



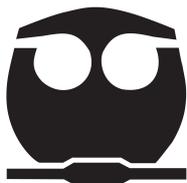
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Regulación traduccional de mRNAs blanco de  
miRNAs durante la embriogénesis somática de maíz”.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**VASTI THAMARA JUÁREZ GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D. F. 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**Profesora: Luz del Carmen Castellanos Román**

**Profesora: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**

**Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

**Profesora: Martha Patricia Coello Coutiño**

**Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

**LABORATORIO 103 DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Naholi David Alejandri Ramírez**

## **SUSTENTANTE:**

---

**Vasti Thamara Juárez González**



# ÍNDICE

<b>2. Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Antecedentes .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1 Maíz.....</b>	<b>6</b>
<b>4. 1.1 Origen y domesticación.....</b>	<b>6</b>
<b>4.1.2 Taxonomía. ....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.3 Morfología. ....</b>	<b>9</b>
<b>4. 2 Fitoregulación durante el desarrollo de una planta.....</b>	<b>12</b>
<b>4.3 Embriogénesis Somática.....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Flujo de la información biológica. ....</b>	<b>18</b>
<b>4. 5 Regulación de la expresión Genética.....</b>	<b>21</b>
<b>4.6 Polirribosomas, una alternativa para el estudio de la traducción y la regulación postranscripcional .....</b>	<b>23</b>
<b>4.7 Silenciamiento Génico Postranscripcional (PTGS) y RNAs no codificantes (ncRNA) .....</b>	<b>28</b>
<b>4.7.1 Generalidades.....</b>	<b>28</b>
<b>4.7.2 RNAs pequeños (sRNAs) .....</b>	<b>30</b>
<b>4.7.2.1 Biogénesis de siRNAs .....</b>	<b>31</b>
<b>4.7.2.2 Biogénesis de miRNAs .....</b>	<b>32</b>
<b>4.7.2.3 Incorporación del sRNA dentro de complejos efectores. ....</b>	<b>33</b>
<b>4.7.3.1 Importancia, abundancia y Evolución de MicroRNAs. ....</b>	<b>35</b>
<b>4.7.3.2 Relación entre microRNAs y sus mRNAs blanco .....</b>	<b>37</b>
<b>4.7.3.3 Represión traduccional mediada por miRNAs .....</b>	<b>38</b>
<b>4.7.3.3 Algunos MicroRNAs que actúan mediante corte endonucleolítico.....</b>	<b>42</b>
<b>4.7.3.4 MicroRNAs en Maíz .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Planteamiento del problema .....</b>	<b>46</b>
<b>6. Hipótesis .....</b>	<b>47</b>
<b>7. Objetivos .....</b>	<b>47</b>
<b>7.1 Objetivo General.....</b>	<b>47</b>
<b>7.2 Objetivos particulares.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Materiales y Métodos .....</b>	<b>48</b>
<b>8.1 Embriogénesis somática de maíz.....</b>	<b>48</b>
<b>8.2 Perfiles Polirribosomales .....</b>	<b>50</b>

<b>8.3 Extracción de RNA de fracciones Polirribosomales.....</b>	<b>53</b>
<b>8.4 Identificación de RNAs pequeños (Ensayos tipo Northern blot).....</b>	<b>54</b>
<b>8.5 Tratamiento con DNasa .....</b>	<b>56</b>
<b>8.6 Reacciones de Transcriptasa Reversa (RT) .....</b>	<b>57</b>
<b>8.7 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) mediante Syber Green ..</b>	<b>58</b>
<b>9. Resultados .....</b>	<b>59</b>
<b>I. Análisis de Perfiles Polirribosomales en gradientes de Sacarosa.....</b>	<b>59</b>
<b>II. Localización de miRNAs en fraccionamientos polirribosomales de callos embriogénicos de maíz. ....</b>	<b>63</b>
<b>III. Presencia de mRNAs blanco de miRNAs en fraccionamientos polirribosomales de callos embriogénicos de maíz. ....</b>	<b>67</b>
<b>10. Discusión .....</b>	<b>71</b>
<b>11. Conclusiones.....</b>	<b>79</b>
<b>12. Perspectivas .....</b>	<b>80</b>
<b>13. Bibliografía.....</b>	<b>81</b>

## 2. Resumen

La regulación postranscripcional se encuentra presente en todos los organismos. Parte de esta regulación se encuentra mediada por miRNAs, los cuales pueden ejercer su efecto mediante una represión traduccional de su mRNAs blanco. En este estudio se realizó un análisis de la actividad traduccional, distribución de cuatro miRNAs en callos embriogénicos de maíz a diferentes etapas de subcultivo y los niveles de expresión de mRNAs blanco de estos cuatro miRNAs, mediante perfiles polirribosomales, ensayos de Northern Blot y RT-PCR, respectivamente. Se encontró que existe una actividad traduccional diferencial en distintos tiempos de subcultivo de callos embriogénicos de maíz y, un posible microRNA que podría estar involucrado en dicha regulación traduccional, miRNA 528. Además, los mRNA blanco de los miRNAs más abundantes en embriogénesis somática se encuentran a niveles muy bajos o están ausentes en las condiciones de cultivo de callos embriogénicos de maíz, a excepción de AGO1, que cambia sus niveles y distribución en fracciones polirribosomales durante los subcultivos de callos embriogénicos de maíz.

### 3. Introducción

México es el lugar de origen y diversificación del maíz; su importancia en ámbitos culturales, económicos y alimentarios ha ido desarrollándose a la par de la población latinoamericana. Ejemplo de ello se encuentra datado en uno de los libros más antiguos y representativos de el gran imperio maya: el *Popol Vuh*, el cual alberga las historias del origen mitológico de su pueblo. En dicho libro se relata la historia de cómo surgieron los primeros hombres (después de dos intentos fallidos) a partir de maíz, el cual formó la carne de aquellos capaces de alabar a los dioses, estos hombres son los mayas que conocemos hoy en día.

La abuela Xmucame tomó el maíz blanco y amarillo e hizo nueve bebidas que entraron de comida de la que salió la carne y la gordura del hombre, y de esa misma comida fueron hechos sus brazos y sus pies. De maíz formaron los Señores Tepew y K'ucumatz a nuestros primeros padres y madres (Anónimo, 1557).



Figura 1. Espigas de Maíz.

La creencia de que el hombre está hecho de lo que come nos brinda la visión del papel que ha jugado el maíz en nuestra cultura, y la afirmación indígena de que “somos hijos del maíz” es innegable: la domesticación del maíz nos ha permitido subsistir y formar una cultura rica en alimentos producidos a partir del mismo. De la misma manera, el maíz ha evolucionando a la par que nuestra cultura; la variabilidad que existe en el maíz es impresionante, adaptándose a casi todos los ambientes y presiones selectivas de nuestro continente. El maíz se cultiva desde las costas de casi todo el continente americano hasta las tierras altas de alrededor de 4,000 m en los Andes; se siembra en las regiones secas con una precipitación media inferior a 400 mm y

en regiones con precipitación superior a 4,000 mm anuales. Existen muchas variedades de maíz: variedades con altura de planta de uno a cinco metros, con distintos grados de tolerancia a la sequía, al calor o a las heladas, con adaptación a las diferentes texturas de suelo, altitud y latitud (Sánchez, 2011). Por esta razón, el estudio del maíz debe ser un tema central en ámbitos sociales, políticos y sobre todo científicos; no sólo el conocimiento taxonómico y demográfico de las distintas variedades de maíz; sino más aun, sus bases genéticas y mecanismos regulatorios que han permitido su acelerado desarrollo en cuanto a tiempos evolutivos se refiere. De esta manera, podremos tener las bases científicas para poder preservarlo y mejorarlo sin que esto represente una amenaza para las poblaciones nativas de maíz, su futura historia evolutiva y sobretodo para que siga sosteniendo la alimentación de cientos de poblaciones en todo el mundo.

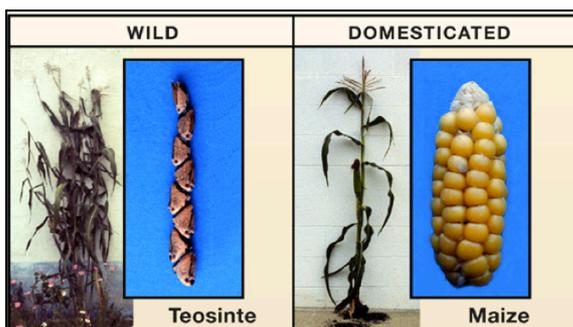
## 4. Antecedentes

### 4.1 Maíz

#### 4. 1.1 Origen y domesticación

El término “domesticación” en biología, se utiliza para referirse a los cambios genéticos producidos en una población biótica como resultado de las interacciones con el ser humano, conduciéndola a una relación de dependencia. Estos cambios ocurren en primer lugar en respuesta a la influencia del ser humano o la deliberada selección con base en ciertos rasgos favorables; es decir, respuestas genéticas por la modificación del medio ambiente o el manejo de la producción de la planta (Staller, 2010).

El maíz fue domesticado a partir de su antecesor el teocintle (derivado de “teocintli” en nahuatl: “teotl” = sagrado y “cintli” = maíz), un nombre común dado a un grupo de especies anuales perennes del género *Zea*, nativo de México y Centroamérica (ver Figura 2). Extensivos análisis filogenéticos basados en comparación molecular de variedades y razas salvajes indican que el maíz surgió de un evento de domesticación ocurrido en el sureste de México hace 9,000 años aproximadamente. La domesticación resultó en un grupo de



**Figura 2. Fenotipo del maíz y su Progenitor.** Planta del progenitor del maíz, teocintle (izquierda), con múltiples tallos y largas ramas, después se muestra una planta de maíz cultivado (derecha) con un único tallo. La mazorca de maíz (recuadro) tiene su grano desnudo en la superficie de la mazorca, mientras que la mazorca de teocintle (recuadro) tiene su grano (no visible) encerrado en la carcasa triangular que comprende la mazorca. (Modificado de Cell 127, Diciembre 29, 2006)

variedades ancestrales que subsecuentemente se extendieron por todo el continente y eventualmente al resto del mundo, adaptándose a las prácticas humanas en diferentes regiones ecológicas y geográficas donde los cultivos se establecieron. Como centro de origen y domesticación, México tiene la mayor diversidad de recursos genéticos de maíz (Vielle-Calzada & Padilla, 2009).

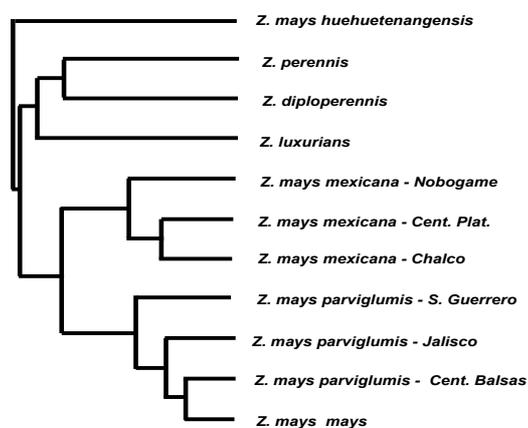
En 1939, George W. Beadle propuso la “Hipótesis del teocintle”, donde afirmaba que el maíz moderno derivaba directamente del teocintle. Beadle fue la primera persona que usó exitosamente resultados experimentales para verificar esta hipótesis y señaló cinco mutaciones clave para pasar de teocintle a maíz. Debido a las notables diferencias en la inflorescencia femenina (mazorca) entre el maíz y el teocintle (ver Figura 2). Aun continúa un gran debate acerca de la evolución del maíz. En el año 2000 se propuso la Teoría de la Translocación sexual (STLT, por sus siglas en inglés), que explica la evolución de la mazorca del teocintle a la del maíz. La STLT propone que la mazorca de maíz evolucionó a partir de las espigas de teocintle a través de una o dos translocaciones homeóticas sexuales, que remplazaron las ramas de las espigas primarias y secundarias con estructuras femeninas (Wusirika et al, 2011).

#### 4.1.2 Taxonomía.

El maíz (*Zea mays* L. *Sensu lato*) se clasifica como miembro de la familia de las Gramíneas *Poaceae*, subfamilia *Maydeae* la cual se encuentra dividida en dos géneros (*Tripsacum* y *Zea*). El género *Zea* (ver Figura 3), consiste en seis taxones distintos clasificados en cuatro especies (Staller, 2010).

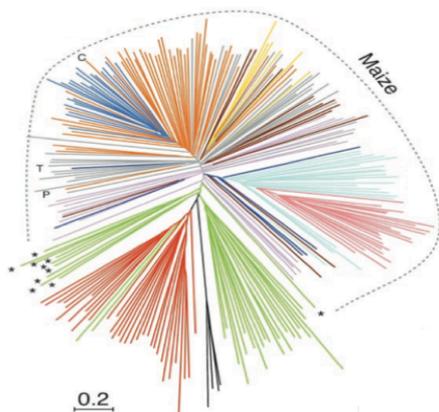
Estas especies son: 1) *Z. Mays* L., *sensu lato*, que incluye *Z. Mays*

*ssp. Mexicana*, y *Z. Mays ssp. Parviglumis*, éstas dos últimas son los teocintles anuales altamente distribuidos en México y el oeste de Guatemala; 2) *Z. Luxurians*; 3) *Z. Perennis* y, finalmente, 4) *Z. Diploperennis*, el teocintle diploide perenne, *Z. Perennis* y *Z. Diploperennis*. (Doebley & Iltis, 1980).



**Figura 3. Filogenia Género Zea.** Análisis Filogenético basado en variación de isoenzimas del Género Zea. (Tomado de Maydica 35 (1990): 143-150).

Estudios realizados en 2002 por Y. Matsuoka, basados en análisis filogenéticos y utilizando marcadores moleculares conocidos como microsatélites en plantas de maíz y teocintle, confirmaron que todo el maíz tiene un linaje monofilético (ver Figura 4), derivando de *Z. Mays parviglumis* (Matsuoka *et al.* 2002).



