Forward) contra granularidad (Side) para seleccionar una población de núcleos; **B.** Discriminación de dobletes; **C.** Histograma de tamaño contra fluorescencia relativa del yoduro de propidio (IP) unido al ADN; **D.** Histograma de granularidad contra fluorescencia relativa del yoduro de propidio (IP) unido al ADN.

Apéndice C

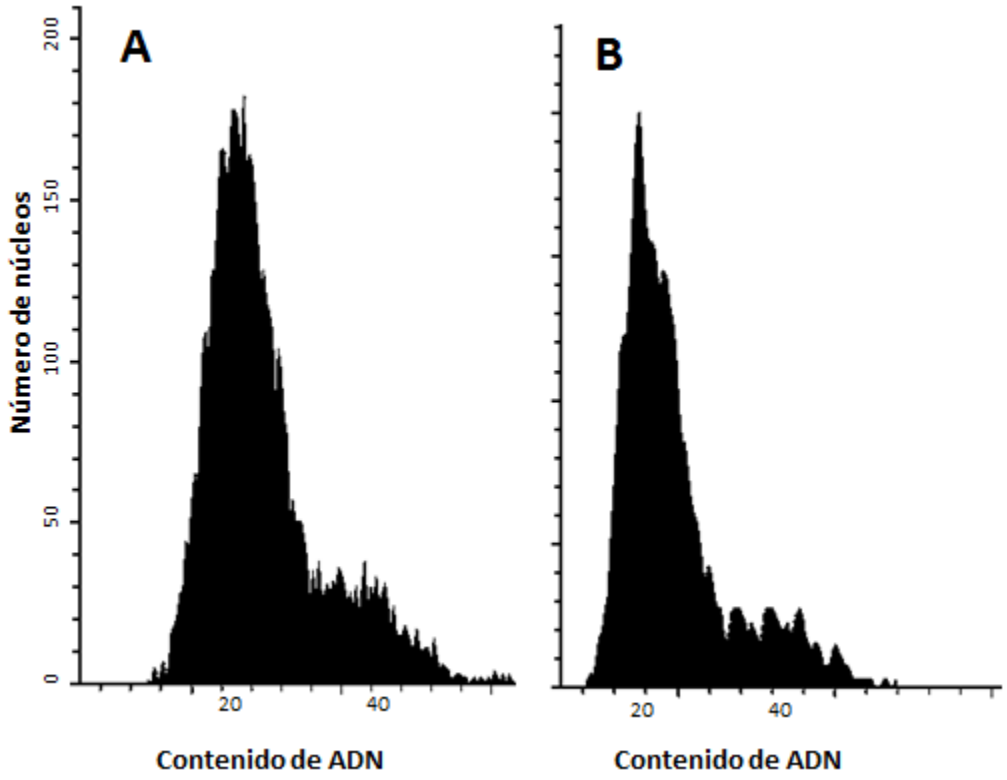

Figura 31. Histogramas de citometría de flujo de número de núcleos con diferente contenido relativo de ADN de eje embrionario de maíz seco. A. zona meristemática; **B**. zona de cecimiento. El primer pico en cada histograma representa núcleos 2C (Fase G_1), mientras que el segundo aumento representa núcleos 4C (G_2).

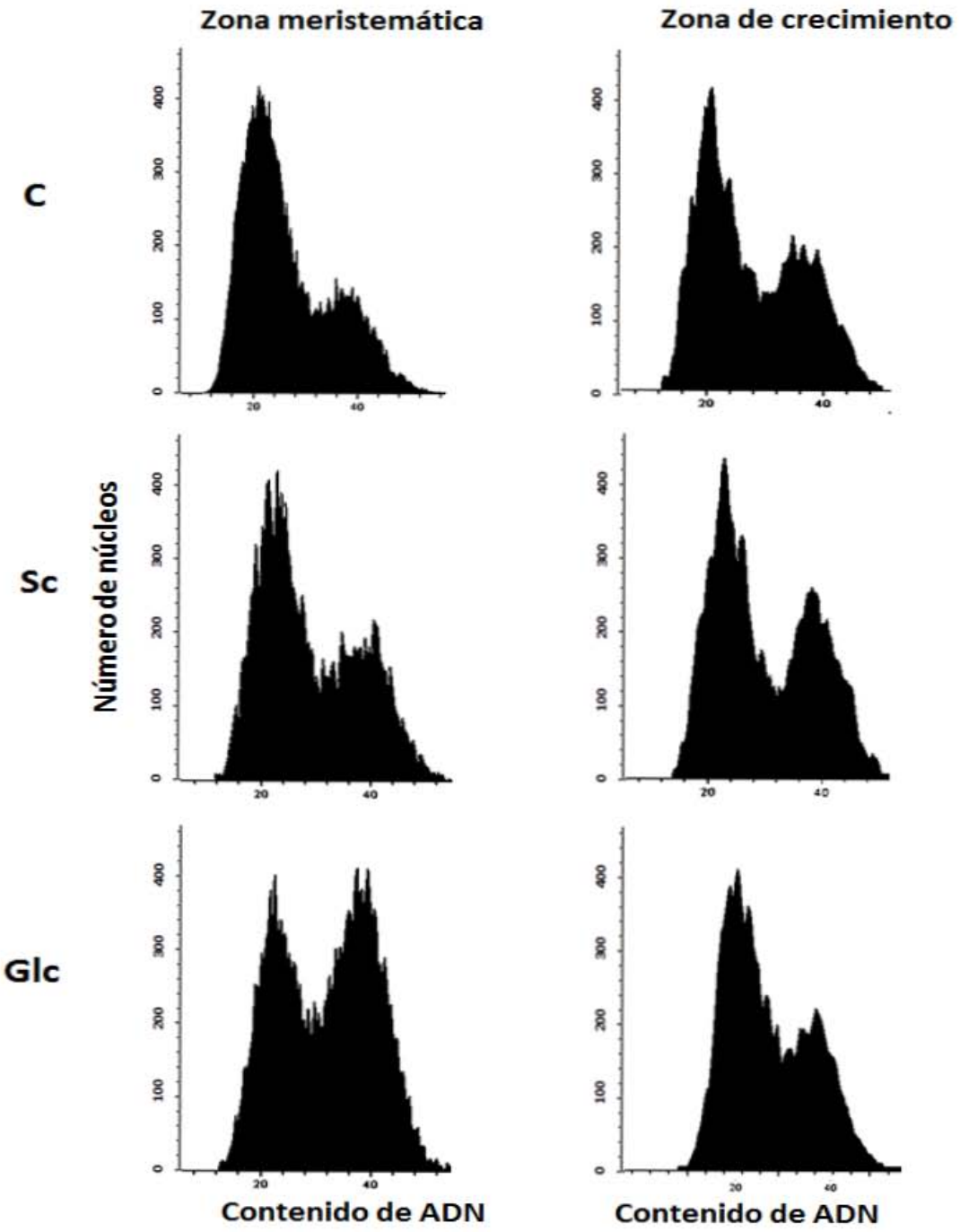

Figura 32. Histogramas de citometría de flujo de número de núcleos de ejes embrionarios de maíz con diferente contenido relativo de ADN a las 18 horas de imbibición. Derecha. Zona meristemática **Izquierda.** Zona crecimiento, en cada tratamiento C (control),Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM).El primer pico en cada histograma representa núcleos 2C (Fase G_1), mientras que el Segundo pico representa núcleos 4C (G_2).