**Figura 4. Origen monofilético del maíz.** La línea punteada gris circunscribe el linaje monofilético de maíz. Los asteriscos identifican aquellas poblaciones de *ssp. Parviglumis* de donde se origina el maíz, todas ellas se encuentran en la cuenca central del Río Balsas en México. El árbol filogenético está basado en 193 muestras de maíz y 71 de teocintle. (Modificado de PNAS 99 (2002). 9: 6080-6084)

En cuanto a la clasificación de las razas de maíz Mexicanas, en un estudio realizado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) en 2011, usando diferentes tipos de marcadores morfológicos, agronómicos, genéticos (isoenzimas, nudos cromosómicos) y moleculares (microsatélites) se obtuvo la clasificación racial que se muestra en la Tabla I.

**Tabla I. Clasificación de razas Mexicanas de maíz**

Grupo	Características	Razas incluidas
Razas de las partes altas del centro de México.	Se han denominado Grupo Cónico, tienen en común mazorcas de forma cónica, números altos de hileras de grano, número reducido de ramas de la espiga, raíces débiles y hojas caídas.	Cónico Norteño, Palomero, Toluqueño, Cónico, Elotes cónicos, Arrocillo, Chalqueño, Mushito, Cacahuacintle y Maíz dulce.
Razas de las partes altas del norte de México	Llamado Grupo Sierra de Chihuahua, se caracteriza por plantas pequeñas de floración temprana, pocas ramas de la espiga, mazorcas largas y delgadas con granos redondeados	Cristalino de Chihuahua, Gordo, Azul, Apachito y Complejo Serrano de Jalisco.
Razas del occidente de México	Grupo de ocho hileras de Grano. Incluye razas	Harinoso de Ocho, Tabloncillo Perla,

	distribuidas en elevaciones bajas en el occidente y noroeste de México.	Tabloncillo, Bofo, Elotes Occidentales, Blandos de Sonora y Onaveño.
Chapalote	Chapalote es una de las razas más antiguas de México, todas las razas incluidas tienen mazorcas alargadas con forma de puro.	Chapalote, Reventador, Dulcillo, del Noroeste y Elotero de Sinaloa.
Dentados Tropicales	Las razas de este grupo y sus derivados son probablemente las más usadas en los programas de mejoramiento genético público y privados en el ámbito mundial.	Tuxpeño, Vandeño, Tuxpeño norteño, Tepecintle, Zapalote Grande y Celaya.
Grupo de Madurez Tardía del sureste de México.	Incluye razas sembradas en altitudes medias a bajas en el sur de México; son muy sensibles al fotoperiodo y a la temperatura.	Olotillo, Dzit-Bacal, Comiteco, Motozinteco, Tehua, Olotón y Coscomatepec.
Tropicales precoces	Razas de ciclo corto adaptadas a elevaciones bajas y distribuidas principalmente en las llanuras costeras de la costa del Pacífico y la Península de Yucatán.	Conejo, Zapalote Chico, Nal-Tel y Ratón.

#### 4.1.3 Morfología.

El maíz es una planta anual con un extenso sistema de raíces fibrosas. Se reproduce mediante polinización cruzada, con inflorescencia femenina (mazorca) y masculina (espiga) en lugares separados en una misma planta (Ver Figura 5; Cai, 2006). La espiga y mazorca de maíz son estructuras complejas que surgen a partir de un programa de desarrollo que envuelve un gran número de identidades y destinos celulares en el meristemo (Vollbrecht & Schmidt, 2009). El brote meristemal apical (SAM, por sus siglas en inglés: "Shoot apical meristem") es el responsable de el crecimiento indeterminado del brote de maíz y se forma durante la embriogénesis. El SAM (ver Figura 6) se



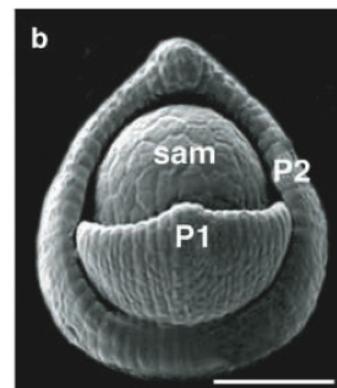
**Figura 5. Morfología del Maíz.** Dos plantas robustas de maíz en plena floración. El polen es producido en las espigas (inflorescencia masculina) en la parte más alta, mientras que los gametos femeninos son producidos por las mazorcas (inflorescencia femenina) con estigmas extendidos localizados en la parte media de la planta. (Tomado de Nature Review Genetics. Vol. 2. 2001)

define como la región por encima de la hoja primaria recientemente iniciada, es una estructura dinámica que produce una nueva hoja primaria cada 1-2 días.

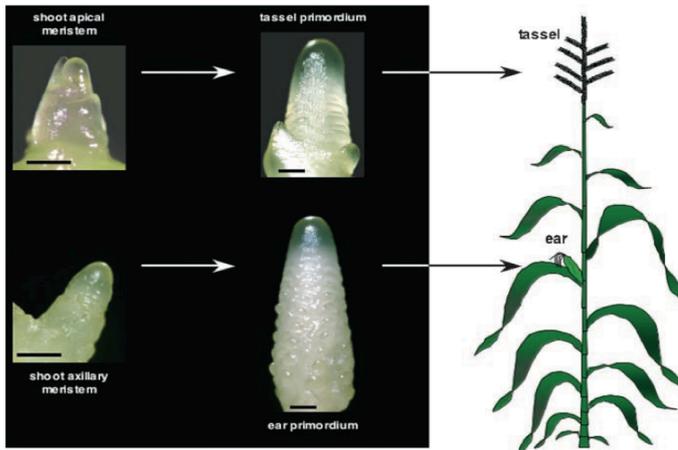
En el maíz, el SAM es una estructura cupular que consiste en cerca de doscientas células en estado embrionario de dos tipos: células germinales que se dividen para dar lugar a células hijas, que a su vez mantienen el destino celular de células germinales o son incorporadas en la hoja primaria, y meristemas axilares del brote o células para formación de tejidos. Como el SAM se forma durante la embriogénesis y persiste a través de la fase de inflorescencia, su actividad se encuentra íntimamente ligada a la iniciación del crecimiento de las hojas. El establecimiento de distintos

acervos de células germinales o meristemas en los polos del brote y raíz del embrión inmaduro de maíz son esenciales para continuar con el crecimiento y desarrollo de la planta. El SAM, surge alrededor de los 10 días después de la polinización, dependiendo del fondo genético y las condiciones de crecimiento (Jackson, 2009).

Una vez que cesa la producción de hojas por el meristemo apical del brote, se comienza con la producción de la inflorescencia primaria de la espiga (ver figura 7). La transición floral es un cambio crítico en el ciclo de vida de la planta, se encuentra marcada por una reprogramación de forma vegetativa a crecimiento reproductivo. La transición es inducida por señales derivadas de las hojas que se traslocan a través del floema, hacia el ápice del meristemo del



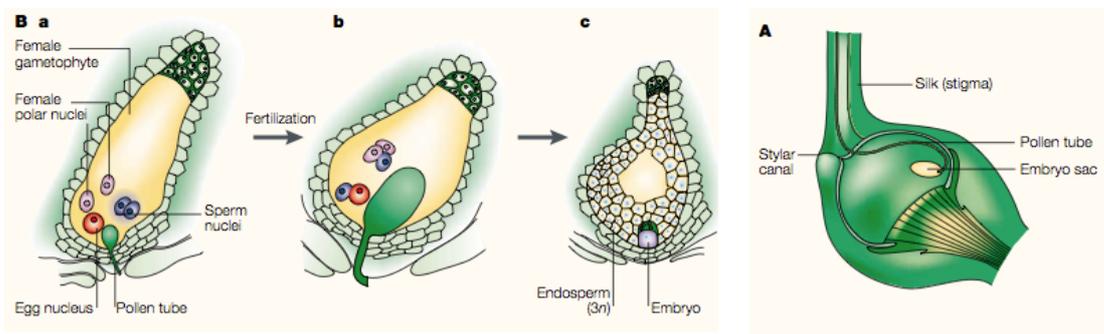
**Figura 6. Morfología de SAM.** Disección y remoción de la mayor parte de la hoja primaria muestran el SAM y parte de las hojas primarias recientemente iniciadas, P1 y P2, a través de microscopía electrónica de barrido. Barra de escala = 100  $\mu$ m. (Tomado de Handbook of Maize: Its Biology, 2009)



**Figura 7. Meristemo Vegetativo y reproductivo de maíz.** La transición floral ocurre cuando el meristemo vegetativo apical del tallo se reprograma de crecimiento reproductivo de hoja primaria y meristemo axilar superior a mazorca primaria. Tanto meristemo primario apical y como axilar se desarrollan en la inflorescencia masculina (espiga) que emite el polen, al mismo tiempo surge la inflorescencia femenina (mazorca). (Tomado de Handbook of Maize: Its Biology, 2009).

brote el cual es reprogramado para adoptar un destino de inflorescencia. A este periodo se le denomina “transición floral”, y la sincronización de la transición determina cuándo florece la planta. Una transición similar ocurre tiempo después con la conversión de un meristemo axilar en la mazorca primaria (Colasanti & Muszynski, 2009).

La polinización de maíz consiste en la llegada de un microgametofito –un grano de polen– a una superficie receptora de la flor (estigma). La polinización es la primera de las etapas de una serie que culmina con la formación de la semilla. La etapa que sigue a la polinización es el desarrollo del tubo polínico que se extiende hasta el megagametofito. La tercera etapa es un proceso de fecundación llamado “doble fertilización”, propio de las angiospermas y que por mucho tiempo fue considerado la característica distintiva de las mismas. En las

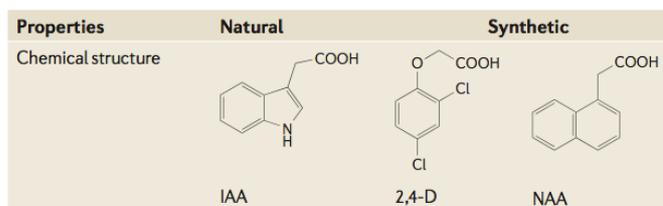


**Figura 8. Reproducción del Maíz.** A) Pistilo (órganos reproductivos femeninos) de maíz. El pistilo se muestra al mismo tiempo que el tubo polínico (gametofito masculino) introduciéndose al saco embrionario (gametofito femenino). El estigma (la superficie pegajosa de la flor que recibe el polen) y el estilo (el tallo que conecta el estigma con el ovario). B) Fertilización doble. Ocurren dos eventos de fusión: un núcleo espermático con un núcleo femenino conduce a la formación del embrión. Se describe el proceso específico de una planta mediante el cual dos núcleos del tubo polínico entran al saco embrionario (a); un huevo fertilizado, lo que conduce a la embrión propiamente dicho, mientras que el otro fertiliza uno de los dos núcleos polares (b). La fusión con el segundo núcleo polar forma el endospermo triploide que va a alimentar al embrión (c). (Modificado de Nat. Rev. Gen. Vol 2. 2001)

etapas de la fecundación, que ocurre dentro del megagametofito, participan dos núcleos masculinos que se encuentran dentro de un único microgametofito. Uno de los núcleos del gameto masculino se combina con el del gameto femenino para dar un cigoto diploide, el segundo núcleo del gameto masculino se fusiona con otros dos núcleos haploides del gametofito femenino para formar un núcleo triploide (3n). Dicho núcleo a su vez se divide y forma un tejido triploide, el endospermo (ver Figura 8B), cuyas reservas nutren al embrión durante su desarrollo inicial (Sadava *et al*, 2009). Cerca de los 7-9 días después de la polinización en la cara opuesta al endospermo en desarrollo y orientado hacia el eje principal de la mazorca (eje adaxial), un pequeño grupo de células permanecen densamente empacadas en el embrión, mientras que alrededor las células comienzan a alargarse y en este punto el meristemo apical del brote surge en una posición lateral (Nardmann & Werr, 2009).

## 4. 2 Fitoregulación durante el desarrollo de una planta

En plantas, los fitoreguladores son compuestos orgánicos que actúan en muy bajas concentraciones en sitios a menudo distantes de donde son producidas. Las plantas producen fitoreguladores en numerosos tipos celulares. Cada fitoregulador desempeña múltiples funciones de regulación que afectan



**Figura 9. Estructura de algunas auxinas.** Ácido 3-Indolacético (IAA) es considerado la auxina natural más importante. El ácido 1-naftalenacético (NAA) es una auxina importante en la horticultura y 2, ácido 4- diclorofenoxiacético (2, 4-D) un herbicida selectivo común. (Tomado de Nature Review 2006. Vol 7: 847-859).

aspectos diferentes del desarrollo de la planta haciendo uso de las vías de transducción de señales, cascadas de reacciones químicas mediante las cuales una célula genera respuesta a

un estímulo (Sadava *et al*, 2009). Los cinco principales grupos de fitoreguladores son: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (ABA). La mayoría de los procesos fisiológicos parecen estar gobernados por la interacción de estos compuestos, ya sea en forma simultánea o en orden secuencial (ver Tabla II). Existen otros compuestos que se sintetizan de forma natural en la planta y que son capaces, en ciertos casos, de alterar el desarrollo

de una planta. Dentro de estas sustancias se encuentran las poliaminas, los jasmonatos, el ácido salicílico y los brasinoesteroides. Los diferentes fitoreguladores poseen estructuras químicas muy variadas y diversos sitios de síntesis, y en consecuencia su transporte ocurre de varias formas (Herrera *et al.*, 2006).