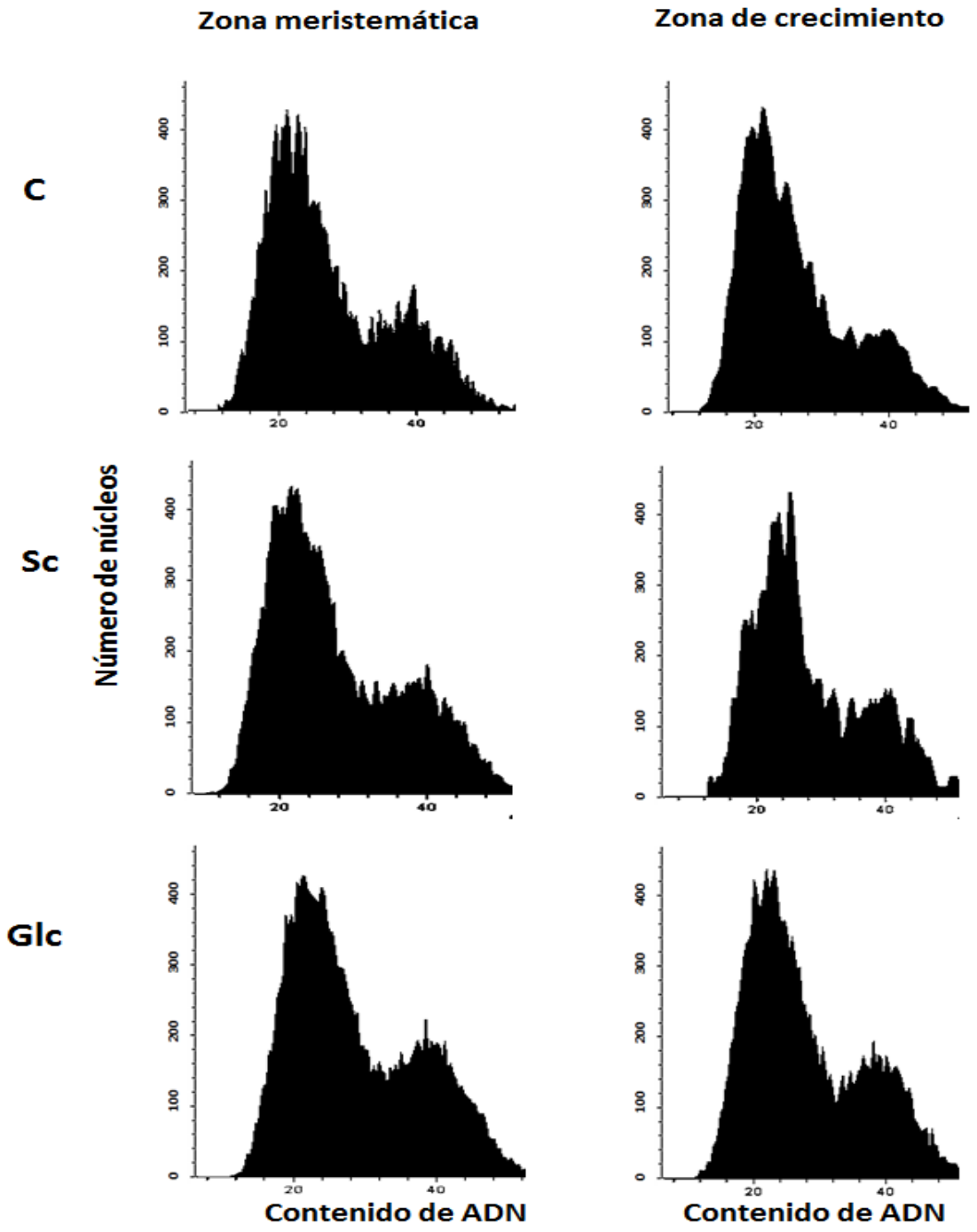

Figura 33. Histogramas de citometría de flujo de número de núcleos de ejes embrionarios de maíz con diferente contenido relativo de ADN a las 28 horas de imbibición. A. zona meristemática; **B**. zona de elongación/diferenciación, en cada tratamiento C(control),Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM).El primer pico en cada histograma representa núcleos 2C (Fase G_1), mientras que el Segundo pico representa núcleos 4C (G_2).