**Tabla II. Principales fitoreguladores y sus efectos** (Modificado de Starr C. *Biología: La unidad y diversidad de la vida*, 2008)

Fitoregulador	Fuente y modo de Transporte	Efectos de estimulación o inhibición
<b>Giberelinas</b>	Tejidos jóvenes de brotes, semillas y posiblemente raíces. Pueden viajar en el xilema y el floema (sistema vascular de la planta).	Elongación de tallos (estimula la división y elongación de células). Favorece que las semillas germinen, ayuda a inducir la floración en algunas plantas
<b>Auxinas</b>	Meristemos apicales de brotes, coleóptilos, semillas. Transporte polar a través de células del parénquima de los brotes hacia la base de la raíz.	Elongación de brotes, coleóptilos. Promueve la actividad en el cambio vascular, la diferenciación del tejido vascular. Inhibe la abscisión. Formación de frutos. Bloquea la formación de yemas laterales (dominancia apical).
<b>Citocininas</b>	Preferentemente en la punta de la raíz. Viaja de las raíces a los brotes dentro del xilema.	Estimula la división celular en raíces y brotes, la expansión de las hojas. Inhibe el envejecimiento de las hojas.
<b>Etileno</b>	La mayoría de los tejidos que experimentan maduración, envejecimiento o estrés. Se difunde en todas direcciones.	Afecta la orientación de los tejidos, suscitando o inhibiendo el crecimiento de la célula; la maduración de frutos; causa la abscisión y el envejecimiento y muerte.
<b>Ácido abscísico (ABA)</b>	Células de la raíz en respuesta a tensión por falta de agua. Viaja de las raíces a las hojas dentro del Xilema.	Estimula el cierre de estomas. Induce el transporte de productos fotosintéticos de las hojas a las semillas. Estimula la formación de embrión en las semillas. Puede inducir y mantener la latencia en algunas plantas.

Las auxinas fueron de los primeras fitoreguladores descubiertas. Las hojas jóvenes, las flores y los embriones en desarrollo producen auxinas, aunque en menor medida que los meristemos apicales del brote (Curtis *et al.*, 2008). El ácido 3-indol acético (IAA, por sus siglas en inglés) es la auxina predominante en las plantas; es una fitoregulador indispensable que regula muchos aspectos

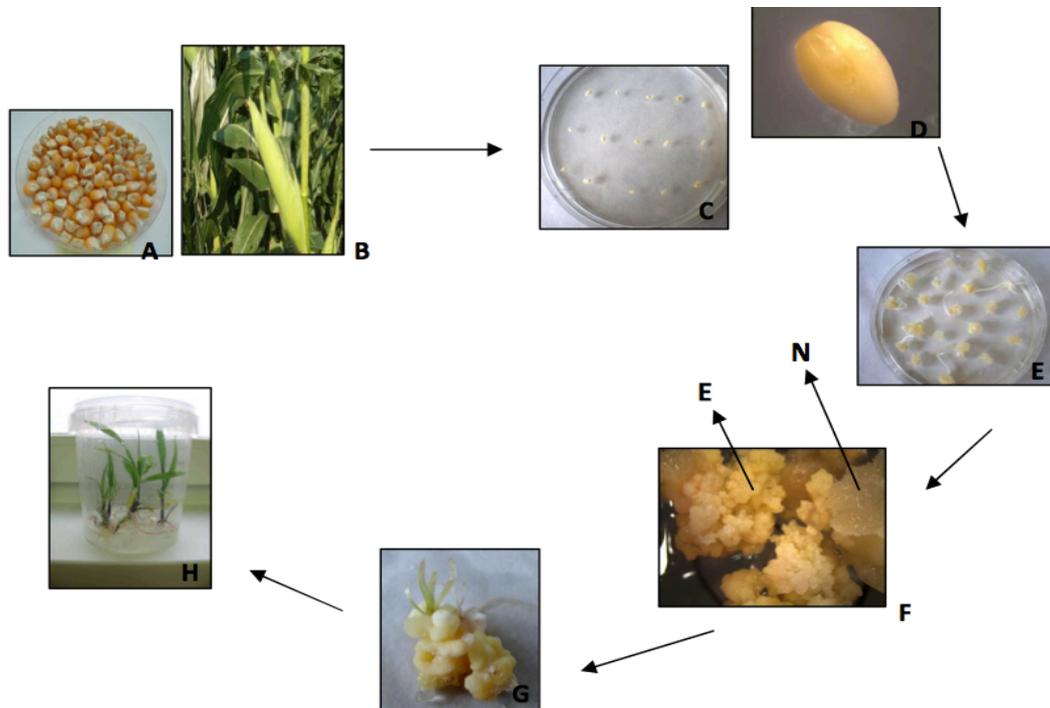
en el desarrollo de la planta. El IAA endógeno se ha implicado en el desarrollo embrionario y post-embrionario. Hoy en día existen auxinas sintéticas (ver Figura 9); por ejemplo, 2-4 ácido diclorofenoxiacético, uno de los herbicidas más usados en el mundo. Y, aun cuando se conoce la influencia de las auxinas en la división celular, elongación celular y diferenciación celular, la forma exacta en que están implicadas en cada proceso (y en qué medida se relacionan) no es completamente conocida. La razón por la que las auxinas han atraído tanta atención durante casi un siglo no sólo es que tienen la capacidad de influir en el crecimiento, sino que tienen efectos de mayor alcance adicionales en el ciclo vital de las plantas. Evidencia reciente muestra que, a través de un mecanismo único de percepción e inducción, las respuestas fisiológicas que proveen las auxinas son fundamentales para la estructura y el funcionamiento de una planta (Teale *et al.*, 2006).

### **4.3 Embriogénesis Somática**

La regeneración de plantas en cultivos de callos de maíz se lleva a cabo mediante la organización de *novo* de los meristemas del brote en callos escutelares. (Lu *et al.*, 1982). Fue reportado por primera vez en *Zea mays L.* por Green y Phillips (1975) utilizando embriones inmaduros. Usando el mismo tejido, Springer *et al.* (1979), demostraron que la regeneración se llevaba a cabo mediante organogénesis. Rice *et al.* (1978) y Lu *et al.* (1982) encontraron que esta regeneración podría ocurrir mediante embriogénesis somática (Duncan *et al.*, 1985).

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

genes (ver Figura 10). La embriogénesis somática juega un importante papel en la propagación clonal (Jakubekova *et al.*, 2011), debido a que en este modelo de regeneración los embriones somáticos se inician de células somáticas (no gaméticas), las cuales restablecen la morfología y en gran medida la expresión genética de células cigóticas. Los embriones tienen un origen único celular, aunque por lo general se desarrollan a partir de masas multicelulares proembriogénicas, esto permite obtener plantas que conservan el genotipo (Garrocho-Villegas *et al.* 2012). Cuando se integra con los programas convencionales de mejoramiento y técnicas de biología molecular y celular, la embriogénesis somática ofrece una herramienta valiosa para el mejoramiento genético de los cultivos comerciales (González *et al.* 2012). Además, debido a que la embriogénesis somática implica el establecimiento de una reprogramación genética específica para la regeneración de una planta a partir de cultivos celulares, constituye una herramienta potencial como modelo para estudios básicos sobre la regulación temprana y eventos morfogénicos durante el proceso de embriogénesis.



**Figura 10. Embriogénesis somática y regeneración de planta a partir de embriones inmaduros de maíz.** A: Semillas de maíz B: Cultivo de *Zea mays* L. 20 días después de la polinización; C-D: Embriones inmaduros después de un día en el medio de iniciación de callos N<sub>61</sub>; E: Iniciación de callos, 14 días después del cultivo; F: Callos embriogénicos con embriones somáticos en etapa globular (E) y callos no embriogénicos (N); G: Maduración del embrión en medio N<sub>6p</sub>, se muestra la primera hoja y coleóptilo; H: raíces de maíz regenerándose *in vitro* en medio MS. (Tomado de JMBFS 2011: 1 (4)).

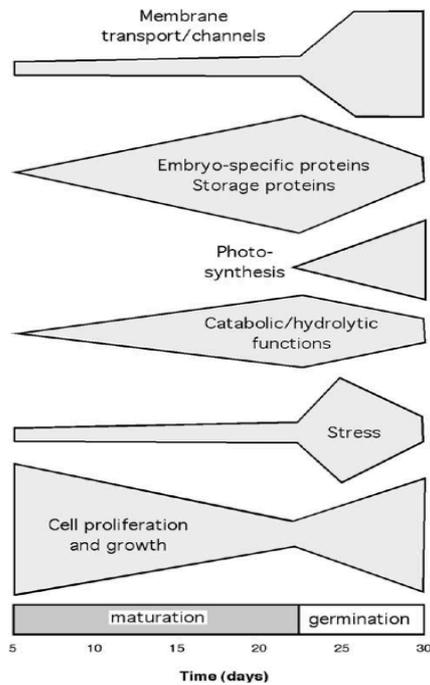
Aun cuando la embriogénesis somática tiene muchas ventajas, también presenta algunas limitaciones: la capacidad de producir callos embriogénicos parece ser dependiente del genotipo y tejido. El maíz es un ejemplo típico de este comportamiento, donde el tipo de explante y el fondo genético de la variedad de maíz juegan un rol determinante en el establecimiento de cultivos embriogénicos. Los embriones inmaduros, cosechados en un periodo entre los 12 y 18 días después de la polinización, son los explantes usados tradicionalmente para el establecimiento de cultivos embriogénicos, donde los callos obtenidos de estos tejidos muestran una alta eficiencia de regeneración. Sin embargo, en los últimos reportes sobre propagación de maíz a través de sistemas de organogénicos y embriogénicos se han seleccionado otros tejidos de la planta: el polen u ovarios polinizados, regiones nodales o meristemos del brote. (Garrocho-Villegas *et al.* 2012).

Para la iniciación y propagación de callos embriogénicos, las hormonas son los mejores candidatos para la regulación de la reprogramación del desarrollo; las auxinas y citocininas son los mejores reguladores de la plantas al estar relacionadas en la regulación de la división y diferenciación celular. La influencia de la aplicación exógena de auxinas, preferentemente ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) en la inducción de la embriogénesis somática se encuentra bien documentada. Las auxinas en combinación con citocininas promueven el crecimiento de los callos embriogénicos, suspensiones celulares y órganos, además de regular el proceso de morfogénesis. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos como la división celular y la elongación celular. Desde que es posible la iniciación de la división celular, las auxinas se encuentran relacionadas con la formación de embriones somáticos (Jakubekova *et al.*, 2011). En 1975, Chu *et al.* descubrieron, mediante experimentos con diferentes fuentes de nitrógeno en arroz, un medio de cultivo capaz de mejorar la formación, crecimiento y diferenciación de callos embriogénicos de arroz; el medio contenía  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  combinado con  $\text{KNO}_3$  a bajas concentraciones (Chu *et al.*, 1975), dicho medio ha sido extensamente usado, se conoce como medio N6. Desde el primer reporte de regeneración de maíz mediante embriogénesis somática, se han establecido numerosas mejoras al método original, en cuanto a la formulación del medio de cultivo, las

vitaminas del medio N6 se han sustituido por una combinación de fuentes de nitrógeno y vitaminas llamada coctel 20, que también ha mostrado un incremento en la eficiencia en la regeneración de los embriones. (Garrocho-Villegas *et al.*, 2012).

Por otro lado, la transición de células somáticas a células embriogénicas es poco entendida. Sin embargo, se tuvo un progreso significativo en la elucidación de genes que tienen un rol crítico en el proceso de la embriogénesis somática durante la década pasada (Sun *et al.*, 2012). En la publicación de Sun *et al.*, en 2012, se mencionan algunas de estas aportaciones, las cuales se muestran a continuación:

- **Genes para receptor de cinasa de embriogénesis somática (SERK)**, (por sus siglas en inglés: Somatic Embryogenesis Receptor Kinase). El receptor fue purificado por primera vez en suspensiones de cultivo de zanahoria y se considera que es un marcador específico para identificar formación de células embrionarias. Recientemente, los genes SERK se han detectado en otras especies como *Arabidopsis thaliana*, maíz, coco y plátano.
- **Genes del cotiledón de hojas (LEC)**, (por sus siglas en inglés: Leafy Cotyledon Genes). El gen LEC1 es necesario para la completa maduración del embrión en *Arabidopsis*. El homólogo de LEC1 en maíz, *ZmLEC1*, se ha usado como un marcador molecular seguro para detectar *in vitro* embriogénesis somática en etapas tempranas. Además, se ha demostrado que la sobreexpresión del gen LEC2, cuya sobreexpresión es dependiente de auxinas, puede compensarse por la inhibición de auxinas, y que explantes de cultivos transgénicos en medios de cultivo con contenido de auxinas reducen significativamente el potencial embriogénico.
- **Gen WUSCHEL (WUS)**. Codifica un factor de transcripción que regula las poblaciones de células germinales en el brote del meristemo y se regula por retroalimentación involucrando a los genes CLAVATA (CLV). WUS es regulado por un nivel definido de auxinas endógenas y es esencial para la inducción de embriones somáticos.



**Figura 11. Tendencia en la Expresión de genes durante la embriogénesis somática.** Se muestran los genes en varias categorías con variación significativa a través del tiempo en la maduración del embrión y la germinación. (Tomado de Plant Mol. Biol. (2006), 62:1–14)

En 2006, un estudio basado en microarreglos realizado por Che *et al.* reportó que alrededor de 1,000 genes mostraban variación significativa a través del tiempo durante el desarrollo del embrión somático de una línea híbrida de maíz. Un número sustancial de genes se encontraban regulados a la baja durante la maduración del embrión (genes de proteínas ribosomales e histonas), que puede provocar una desaceleración en la proliferación celular y el crecimiento durante la maduración del embrión, la expresión de estos genes se recupera dramáticamente en la germinación (ver figura 13). Otros genes son regulados a la alta durante la maduración del embrión, incluyendo genes que codifican enzimas hidrolíticas (nucleasas, glucosidasas y proteasas) y algunos genes de

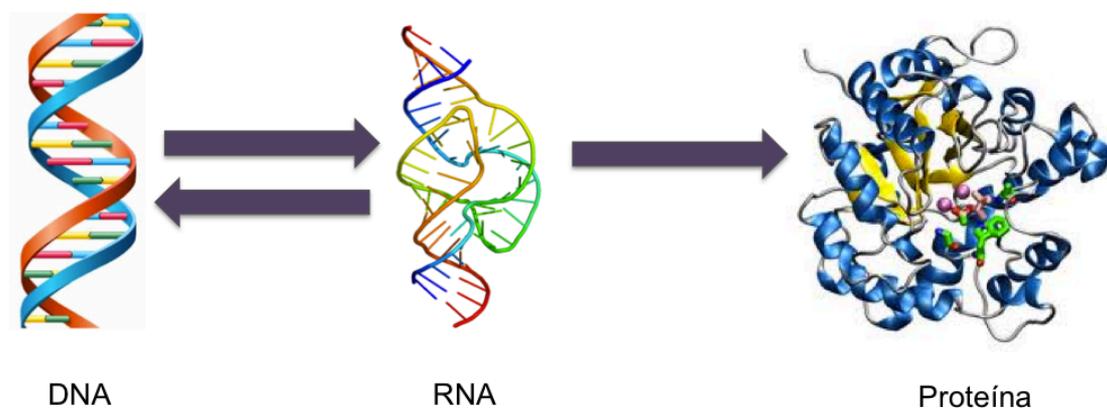
almacenamiento, los cuales resultan buenos candidatos para utilizarse como marcadores del desarrollo.

#### 4.4 Flujo de la información biológica.

El mundo biológico es una compleja red de interconexiones a distintos niveles. Desde la formación de un átomo y su unión con otros átomos para producir moléculas, las cuales a su vez pueden formar complejas macromoléculas a partir de principios básicos físicos y químicos; hasta las células, que pueden organizarse en tejidos para constituir órganos y por último un organismo en su totalidad. Las macromoléculas biológicas o biomoléculas son de cierta manera la columna vertebral de la vida. Las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos conforman a cualquier ser vivo; los carbohidratos y lípidos constituyen las fuentes energéticas básicas para el funcionamiento de un organismo, podría decirse que son el combustible para la vida. Las proteínas por su parte juegan muchos papeles: constituyen la mayor parte de la

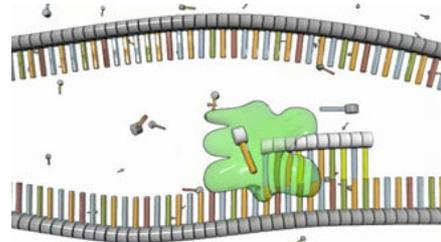
estructura de los seres vivos y catalizan todas las complejas reacciones químicas necesarias para la vida. Por otro lado, los ácidos nucleicos constituyen dos de las moléculas más sorprendentes de los seres vivos: el DNA y el RNA. El DNA es la molécula universal que contiene la información genética de los organismos (Sánchez de Jiménez, 2005) y se encuentra almacenada en el núcleo de las células; el lenguaje en el cual se puede interpretar toda esa información se encuentra codificado por cuatro letras (A, T, G y C), y a toda la información contenida en el DNA de un organismo se le conoce como “genoma”. Dentro del genoma, la información se encuentra organizada en genes; hasta hace poco tiempo el término gen se usaba para referirse a una secuencia de DNA que codifica para una proteína (secuencia codificante), hoy en día usamos el término gen no sólo para las secuencias codificantes, sino también para las secuencias que contienen la información de elementos encargados de regular toda la información genética (RNAs no codificantes, por citar un ejemplo).

Pero, ¿cómo puede esa información ser suficiente para dirigir los procesos que constituyen la vida? La respuesta se encuentra en la acción en conjunto de componentes moleculares, que cooperan en una serie de ingeniosos procesos para llevar esa información depositada en cada uno de nosotros, en nuestro genoma, a la vida (Craig *et al.*, 2010).



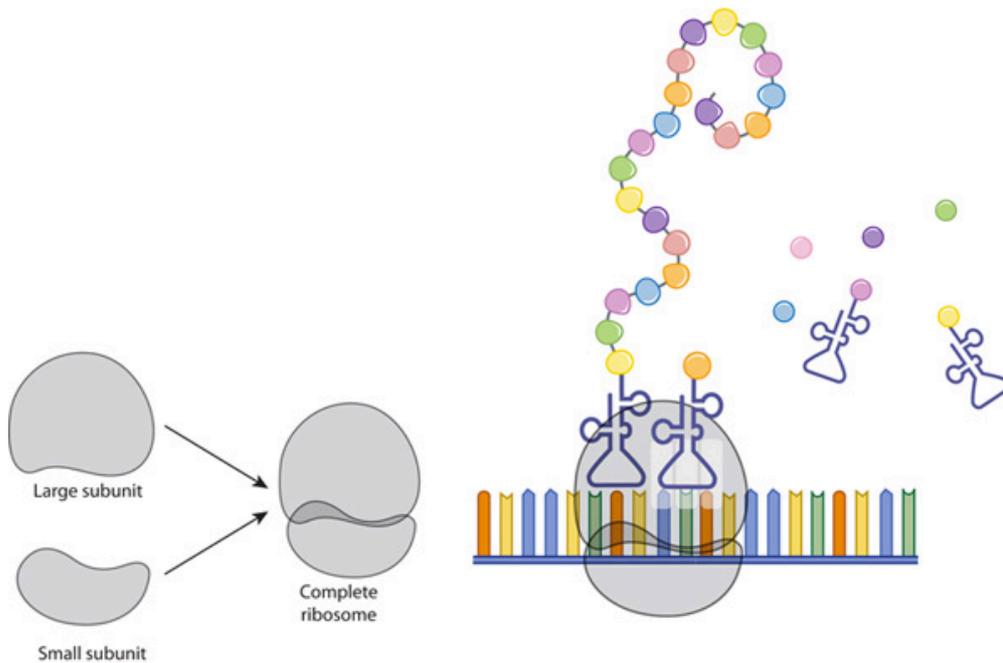
**Figura 12.** Flujo de la información Genética

El Dogma Central de la Biología Molecular establece que el flujo de la información genética es de DNA a RNA y de RNA a Proteína, aunque en algunos casos el flujo puede ser de RNA a DNA (algunos virus pueden formar DNA a partir de RNA) o bien RNA a RNA, siendo el caso de algunos RNAs autocatalíticos (ver Figura 12). El Dogma Central es ciertamente válido en el sentido de que define cómo es posible la formación de proteínas, pero en años recientes se ha hecho evidente que existe mucha más información en el genoma, la cual normalmente es usada para controlar y mantener los procesos de manufactura de proteínas (Perkins, 2005). El flujo de DNA a RNA se lleva a cabo mediante un proceso llamado transcripción (ver Figura 13). El DNA se encuentra en el núcleo y jamás sale de él, por lo



**Figura 13. Transcripción.** La RNA polimerasa (en verde), sintetizando una cadena de RNA complementaria a la cadena molde de DNA. (Tomado de Nature Education © 2010 )

que resulta indispensable tener un mecanismo capaz de llevar la información resguardada en el núcleo hasta los ribosomas, los componentes celulares que funcionan como maquinaria de ensamblaje en la producción de proteínas. El RNA es el encargado de llevar la información desde el núcleo hasta el citoplasma, donde se encuentran los ribosomas; es por eso que al tipo de RNA que realiza esta función se le llama RNA mensajero (mRNA). De esta manera puede iniciar el siguiente nivel de flujo de la información genética, la traducción (ver Figura 14). La traducción es el mecanismo que posibilita la producción de proteínas en el citoplasma de las células. El mRNA es transportado hasta los ribosomas, donde la información contenida en el lenguaje de los ácidos nucleicos se traduce al de proteínas. Dicho de otra manera, la combinación de las cuatro letras del lenguaje de DNA puede producir las 20 letras del lenguaje proteico. Estas 20 letras se refieren a los 20 aminoácidos esenciales para la vida, los cuales son las unidades básicas que constituyen una proteína. Tanto la transcripción como la traducción son mecanismos complejos, donde interactúan una gran cantidad de proteínas que regulan y hacen posible este flujo de información, ya que ninguno de los dos ácidos nucleicos tienen la capacidad de realizar estas funciones por sí solos.



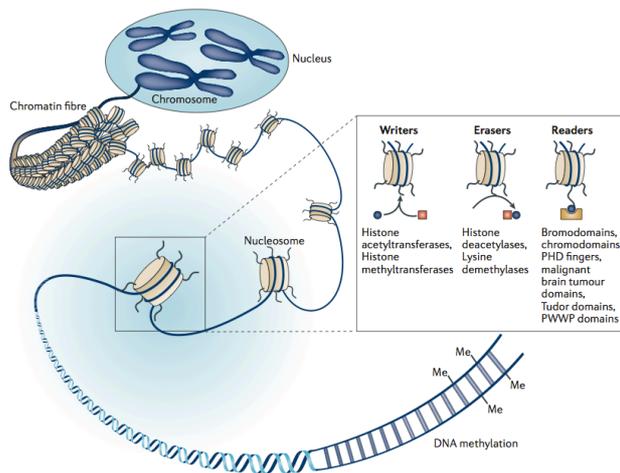
**Figura 14. El ribosoma y la traducción.** Un ribosoma se compone de dos subunidades: La grande y la pequeña. Durante la traducción, las subunidades ribosomales se ensamblan juntas como un “sandwich” sobre la cadena de mRNA, después se procede con la atracción de RNAs de transferencia (tRNA) que cargan los aminoácidos (círculos). Una larga cadena de aminoácidos emerge cada vez que el ribosoma decodifica la secuencia del mRNA; ésta formará un polipéptido, una nueva proteína. (Tomado de Nature Education, © 2010 ).

#### 4. 5 Regulación de la expresión Genética.

Una de las áreas de mayor importancia para comprender el funcionamiento de los seres vivos es la regulación de la expresión de sus genes. Hoy se sabe que la abundancia y distribución del producto final de un gen, es regulado a diferentes niveles y que cada nivel provee una forma de incrementar la diversidad de los mismos. La primera etapa es la transcripción, que en el genoma nuclear es el nivel primario de la regulación génica. Complejos controles superpuestos regulan en que momento y que tanto se transcriben los genes. El transcrito primario debe ser procesado en una gran variedad de maneras para dar un transcrito maduro que se traducirá para formar una proteína. La transcripción es controlada mediante elementos reguladores presentes en y alrededor de cada gen. Los factores de la transcripción pueden cambiar programas enteros de desarrollo, resultando en cambios de identidad de las células y órganos (Kaufmann, 2010).

Adicionalmente, los genes nucleares también son objeto de mecanismos de regulación epigenética, los cuales incluyen expresión de RNAs pequeños, metilación del DNA, variaciones en las proteínas que empaquetan al DNA en cromosomas (histonas), remodelación de la estructura de la cromatina y

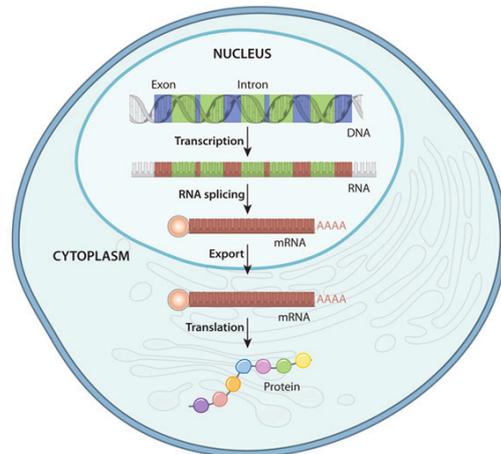
**Figura 15. Modificaciones covalentes en histonas y DNA son la clave de los mecanismos que envuelven la regulación epigenética de la expresión genética.** El DNA es empaquetado en cromatina enrollándolo alrededor de las histonas para formar un nucleosoma. Los nucleosoma son aun más compactados, el grado de compactación depende del tipo de modificaciones presentes en las histonas, especialmente en sus residuos terminales. La acetilación de histonas tiende a descompactar la cromatina y de esta manera puede ser más accesible para la RNA polimerasa y la maquinaria de transcripción, permitiendo la transcripción de los genes que se encuentran cercanos. La metilación de histonas puede activar o reprimir genes, dependiendo del sitio y del grado de metilación (Tomado de Nature Review Mayo 2012. Vol 11: 384-400.)



genética al menos para genes nucleares, estudios durante la última década han revelado que la abundancia y la distribución del producto final de un gen también depende de la regulación postranscripcional, que ocurre a diferentes niveles y provee variedad para incrementar la diversidad del producto de los genes. Después de la transcripción, el transcrito primario puede ser procesado en gran variedad de formas para obtener un transcrito maduro (ver figura 16). La

modificaciones en las colas de las histonas (generalmente sus extremos amino-terminales) como metilación, ubiquitinación y fosforilación (ver Figura 15). Estas modificaciones pueden tener una gran variedad de efectos sobre la transcripción u otros procesos. (Springer, 2013).