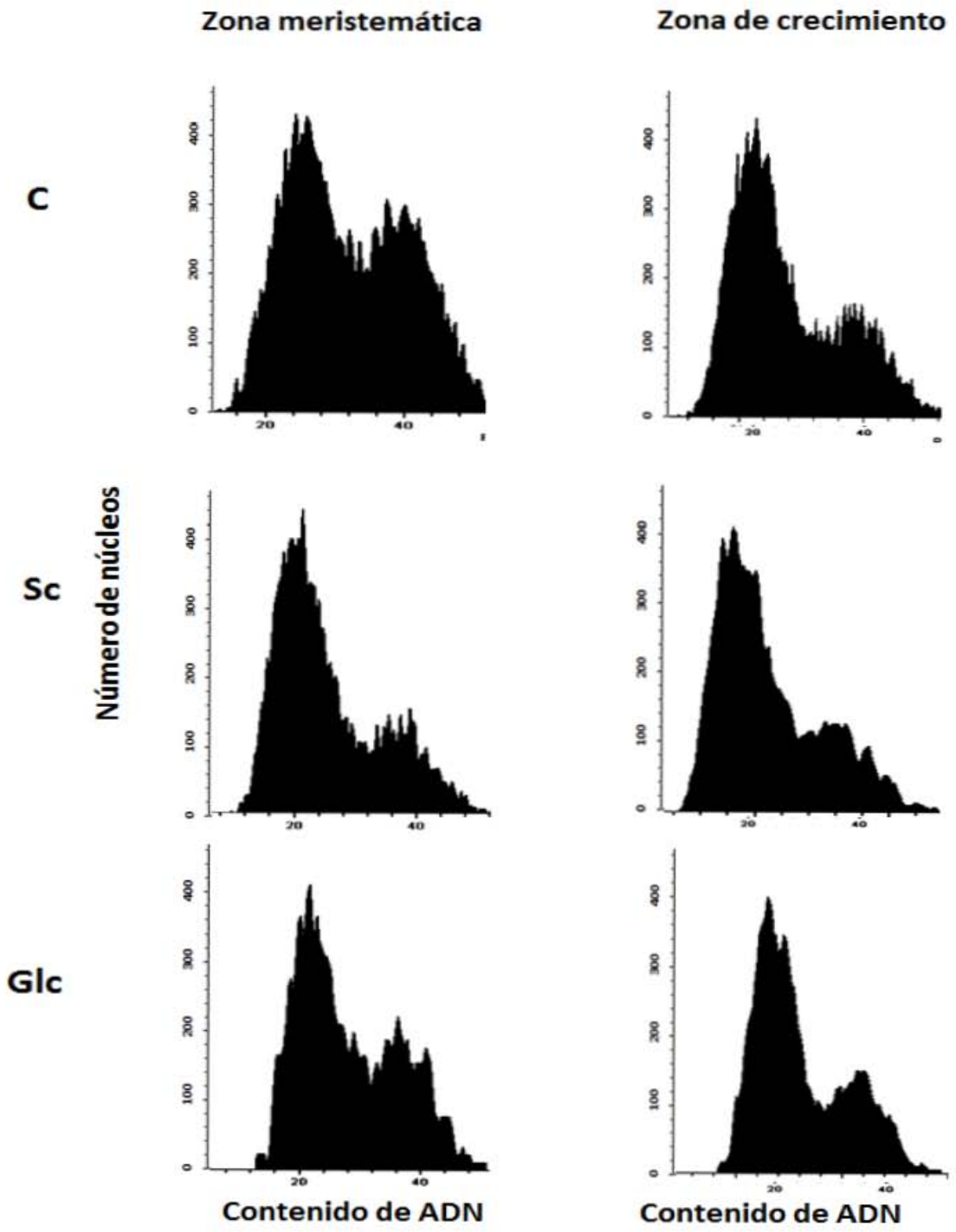

Figura 34. Histogramas de citometría de flujo de número de núcleos de ejes embrionarios de maíz con diferente contenido relativo de ADN a las 60 horas de imbibición. A. zona meristemática; **B.** zona de elongación/diferenciación, en cada tratamiento C(control),Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM).El primer pico en cada histograma representa núcleos 2C (Fase G_1), mientras que el Segundo pico representa núcleos 4C (G_2).