Mientras que la transcripción es el nivel predominante de regulación de la expresión

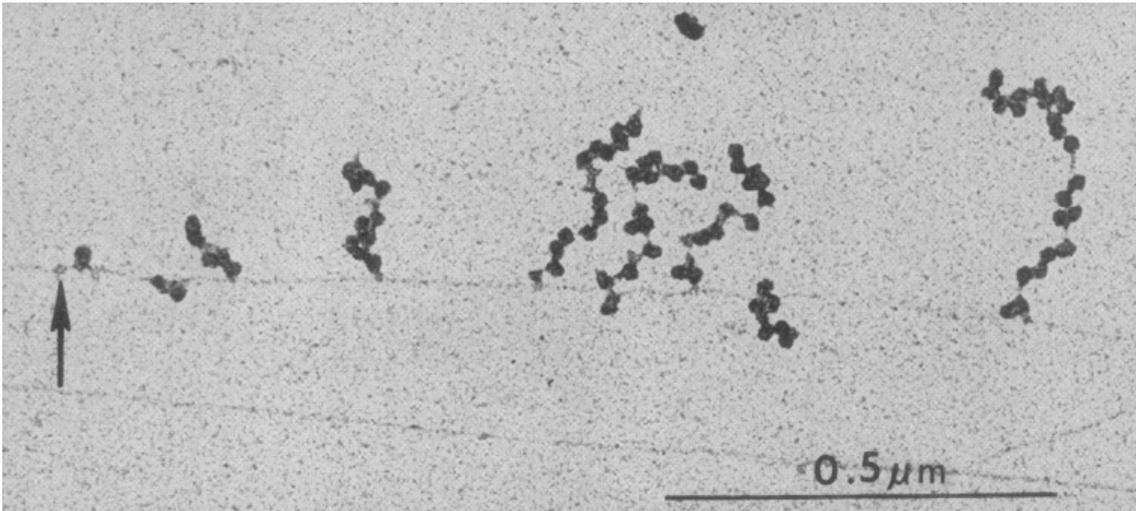


**Figura 16. Regulación y flujo de la información Genética.** Primero, regiones codificantes y no codificantes son transcritas a partir del DNA en un RNA. Algunas regiones son removidas (intrones) durante la fase inicial del procesamiento del mRNA. Los exones remanentes son unidos y la molécula de RNA procesada (en rojo) se prepara para exportarse fuera del núcleo a través de la adición de una modificación llamada cap (esfera naranja) y una cola de poli adeninas (polyA) Una vez en el citoplasma el mRNA puede ser usado para construir una proteína o sufrir más procesos de regulación. (Tomado de Nature Education © 2010)

mayoría de los genes nucleares de las plantas contienen intrones (secuencias no codificantes) que deben ser removidos, y las variaciones en los patrones de *splicing* (corte y empalme de transcritos primarios para remover intrones) pueden producir diferentes tipos de RNA mensajeros (mRNA), llamados variantes de *splicing*, que codifican diferentes proteínas. Un importante nivel que a menudo no se toma en cuenta es la regulación de la estabilidad de mRNA: Los niveles globales de un transcrito dependen de su velocidad de síntesis y degradación, la regulación de la estabilidad de un mRNA y su eficiencia de traducción podrían ser tan importantes como su regulación transcripcional. Una vez que se lleva a cabo la traducción y las proteínas son sintetizadas, éstas se pliegan en conformaciones funcionales y a menudo son químicamente modificadas mediante fosforilación o glicosilación; el plegamiento y las modificaciones son factores determinantes en la estabilidad de la proteína. Al igual que los mRNAs, no sólo depende de su síntesis, sino también de la velocidad de degradación. La regulación postranscripcional de la expresión genética es controlada mediante elementos regulatorios presentes en el transcrito primario y maduro, así como por secuencias de péptidos señalizadores en la proteína. Aunado a esto, existen mecanismos epigenéticos de regulación postranscripcional, a estos mecanismos se les conoce como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) o silenciamiento por RNA. (Twyman, 2003b).

#### **4.6 Polirribosomas, una alternativa para el estudio de la traducción y la regulación postranscripcional**

Un polirribosoma o polisoma consiste en dos o más ribosomas anclados a una cadena de mRNA para traducir la secuencia nucleotídica en la secuencia de aminoácidos correspondiente (Davies & Abe, 1995). Una sola molécula de RNA puede unirse a muchos ribosomas que quedan separados por una distancia mínima de 80 nucleótidos, con lo que se forma un complejo polirribosómico o polisoma (Ross *et al*, 2007). Cada ribosoma de un polisoma sintetiza independientemente una única cadena polipeptídica durante su desplazamiento por la secuencia del RNA mensajero. Por tanto, los mRNAs



**Figura 17. Polirribosomas en formación en un cromosoma de *E. coli*.** (Tomado de Science 1970: 169, 392–395).

tienen una serie de ribosomas que llevan productos proteicos de longitudes crecientes a medida que la síntesis avanza. La cadena polipeptídica que está siendo sintetizada se denomina proteína naciente. El tamaño del polirribosoma depende de una serie de variables. En parte, el tamaño se debe a la longitud del mRNA y a la eficiencia con que los ribosomas traducen el mRNA. Por término medio, en un mRNA eucariótico hay menos de 10 ribosomas unidos simultáneamente (Lewin, 1996). Existen tres fases en la traducción: iniciación, elongación y terminación. La fase de iniciación es un proceso de múltiples pasos en la que el mRNA es reclutado primero a la subunidad menor del ribosoma (40S) y después a la subunidad mayor (60S) para que la elongación de la cadena polipeptídica pueda comenzar (Mustroph, 2009).

Una de las razones iniciales para aislar polirribosomas fue resolver mediante gradientes de sacarosa, el número de ribosomas a lo largo de la extensión de un mRNA (Davies, 1995). La segunda razón, y por la cual se han realizado innumerables protocolos para su aislamiento, se encuentra en la cantidad de información que pueden brindar en el proceso de la traducción y la regulación a nivel traduccional. Esto es debido a que, mediante el aislamiento de las maquinarias traduccionales y específicamente de polirribosomas, se pueden detectar los mRNAs mensajeros que están siendo traducidos activamente. Por otro lado, no todo el mRNA transcrito se traducirá para formar proteínas, por lo

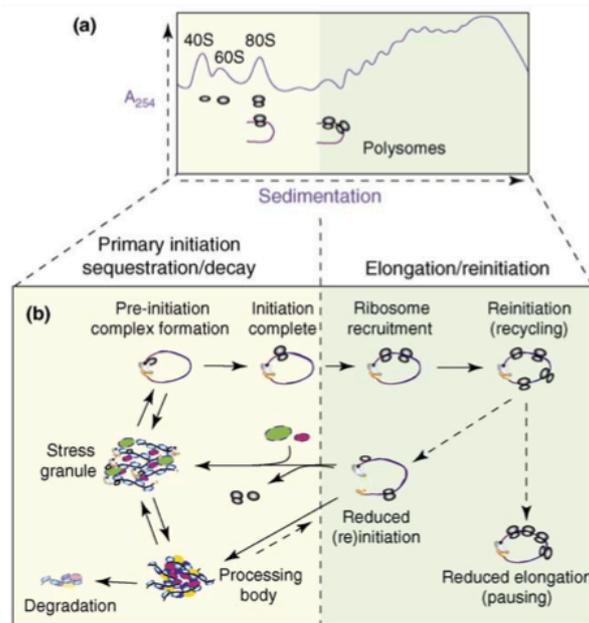
que resulta una herramienta útil en el monitoreo del destino de mRNAs, al menos a nivel traduccional.

Los primeros polirribosomas fueron reportados por Jonathan R. Warner en 1963. Mediante experimentos con reticulocitos de conejo demostró la existencia de estas estructuras (Warner, 1963): se trataba de polirribosomas que se encontraban libres en el citoplasma. Sin embargo, numerosas investigaciones han reportado la existencia de otros tipos de polirribosomas, los cuales se encuentran anclados a membranas celulares o el citoesqueleto. Tres tipos más de polirribosomas han sido aislados y caracterizados (ver Tabla III).

**Tabla III. Polisomas relacionados en la síntesis de proteínas específicas.** (Datos tomados de Davies, 2011).

<b>Polisomas libres</b>	Síntesis de proteínas citoplasmáticas.
<b>Polisomas anclados a la membrana.</b>	Relacionados con la síntesis de proteínas de secreción y proteínas secuestradas en organelos.
<b>Polisomas anclados al citoesqueleto.</b>	Relacionados con la síntesis de proteínas del citoesqueleto, principalmente.
<b>Polisomas anclados al citoesqueleto y membrana.</b>	Parecen tener el papel principal en la síntesis de proteínas de almacenaje, como en las semillas de maíz.

La asociación de un mRNA con el citoesqueleto no sólo intensifica la traducción, sino que permite la migración de los mRNAs (y polisomas) a localizaciones muy específicas. Por ello la localización celular de los polirribosomas determina en gran medida su tasa de traducción, siendo los dos tipos de polirribosomas asociados al citoesqueleto los que poseen una traducción más eficiente. Se cree que el citoesqueleto posee aun más información para obtener instrucciones espaciales que las instrucciones que posee una célula en el DNA.



**Figura 18. mRNPs citoplasmáticos asociados en traducción, secuestro y degradación.** (a) Perfil de absorbancia UV de extractos de rosetas de *Arabidopsis* después de centrifugación en gradiente de sacarosa de 20-60%. Región no polisomal en el gradiente (izquierda) incluye mRNPs, complejo de pre-inicio (43s), monosomas (80s) y complejos monosoma-mRNA. La región polisomal del gradiente (derecha) contiene mRNAs asociados con múltiples ribosomas. (b) Estados de la traducción, almacenaje y degradación. Las líneas punteadas indican alteraciones en la traducción causadas por reducción de la iniciación, reiniciación o elongación. El mRNA puede ser secuestrado en gránulos de estrés o procesado directamente en los cuerpos P, donde puede ocurrir la degradación. (Modificado de Trends in Plant Science, 2009. Vol.14 No.8).

Entretanto, se ha demostrado a partir de numerosos experimentos con diferentes tejidos que menos del 50% del mRNA traducible se encuentra en polisomas, es decir: la mayoría no está en polisomas (Davies, 2011). Por otro lado, se ha observado que existe una acumulación de mRNAs en cuerpos P y gránulos de estrés (se consideran sitios de degradación o almacenaje de mRNAs y proteínas) al inhibir el inicio de la traducción con fármacos, estreses o mutaciones, y la disminución de los mismos al bloquear la traducción a nivel de la elongación de la cadena polipeptídica, manteniendo al mRNA dentro del ribosoma. Para explicar esto, V. Balagopal planteó en 2009 el modelo del “Ciclo del

mRNA”. En él se propone que los mRNAs presentes en los polirribosomas mantienen repetidas rondas de inicio, elongación y terminación de la traducción para producir una proteína; los mRNAs que se encuentran en los polisomas interactúan con proteínas que reprimen el inicio de la traducción, existiendo una competencia enzimática entre los ribosomas y la maquinaria de degradación de mRNAs (ver Figura 18b). El balance entre la tasa de iniciación de la traducción y degradación de mRNAs podría influir en la elongación y terminación de la traducción (Balagopal & Parker, 2009).

Los primeros intentos de aislar polirribosomas de plantas no fueron exitosos, no porque la gran cantidad de fuerza necesaria para fragmentar las paredes celulares causara la ruptura del mRNA, sino por las vacuolas altamente ácidas presentes en las células vegetales que, al fragmentarse convertían el pH del

homogenizado celular (pH 7.5) en un medio óptimo para las enzimas ácidas ribonucleasas (RNAsas) con un pH de 5.0 (Davies, 2011). Los dos principales problemas que pueden ocurrir durante el aislamiento de polirribosomas son la degradación por RNAsas y el secuestro de los polirribosomas por los componentes subcelulares a los cuales se encuentran unidos. El mayor factor que influye en el número de ribosomas por molécula de mRNA son las RNAsas, enzimas difíciles de inhibir muchos protocolos para el aislamiento de polirribosomas son diseñados solamente para prevenir su acción. Las RNAsas causan la conversión de los largos polisomas en unidades aisladas (monosomas). La desagregación puede resultar en una acumulación de monosomas y sólo una pequeña fracción de polisomas. Para esto, Buffers de Tris-HCl altamente alcalinos (pH 8.5) son usados, los cuales mantienen el homogenizado celular a pH 7.5 (Davies, 1995 & 2011). Por otro lado, los polirribosomas pueden ser aislados de material de plantas congelado y se debe pulverizar para pasarse a un *buffer* de extracción altamente alcalino con inhibidores de RNAsas (heparina). El *buffer* debe contener  $MgCl_2$ , para estabilizar las subunidades del ribosoma e inhibidores de la traducción, como la ciclohexamida. También son usados detergentes iónicos para romper la asociación de los ribosomas con las membranas y el citoesqueleto; los extractos son centrifugados para remover los residuos celulares y el sobrenadante se ultracentrifuga en colchón de sacarosa para enriquecerlo en subunidades ribosomales, ribosomas y polirribosomas. Estos complejos ribosomales son fraccionados mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa. El gradiente de sacarosa es bombeado a través de un detector UV (254nm) y fraccionado en 12-18 fracciones de igual volumen, éstas pueden ser usadas para evaluar un mRNA de interés en las fracciones que contienen polirribosomas, monosomas (80S) o complejos de menor densidad.

El análisis se puede extender colectando dichas fracciones y purificando el RNA y/o proteínas que contienen para utilizarlas en diversos ensayos de tipo Northern blot, Western blot y RT-PCR, entre otros. Además, mediante esta técnica, se ha demostrado la presencia de miRNAs y mRNAs en fracciones polisomales de diferentes animales y la planta *A. thaliana*, lo que se ha usado como evidencia de su implicación en la inhibición traduccional a través de

diversos mecanismos los cuales siguen en debate. En particular, con dicha metodología es posible identificar miRNAs asociados específicamente con la maquinaria de traducción y su consecuente función como inhibidores de la traducción de los mRNAs en polisomas (Velarde, 2012).

## 4.7 Silenciamiento Génico Postranscripcional (PTGS) y RNAs no codificantes (ncRNA)

### 4.7.1 Generalidades

Los RNAs no codificantes (ncRNAs), son RNAs transcritos que no codifican para una proteína y sin embargo pueden estar relacionados con funciones estructurales, catalíticas o regulatorias (Eddy, 2001). Por muchos años, los ncRNAs fueron considerados reliquias del origen de la vida. Sin embargo, entre más y más ncRNAs fueron descubiertos, comenzó a ser claro que muchos de ellos mostraban roles biológicos altamente especializados y no solamente eran un tipo de moléculas fósiles. (Bonnet, Van de Peer, & Rouzé, 2006).