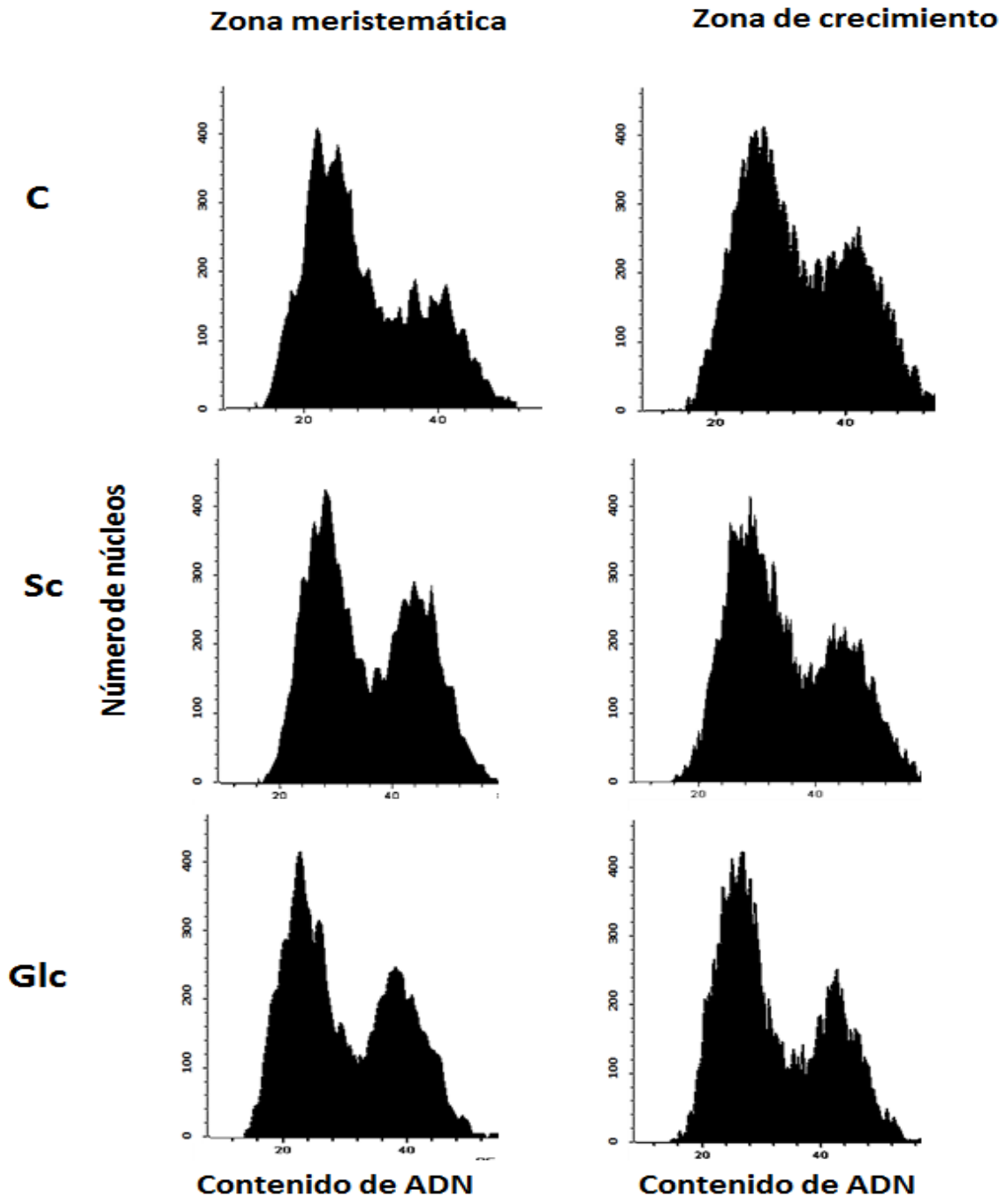

Figura 35. Histogramas de citometría de flujo de número de núcleos de ejes embrionarios de maíz con diferente contenido relativo de ADN a las 96 horas de imbibición. A. zona meritemática; **B**. zona de elongación/diferenciación, en cada tratamiento C(control),Sc (sacarosa 120 mM), Glc (Glucosa 120 mM).El primer pico en cada histograma representa núcleos 2C (Fase G_1), mientras que el Segundo pico representa núcleos 4C (G_2).

Apéndice D

Al realizar los inmunoprecipitados es necesario verificar que la extracción nuclear se haya realizado de manera correcta. Lo que se muestra en la Figura 27 son ensayos de Western blots de los extractos nucleares de ejes embrionarios del grupo control a los tiempos estudiados en cada zona y de extracto total usando anticuerpos contra histona H3, proteína que se encuentra presente en el núcleo, o contra GADPH, proteína presente en el citoplasma; la extracción adecuada se corrobora cuando no hay señal de GADPH en los extractos nucleares.