En 1990, Alexander R. Van der Krol y colaboradores, en un intento de sobreexpresar la actividad del gen de la charcona sintetasa (CHS) –enzima relacionada con la producción de pigmentos específicos– a través de diferentes construcciones, transformaron plantas con el gen de la CHS para producir la sobreexpresión y el aumento en la pigmentación. Inesperadamente, la pigmentación de las flores no se intensificó; al contrario, algunas plantas perdían completamente la pigmentación en las flores y otras mostraban baja pigmentación o irregular. Encontraron que, a pesar de que la copia extra del



**Figura 19. Fenotipo de las flores transformantes que sobreexpresan el gen de la charcona sintasa (CHS)** Evaluación del efecto del incremento en la expresión de genes relacionados con la pigmentación de las flores. Alrededor de un cuarto de las flores transformantes mostraron un reducido nivel de pigmentación en las flores (Modificado de *The Plant Cell*, 1990. Vol. 2: 291-299).

transgén estuviera presente, los niveles de mRNA de CHS se encontraban fuertemente reducidos en los sectores blancos de la flor (ver Figura 19). Esto indicaba que no sólo los transgenes introducidos se encontraban inactivos, sino que el gen endógeno también había sido afectado. A este fenómeno se le llamó “cosupresión”, posteriormente fue renombrado como Silenciamiento Génico Postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés: PostTranscriptional Gene Silencing) (Campbell & Choy, 2005; Bucher & Prins, 2006). Poco tiempo después, un gran número de experimentos revelaron que existe una compleja relación entre la PTGS y la resistencia a la infección viral de las plantas, puesto que los virus pueden ser blancos, inductores o inhibidores de la PTGS (Vaucheret *et al*, 2001).

En 1997, un mecanismo relacionado al PTGS fue identificado en modelos animales, se le designó como silenciamiento de RNA o RNA de interferencia (RNAi); un año más tarde fue encontrada la molécula clave de este proceso. Un estudio realizado en *C. elegans* reveló que RNAs largos de doble cadena (dsRNA), con secuencia específica homóloga a un gen endógeno, conferían silenciamiento efectivo a ese mismo gen endógeno (Saito, Miyoshi, Siomi & Siomi, 2010; Chen, 2009). Además,

estudios posteriores demostraron que tanto un dsRNA introducido como un transgén pueden llevar a cabo el silenciamiento del gen homólogo en plantas, lo que sugería que el PTGS y el RNAi eran mecanismos similares. (Vaucheret *et al*, 2001).



**Figura 20. RNAs pequeños. “El big Bang de la Biología”.** (Tomado de The Economist Junio 2007).

Pero, ¿cuál era el mecanismo por el cual los dsRNA podían inducir el silenciamiento génico? ¿Cómo se explicaba el silenciamiento de transgenes y genes endógenos? La respuesta no tardó mucho tiempo. En 1999, Hamilton y Baulcome encontraron que durante el proceso de

RNAi, existían RNAs con una longitud de 20-25 nucleótidos. Estos pequeños RNAs no eran productos de degradación: eran producidos a partir de dsRNAs y guiaban el corte de mRNAs blancos complementarios a su secuencia nucleotídica (Chen, 2009). Significativas acumulaciones de RNAs de estas longitudes fueron observados en varios sistemas de PTGS en plantas; se les llamó RNAs pequeños de interferencia o siRNAs (Vaucheret *et al.*, 2001). Rápidamente, los siRNAs cautivaron al mundo de la ciencia: brindaron nuevas herramientas genéticas para organismos modelo y nuevas explicaciones para las interacciones en la regulación genética. Generaron una discusión sin precedentes en muchas publicaciones científicas y populares; la revista de negocios *The Economist*, en su portada de Junio de 2007, proclamó que los siRNAs eran “El Big-Bang de la Biología” (ver Figura 20; Matranga & Zamore, 2007).

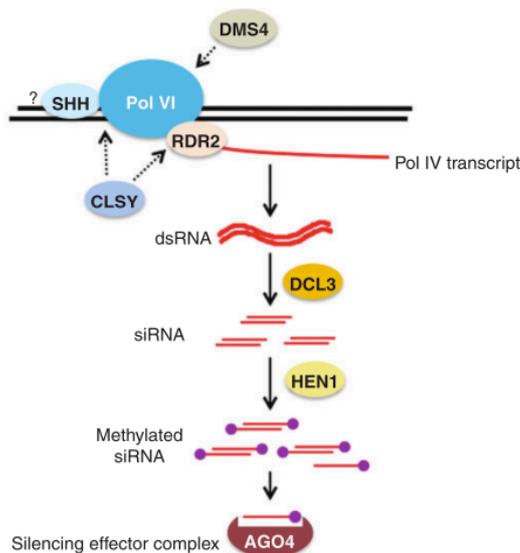
#### 4.7.2 RNAs pequeños (sRNAs)

Los RNAs pequeños (sRNAs), son generalmente definidos como RNAs que silencian transcritos específicos de mRNA. Durante las últimas dos décadas, diferentes clases de sRNAs han sido descubiertas en genomas eucariontes. En plantas, los mecanismos basados en sRNAs se relacionan con la estabilidad del genoma, la expresión genética y la defensa contra material genético exógeno (Bonnet, Van de Peer, & Rouzé, 2006). El fenómeno de silenciamiento de RNA por RNAs pequeños en plantas se compone por cuatro pasos: 1) Inducción por un RNA de doble cadena (dsRNA) o cadena sencilla (ssRNA), 2) Procesamiento del dsRNA o ssRNA en RNAs pequeños (sRNAs) de 18-25 nucleótidos, 3) Metilación del extremo 3' del sRNA (3'-O-metilación) y 4) Incorporación del sRNA dentro de complejos efectores, para asociarse mediante una completa o parcial complementariedad al RNA blanco (Voinnet, 2009).

Existen muchos tipos de RNAs pequeños; sin embargo, en plantas los dos tipos principales de RNAs pequeños son: microRNAs (miRNAs) y RNAs pequeños de interferencia (siRNAs); los cuales se distinguen por sus diferentes mecanismos de biogénesis. (Chen, 2009).

### 4.7.2.1 Biogénesis de siRNAs

Los siRNAs son generados de dsRNAs largos, que usualmente dan origen a múltiples especies de siRNAs a partir de ambas cadenas. En plantas, la Polimerasa IV (Pol IV) es la responsable de la producción del 90% de los siRNAs endógenos, los cuales tienden a originarse de regiones pericentroméricas, elementos transponibles y secuencias repetidas. Por otro lado, las RNAs polimerasas dependientes de RNA (RdRPs) usan RNAs de



**Figura 21. Biogénesis de siRNAs a partir de un RNA transcrito de cadena sencilla.** El transcrito producido por Pol IV es copiado por RDR2 para formar un dsRNA inmediatamente después de la transcripción. El dsRNA es cortado en siRNAs de 24 nucleótidos por DCL3. A continuación Hua Enhancer1 (HEN1) agrega un grupo metilo (círculo morado) en los extremos 3' de los siRNAs. Una de las dos cadenas de siRNAs metilados es cargada dentro de la proteína Argonauta4 (AGO4) para formar el complejo efector. (Modificado de Plant & Cell Physiology. 53(5): 766-784; 2012)

cadena sencilla como molde para generar dsRNAs, los cuales son procesados en siRNAs. En *Arabidopsis* los genes RDR; RDR1, RDR2 y RDR6 han sido relacionados en la biogénesis de los siRNAs de virus en plantas. MOP1, el ortólogo de RDR2 en maíz, es requerido para la producción de siRNAs de 24 nucleótidos (ver Figura 21) y para la paramutación, un fenómeno en el que un alelo conduce a silenciamiento heredable del mismo locus (Chen, 2009).

En plantas, el procesamiento de los dsRNAs o ssRNAs para producir sRNAs lo realizan enzimas RNAsas denominadas Dicer like (DCL) por su homología con Dicer, las

enzimas encontradas en mamíferos responsables de la biogénesis de RNAs pequeños (Finnegan & Matzke, 2003). Las DCL son enzimas endonucleasas (RNAsas Tipo III) que actúan sobre dsRNAs para producir dúplex de RNAs pequeños (RNAs pequeños de doble cadena) con 2 o 3 nucleótidos sobresalientes en cada cadena en el extremo 3'. DCL3 produce siRNAs de 24 nucleótidos en loci heterocromáticos, otras proteínas DCL pueden procesar los dsRNAs en siRNAs de 21 y 22 nucleotidos (Chen, 2009).

#### 4.7.2.2 Biogénesis de miRNAs

Los miRNAs derivan de precursores de RNA de cadena sencilla (ssRNA) con estructuras en horquilla, se originan a partir de los genes *MIR*. Los miRNAs realmente son muy pequeños: sólo tienen de 16-29 nucleótidos (nt) de largo, aunque la mayoría tienen de 21-23 nt de largo (Sun, 2009). Los miRNAs son generalmente transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II; ver Figura 22); sin embargo, algunos miRNAs pueden ser transcritos por la RNA Pol III. El transcrito inicial de miRNA es comúnmente llamado miRNA primario (pri-miRNA). La RNA Pol II genera pri-miRNAs como un transcrito normal maduro (con cap y poliadenilado) (Bonnet, Van de Peer, & Rouzé, 2006). Después de que el pri-miRNA es transcrito, una proteína de unión a RNA llamada DAWDLE (DDL), se une al pri-miRNA, probablemente para estabilizar el transcrito y protegerlo de la degradación; además de intensificar la conversión del pri-miRNA en un precursor de microRNA (pre-miRNA) y, su subsecuente conversión en un miRNA maduro. Posteriormente, la enzima Dicer like 1 (DCL1) corta los extremos mal apareados del pri-miRNA para generar un pri-miRNA con una estructura secundaria de tallo-asa (Sun, 2012). En este proceso, son necesarias interacciones físicas entre varias enzimas, incluyendo la proteína de unión a RNA de doble cadena HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1); SERRATE (SE), una proteína con estructura de dedo de zinc; el complejo de unión a cap (CBC) y una enzima DCL (Mateos, Bologna, & Palatnik, 2011). Los dos pasos de procesamiento en la biogénesis de miRNAs son realizados en su mayoría por DCL1, mientras que algunos miRNAs evolutivamente jóvenes (poco conservados entre especies), son generados por DCL4 (Bonnet, Van de Peer, & Rouzé, 2006). Hasta ahora, no se tiene claro cómo los pre-miRNAs adquieren su estructura secundaria, sin embargo es una de sus características importantes. Una vez que se ha procesado el pri-miRNA, el pre-miRNA es cortado por DCL1 y HYL1 en dúplex de miRNA/miRNA\*; estos dúplex tienen dos nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' de cada cadena y pueden ser fácilmente degradados por una exonucleasa llamada SDN (por sus siglas en inglés: Small RNA Degrading Nuclease). Para estabilizar el dúplex, una metiltransferasa de RNA llamada HEN1 (por sus siglas en inglés: Hua Enhancer1) metila inmediatamente los nucleótidos terminales 3' de cada

cadena del dúplex para prevenir su uridilación y su posterior degradación. Después, el dúplex de miRNA/miRNA\* es transportado del núcleo al citoplasma

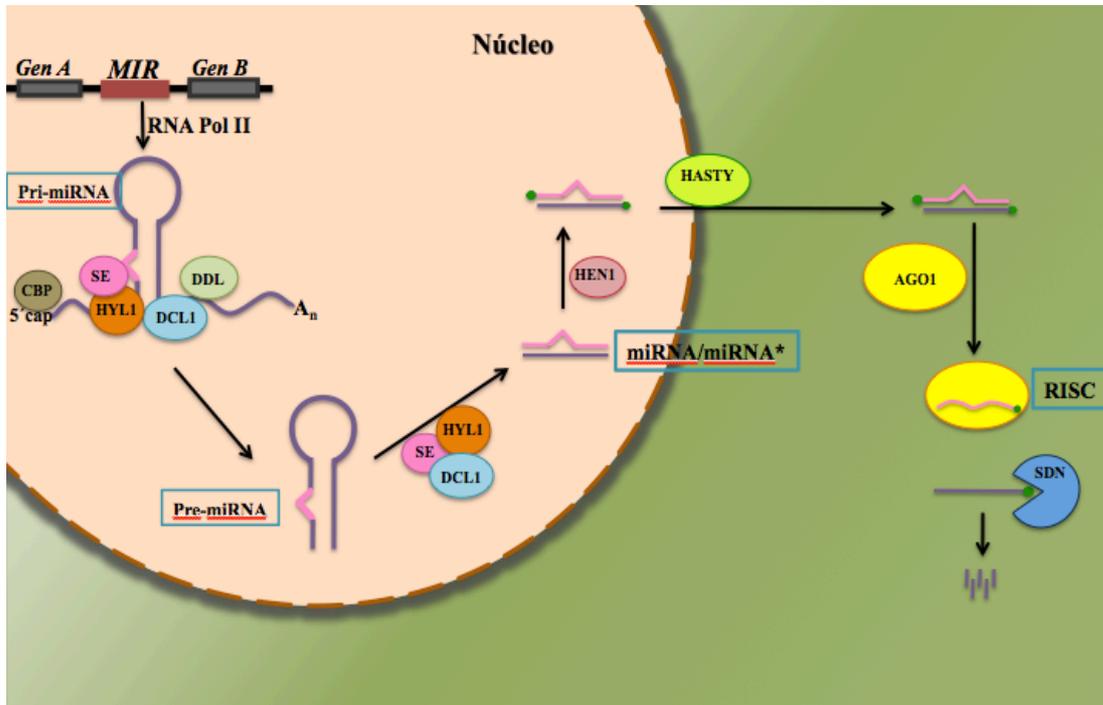


Figura 22. Biogénesis de microRNAs.