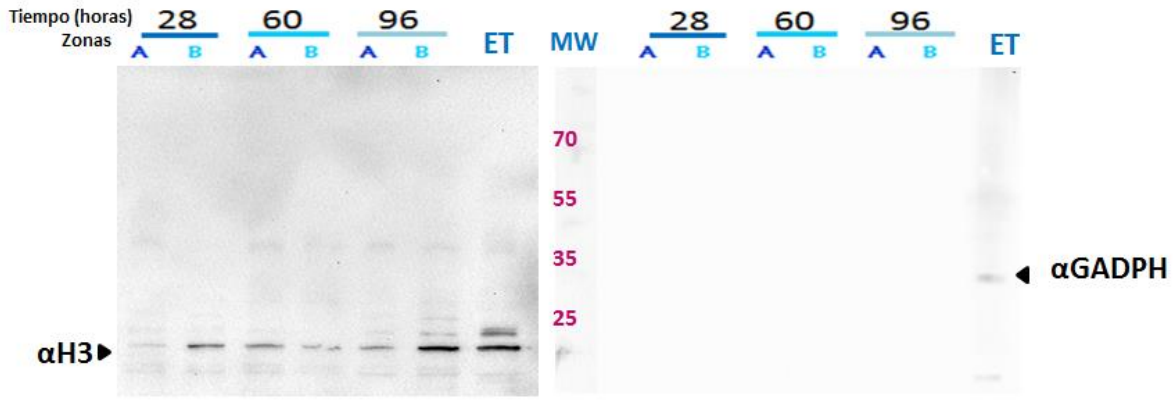

Figura 27. Control de extracción nuclear de ejes embrionarios. Del lado izquierdo, Inmunodetección del anticuerpo anti-Histona H3 (17 KDa), el resto de las bandas observadas son resultado de interacciones inespecíficas. A la derecha, Inmunodetección del anticuerpo anti-GADPH (36 kDa). **MW,** Marcadores de masa molecular; **ET**, Extracto total; extractos nucleares de las zonas A y B de cada tiempo analizado.

Apéndice E

Tabla 1. Porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular en la zona A del eje embrionario de maíz

	Tiempo de imbibición (horas)	Tratamiento	G_1 (%)	S (%)	G_2 (%)
Zona A (meristemática)	0		72.64 ± 3.07	5.85 ± 0.17	21.81 ± 2.45
	18	Control	59.39 ± 2.18	15.43 ± 3.65	25.18 ± 0.23
		Sacarosa	59.42 ± 3.45	8.56 ± 2.56	37.02 ± 1.67
		Glucosa	42.15 ± 2.76	4.81 ± 1.89	53.04 ± 2.13
	28	Control	59.82 ± 4.14	8.17 ± 3.89	32.01 ± 1.23
		Sacarosa	57.6 ± 2.34	13.54 ± 2.66	28.86 ± 1.11
		Glucosa	58.48 ± 0.14	8.05 ± 1.87	33.47 ± 2,09
	60	Control	50.49 ± 3.15	7.44 ± 0.26	42.07 ± 1.87
		Sacarosa	72.18 ± 3.02	10.19 ± 0.67	17.62 ± 2.34
		Glucosa	53.95 ± 2.92	12.53 ± 1.12	33.52 ± 2.37
	96	Control	61.62 ± 3.56	17.15 ± 2.67	21.23 ± 0.87
		Sacarosa	42.59 ± 2.67	32.01 ± 0.56	25.4 ± 1.45
		Glucosa	46.34 ± 1.89	27.18 ± 1.34	26.48 ± 0.86

Tabla 2. Porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular en la zona B del eje embrionario de maíz

	Tiempo de imbibición (horas)	Tratamiento	G_1 (%)	S (%)	G_2 (%)
Zona B (crecimiento)	0		70.86 ± 2.87	9.99 ± 0.28	19.115 ± 2.01
	18	Control	51.82 ± 1.65	10.34 ± 3.89	37.84 ± 2.78
		Sacarosa	52.53 ± 1.89	6.42 ± 2.67	41.05 ± 2.55
		Glucosa	57.62 ±2.09	10.68 ± 2.05	31.37 ± 0.56
	28	Control	59.22 ± 2.98	12.14 ± 1.34	28.64 ± 3.78
		Sacarosa	60.45 ± 0.67	10.23 ± 2.2	29.32 ± 3.45
		Glucosa	52.49 ± 4.98	13.97 ± 1.77	33.54 ± 1.78
	60	Control	55.65 ± 2.56	14.57 ± 1.78	29.78 ± 0.87
		Sacarosa	70.3 ± 2.34	8.71 ± 1.09	20.99 ± 2.34
		Glucosa	64.53 ± 4.65	11.51 ± 1.11	23.96 ± 3.67
	96	Control	48.29 ± 0.83	31.36 ± 2.34	20.35 ± 3.55
		Sacarosa	52.53 ± 1.1	18.76 ± 2.99	28.71 ± 4.78
		Glucosa	59.38 ± 1.89	11.67 ± 3.78	28.95 ± 3.21