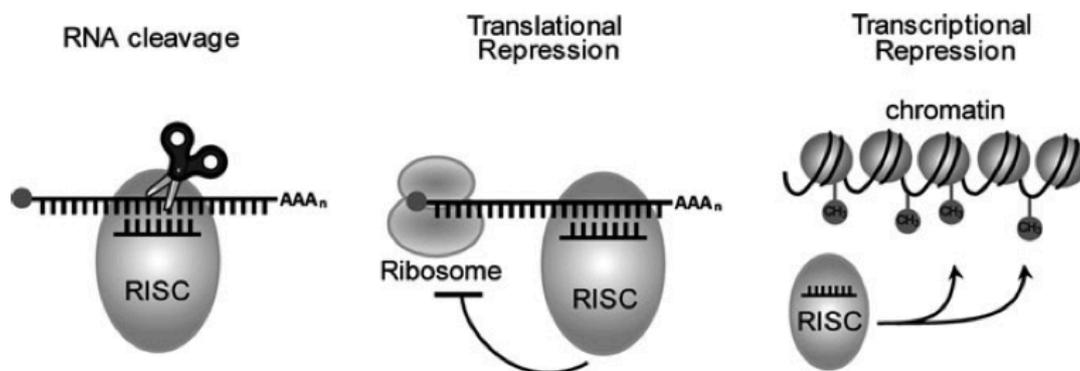
por una proteína llamada HASTY a través de un poro nuclear en forma dependiente de ATP. En el citoplasma, el dúplex de miRNA/miRNA\* es separado. La cadena miRNA\* es degradada por un mecanismo aún desconocido. (Sun, 2012).

#### 4.7.2.3 Incorporación del sRNA dentro de complejos efectores.

Los RNAs pequeños se unen invariablemente a una proteína argonauta (AGO); miembros de una conservada familia de proteínas encontradas en bacterias, arqueas, hongos, plantas y animales. El complejo RNA-proteína comúnmente denominado RISC (por sus siglas en inglés: RNA-Induced Silencing Complex); consiste en un RNA pequeño de cadena sencilla, una proteína AGO específica y otras proteínas interactoras, cuyo papel en el complejo aún no es muy claro. Las proteínas argonautas contienen tres dominios funcionales: PAZ, MID y PIWI. El dominio PAZ une el segundo nucleótido sobresaliente del dúplex de

sRNA y se presume que es importante en el cargado del dúplex de sRNA dentro de la proteína (el dúplex es separado y sólo una cadena es retenida dentro de RISC). La interfase de los dominios PIWI y MID presenta un bolsillo de unión que ancla el extremo 5' de la cadena sencilla del sRNA. El dominio PIWI adopta un plegamiento similar al de una RNasa H, lo cual le confiere una actividad endonucleolítica (actividad de corte), este dominio es el responsable del corte del mRNA blanco unido al sRNA durante el silenciamiento del RNA. Entre las 10 proteínas argonautas (AGO) identificadas en *Arabidopsis*; AGO1, AGO4, AGO6, AGO7 y AGO10 han sido relacionadas funcionalmente con sRNAs. AGO1 se une a la gran mayoría de los miRNAs, posee actividad de corte y media las funciones de estos RNAs pequeños *in vivo*. AGO1 y AGO10 se encuentran también implicadas en la represión traduccional de mRNAs blancos de miRNAs. AGO4 y AGO6 actúan con siRNAs en el silenciamiento de transposones y secuencias repetidas. (Bonnet, Van de Peer, & Rouzé, 2006).

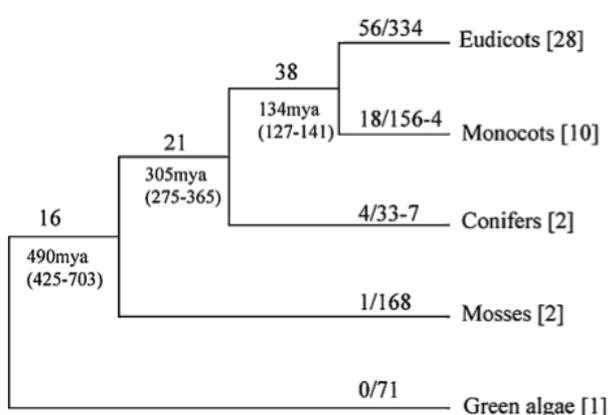
El sistema de silenciamiento genético por RNAs pequeños es un sistema en el cual el sRNA es guiado y requiere a AGO para la actividad enzimática; la proteína no tiene la secuencia específica necesaria para catalizar el silenciamiento del RNA blanco, la especificidad de la secuencia se consigue mediante el sRNA del complejo RISC (Saito, Miyoshi, Siomi, & Siomi, 2010; Chen, 2009). Una vez que el complejo RISC es ensamblado, éste realiza la



**Figura 23. Mecanismos de silenciamiento génico por RNAs pequeños.** Los RNAs pequeños se encuentran unidos a una proteína argonauta, ensamblando un complejo de inducción del silenciamiento por RNA (RISC). Para al actividad del silenciamiento, RISC puede (1) Realizar un corte endonucleolítico al mRNA blanco, (2) Reprimir la traducción del mRNA, o (3) Reprimir la transcripción del gen blanco a través de modificaciones en la cromatina, que incluyen metilación del DNA y modificaciones de histonas. (Tomada de *Plant Genome Diversity*, Vol. 1, 2012, 81p.)

búsqueda de transcritos blancos, los cuales tienen una complementariedad de bases con el sRNA del complejo y, al encontrar un transcrito blanco, se lleva a cabo la actividad de silenciamiento por uno de tres mecanismos: escisión del mRNA blanco, represión traduccional o represión transcripcional mediante la metilación del DNA o modificaciones de histonas (ver Figura 23). La función de silenciamiento de los miRNAs es solamente a través de la escisión del mRNA y su represión traduccional (eventos a nivel Postranscripcional), mientras que los siRNAs funcionan principalmente a través de la represión transcripcional. (Lee, Li & Meyers, 2012).

#### 4.7.3.1 Importancia, abundancia y Evolución de MicroRNAs.



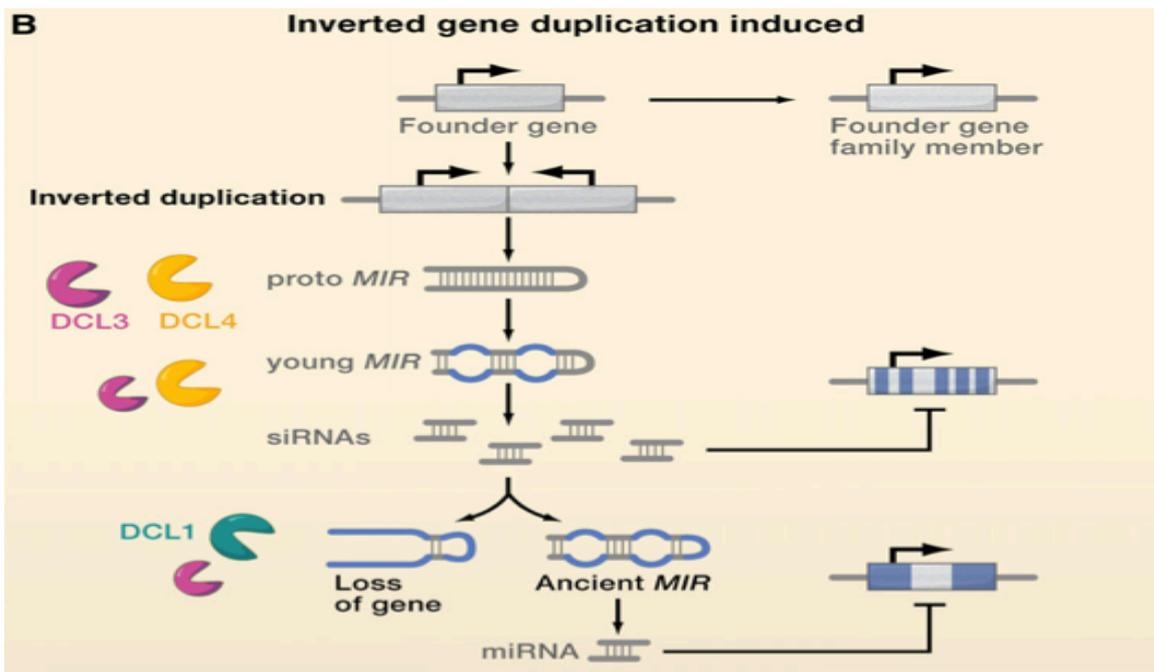
**Figura 24. Familias conservadas de miRNAs en plantas y grupos de miRNAs específicos de alguna especie.** El orden divergente de las especies de plantas se muestra en el árbol esquemático. Los números debajo de las ramas muestran el tiempo estimado de divergencia de cada grupo. Los números entre paréntesis indican el rango de tiempo publicado para cada nodo. Los números por encima de las ramas indican el número estimado de miRNAs del grupo (antes de la barra) y, el número de miRNAs específicos para cada especie (después de la barra). El número por encima de las ramas interiores indica el número de familias de miRNAs conservadas. (Tomada de Plant. Mol. Biol. 2012. 80: 17-36).

Los MicroRNAs representan una extensa clase de RNAs pequeños no codificantes endógenos que regulan negativamente la expresión de genes a nivel Postranscripcional. Los miRNAs se han encontrado presentes en plantas, animales, hongos y algunos virus, están involucrados en la regulación de casi todos los procesos biológicos y metabólicos, como el mantenimiento y diferenciación de células pluripotenciales, el desarrollo de órganos, vías de señalización, enfermedades y respuesta al estrés ambiental. De acuerdo a la base de datos de

miRNAs, hasta junio de 2013, cerca de 4,363 miRNAs han sido identificados y depositados en la base de datos. La mayoría de estos miRNAs han sido validados utilizando diferentes herramientas experimentales, incluyendo

secuenciación masiva, ensayos de *Northern blot* y PCR cuantitativo (qRT-PCR). Los 4,363 miRNAs fueron encontrados en 55 especies de plantas. Existen 10 especies con más de 100 miRNAs identificados, como el arroz (*Oryza sativa*), la soya (*Glycine max*), *Arabidopsis lyrata*, el maíz (*Zea mays*), entre otros. El 69% de los miRNAs identificados en plantas se han obtenido de estas 10 especies. Numerosas investigaciones indican que muchas familias de miRNAs se encuentran evolutivamente conservadas a lo largo de los linajes en las plantas. Esto sugiere que la regulación de la expresión genética por miRNAs parece haber existido en las etapas tempranas de la evolución de las plantas, y ha sido fuertemente limitada (funcionalmente) por más de 425 millones de años (ver Figura 24). El origen de los miRNAs en plantas incluye dos aspectos: el origen del primer miRNA y el origen de los miRNAs recién evolucionados (Sun, 2012).

La mayoría de los genes *MIR* en plantas son intergénicos, y raramente se



**Figura 25. Origen de los miRNAs en plantas.** Evolución de un gen *MIR* a través de un evento de inversión y duplicación de un gen. En este modelo se propone que inicialmente se genera un dsRNA con perfecta complementariedad, el cual es procesado por DCL3 y DCL4 para generar poblaciones de siRNAs (proto-*MIR*). La estructura de tallo-asa eventualmente acumula mutaciones (en azul) que contribuyen al acortamiento y la ganancia de bucles en la estructura del dsRNA. Esto da como resultado un *MIR* joven que será cortado principalmente por DCL4, produciendo ta-siRNAs. Uno de estos siRNAs puede ser beneficiado por la selección natural a través del hecho evolutivo de que un gen duplicado inicialmente es generado para la proliferación del gen fundador. La ausencia de selección puede resultar en deriva génica, por lo que el *MIR* joven puede perderse eventualmente. Una continua selección puede convertir a un *MIR* joven en un *MIR* ancestral en el que los bucles y la estructura tallo-asa son ahora compatibles para el procesamiento por DCL1 en una sola molécula de miRNA (Voinnet, 2009). (Modificada de Cell, 2009. Vol.136, 669-687)

encuentran organizados en tándem. Muchos genes *MIR* conservados se encuentran altamente expresados, mientras que aquellos genes *MIR* recién evolucionados presentan una expresión más moderada. Algunas familias de miRNAs se encuentran altamente conservadas entre especies, pudiendo indicar que tienen un origen muy ancestral. Estas familias incluyen a la de miRNA-160 (miR-160), miRNA 156 (miR-156), miRNA 319 (miR-319) y miRNA 390 (miR-390); de las cuales, todas regulan factores de la transcripción ancestrales relacionados con funciones básicas del meristemo, polaridad y separación de los órganos, división celular o control hormonal. Los precursores de estos miRNAs, han mostrando gran similitud en su secuencia nucleotídica con sus genes blanco, sugiriendo que fueron generados en eventos de inversión y duplicación de genes (ver Figura 25). El origen de los miRNAs no sólo se centra en los genes *MIR*, sino también en el conjunto de sistemas de procesamiento y el conjunto de redes regulatorias de las cuales se originan. Los múltiples pasos de procesamiento durante la biogénesis de miRNAs, la complejidad de las redes de regulación genética donde los miRNAs actúan directamente y la conservación de componentes importantes como DCL y AGO hacen difícil creer que los miRNAs se originaron en más de una ocasión en la historia evolutiva. (Sun, 2012).

#### **4.7.3.2 Relación entre microRNAs y sus mRNAs blanco**

En plantas, la mayoría de los miRNAs presentan una perfecta o casi perfecta complementariedad con sus mRNAs blancos. Experimentos directos han validado que alrededor de 100 mRNAs son escindidos por un miRNA endógeno y una proteína argonauta (Flynt & Lai, 2008). La mayoría de las interacciones entre un miRNA y sus mRNAs blanco, tienen como resultado la reducción de los niveles del transcrito blanco mediante el corte mediado por el complejo mi-RISC. Las metodologías actuales para la identificación de mRNAs blanco de miRNAs están basadas principalmente en predicciones computacionales; posteriormente, se debe realizar la validación de los mRNAs blancos experimentalmente (Sun *et al*, 2011). Las primeras validaciones de blancos de miRNAs fueron reportadas en plantas. Se establecieron dos aproximaciones

experimentales para estas validaciones: La visualización directa del corte de los mRNAs blancos *in Vitro* y la clonación de el producto del corte *in vivo* mediante 3' o 5'RACE-PCR (Amplificación rápida de los extremos de cDNA, acoplada a una PCR) (Tang *et al*, 2008).

#### 4.7.3.3 Represión traduccional mediada por miRNAs

Adicionalmente al mecanismo de corte de mRNAs, los miRNAs en plantas pueden inhibir directamente la traducción de mRNAs blancos altamente complementarios, sugiriendo la posibilidad de una regulación reversible (Brodersen *et al.*, 2008). Para la validación de mRNAs blancos donde se reprime la tasa de traducción mediante el complejo mi-RISC, es necesario realizar la validación a nivel proteico (ver Tabla IV). Detectando los cambios en

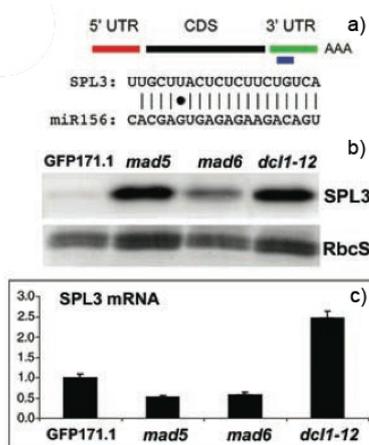
**Tabla IV. miRNAs validados que reprimen traduccionalmente sus mRNAs blancos.** (Tomado de Translational Inhibition by MicroRNAs in Plants. *miRNA Regulation of the Translational Machinery*, Progress in Molecular and Subcellular Biology 50, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010).

<b>MicroRNA</b>	<b>mRNA blanco</b>	<b>Blancos regulados a través de la inhibición traduccional</b>	<b>Función</b>
<b>miR172</b>	<b>Factor de transcripción AP2</b>	<b>AP2, TOE1</b>	<b>Patrón de floración e inicio de floración</b>
<b>miR156/157</b>	<b>Factor de transcripción SPL</b>	<b>SPL3</b>	<b>Inicio de floración</b>
<b>miR398</b>	<b>COX5b.1, CSD1, CSD2</b>	<b>CSD1, CSD2</b>	<b>Estres oxidativo</b>
<b>miR171</b>	<b>Factor de Transcripción SCL</b>	<b>SCL6-IV</b>	<b>Desconocido</b>
<b>miR834</b>	<b>CIP4</b>	<b>CIP4</b>	<b>Regulador positivo de morfogénesis</b>

AP2 APETALA 2; SPL, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE; COX5b.1 Subunidad 5b.1 de citocromo oxidasa; CSD SÚPER ÓXIDO DISMUTASA DE COBRE; SCL SCARECROW-LIKE; CIP4 COP1- INTERACTIVE PARTNER

la expresión de la proteína codificada por los mRNAs blancos se pueden detectar utilizando anticuerpos específicos. Alternativamente, para validar la represión traduccional mediada por miRNAs, genes reporteros son a menudo fusionados con la región 3'UTR (por sus siglas en ingles, 3' Untranslated Region) del mRNA blanco (Tang *et al*, 2008).

El primer miRNA observado en plantas que actuaba a través de la represión traduccional fue miR172, el cual se encuentra presente en dicotiledóneas y monocotiledóneas incluyendo *Arabidopsis*, arroz y otras. miR172 juega un papel importante durante el tiempo de floración y la morfología de la flor. La sobreexpresión de miR172 reprime la expresión de una clase de factores de la transcripción APETALA2 (AP2)-like (Yu & Wang, 2010). En plantas, la represión traduccional mediada por miR172 ha mostrado que regula el patrón y tiempo de floración, provocando una floración temprana y disrupciones en la



**Figura 26.** Análisis de mRNA y proteína SPL3, blanco de miR156 en mutantes de *Arabidopsis*. a) Ubicación del sitio de complementariedad de miR156 y su mRNA blanco SPL3. b) Análisis de Western blot de la proteína SPL3 en diferentes mutantes de *Arabidopsis*. c) RT-PCR en tiempo real del mRNA blanco de miR156, SPL3. (Tomado de SCIENCE, Vol. 320; 2008)

identidad de los órganos florales (Zhang *et al*, 2005). Aunado a esto, en maíz, la

sobreexpresión de miR156 reduce los niveles de miR172, lo que sugiere que podrían actuar coordinadamente en las transiciones vegetativa y floral (Chen, 2009). En maíz, el blanco de miR172 es *glossy15*, un gen que promueve la identidad de las hojas jóvenes y sólo se encuentra en éstas; se propone que miR172 inhibe la expresión de

*glossy15* en las hojas adultas para promover el cambio de fase vegetativa (Chen, 2005). miR156 es una familia de miRNAs en plantas altamente conservada, la cual ha mostrado tener función como inhibidor traduccional. Los mRNAs blancos de miR156 son una clase de factores de la transcripción específicos: SQUAMOSA

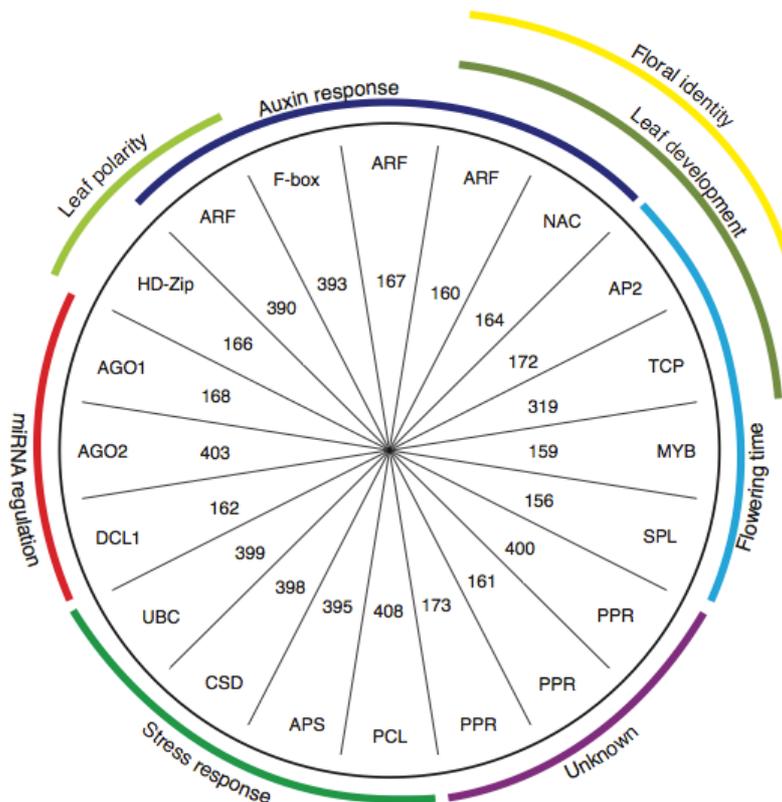
PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), los cuales contienen un dominio de unión al DNA altamente conservado. De los 17 genes SPL, 11 han sido predichos como blancos de miR156. SPL3, contiene un sitio de unión a miR156 en la región 3'UTR (ver Figura 26), es miembro de una familia de genes con funciones en la inducción floral, la sobreexpresión de SPL3 conduce a un fenotipo con temprana floración. Algunos estudios han sugerido que miR156/157 regula la expresión de SPL3 a través del corte endonucleolítico, debido a que la sobreexpresión de miR156 disminuye los niveles de el mRNA de SPL3; además, los niveles de transcritos de SPL3 se ven incrementados en *dcl-12* y *hasty*; las cuales son mutantes conocidas en *Arabidopsis*, deficientes

en la vía de biogénesis de miRNAs (ver Figura 26). Sin embargo, evidencia reciente sugiere que miR156 también reprime la expresión de SPL3 a nivel traduccional. La sobreexpresión de un transgen SPL3 resistente a la acción de miR156, produce niveles considerables de transcritos de SPL3, pero sólo los transcritos resistentes a miR156 generan niveles detectables de proteína de SPL3. Adicionalmente, en la mutante *mad5* de Arabidopsis, (deficiente del mecanismo de inhibición traduccional mediado por miRNA), los niveles de proteína SPL3 se incrementan dramáticamente, mientras que los niveles de mRNA de SPL3 se encuentran ligeramente disminuidos (ver Figura 26), sugiriendo que miR156 regula negativamente la traducción. En conjunto, todos estos resultados sugieren que miR156 es capaz de regular la expresión de SPL3 a través de el corte endonucleolítico y la represión traduccional.

El último miRNA dentro del grupo que se conoce que ejerce el mecanismo de represión traduccional es miR398, representa una clase de miRNAs conservado en angiospermas y ha mostrado un funcionamiento a través de la represión traduccional. En Arabidopsis, miR398 reconoce dos genes de *SUPER OXIDO DISMUTASA DE COBRE* (*CSD*, por sus siglas en ingles “*COPPER SUPEROXIDE DISMUTASE*”), *CSD1* y *CSD2*, y un gen de *CITOCROMO OXIDASA 5b.1* (*COX5b.1*). La función de *CSD1* y *CSD2* es la protección de las plantas de estrés oxidativo, a través de la neutralización de los radicales superóxido liberando una molécula de oxígeno y una de peróxido de hidrógeno. Sus funciones requieren cobre como cofactor esencial. Muchos estudios han sugerido que miR398 regula a *CSD1* y *CSD2* en respuesta al estrés oxidativo o a la disponibilidad de cobre. Se ha observado que los niveles de miR398 son regulados positivamente por sacarosa. El azúcar es capaz de inhibir la fotosíntesis, lo cual produce especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente, los niveles de miR398 se reducen mediante suplementación con cobre y se incrementan en condiciones de limitación de cobre, sugiriendo que el cobre regula los niveles de *CSD1* y *CSD2* a través de la regulación mediada por miR398. De manera parecida a miR156; miR398 regula a *CSD1* y *CSD2* a través de los mecanismo de corte endonucleolítico y represión traduccional. La sobreexpresión de miR398 resulta en una reducción dramática de los niveles de proteína de *CSD1* y *CSD2*, indicando que miR398 regula a través de la inhibición traduccional. Consistentemente con estos resultados, las

mutantes *mad* deficientes en la regulación por miRNAs mediante la represión traduccional, muestran un incremento en los niveles de proteína de CSD1 y CSD2 sin cambios significativos en los niveles de mRNA de *CSD1* y *CSD2*. Además, la sobreexpresión de miR398 disminuye los niveles de mRNA de *CSD1* y *CSD2* indicando que miR398 también ejerce su función a través del corte endonucleolítico. Interesantemente, la introducción de transgenes de *CSD1* y *CSD2* con el sitio de unión a miR398 alterado, incrementan la acumulación de mRNAs, pero no proteínas de *CSD1* y *CSD2*, indicando que la alteración de la complementariedad del sitio de unión a miRNA puede cambiar el mecanismo de corte endonucleolítico a represión traduccional (Yu & Wang, 2010).

Con base en toda esta evidencia, se ha establecido que la represión traduccional es un mecanismo activo y común en los miRNAs de plantas, aunque muchos aspectos de la represión traduccional aun no son claros. Se ha propuesto que la complementariedad entre los miRNAs y su mRNAs blanco



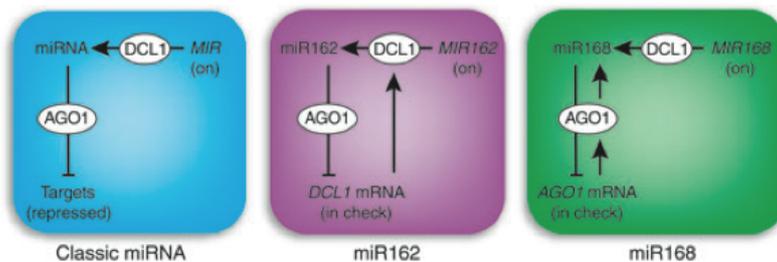
**Figura 27. Regulación de mRNAs por miRNAs en plantas.** En este diagrama, algunos miRNAs (en el centro del círculo) se encuentran agrupados según los mRNAs blancos que regulan (en la parte exterior del círculo) y sus funciones en los programas de desarrollo, respuestas adaptativas al estrés y regulación a la misma vía de miRNAs (líneas de colores). (Tomada de *Nat. Gen. Rev.*, Vol 38, 2006: S31-S35).

determina el mecanismo de acción del miRNA. Sin embargo, un mismo miRNA puede actuar a través del corte endonucleolítico o mediante la represión traduccional; dejando la interrogante de cómo las células eligen entre los dos mecanismos y como estos dos mecanismos coexisten o si mantienen una separación espacio-temporal (Brodersen *et al*, 2008).

#### 4.7.3.3 Algunos MicroRNAs que actúan mediante corte endonucleolítico.

miR159 y miR160 parecen ser los miRNAs que ejercen mayor control durante la germinación de la semilla. Ambos miRNAs afectan la germinación a través de la modulación de la sensibilidad hormonal de las semillas. Los blancos de miR159 son los factores de la transcripción *MYB33* y *MYB101*; los cuales regulan a la alta la respuesta al ácido abscísico (ABA). La sobreexpresión de miR159 en *Arabidopsis* muestra niveles reducidos de *MYB33* y *MYB101*, y las plantas exhiben sensibilidad reducida a ABA. (Pluskota, Martínez-Andújar, Martin, & Nonogaki, 2011).

DCL1 y AGO1 son dos de los actores principales en las vías de biogénesis y funcionamiento de los miRNAs. No es de sorprender que estos dos



**Figura 28. Esquema representativo de los mecanismos de regulación de miRNAs en plantas.** Tomada de Nat. Gen. Rev. 2006. Vol 38: S31-S35)

componentes se encuentren regulados mediante miRNAs. Es decir, existe una autorregulación. El mRNA de DCL1 es regulado por

miR162, mientras que AGO1 es blanco de miR168. Las plantas de *A. thaliana* resistentes a la acción miR168 (las cuales producen una AGO1 defectuosa en el sitio de unión a miR168), son enanas y estériles o mueren en las primeras etapas de desarrollo debido a la degeneración SAM. El proceso de regulación por retroalimentación de AGO1/miR168 consiste en la estabilización postranscripcional de miR168 por AGO1; después, al formar el RISC, AGO1 cataliza la regulación de su propio mRNA, permitiendo así que los niveles de

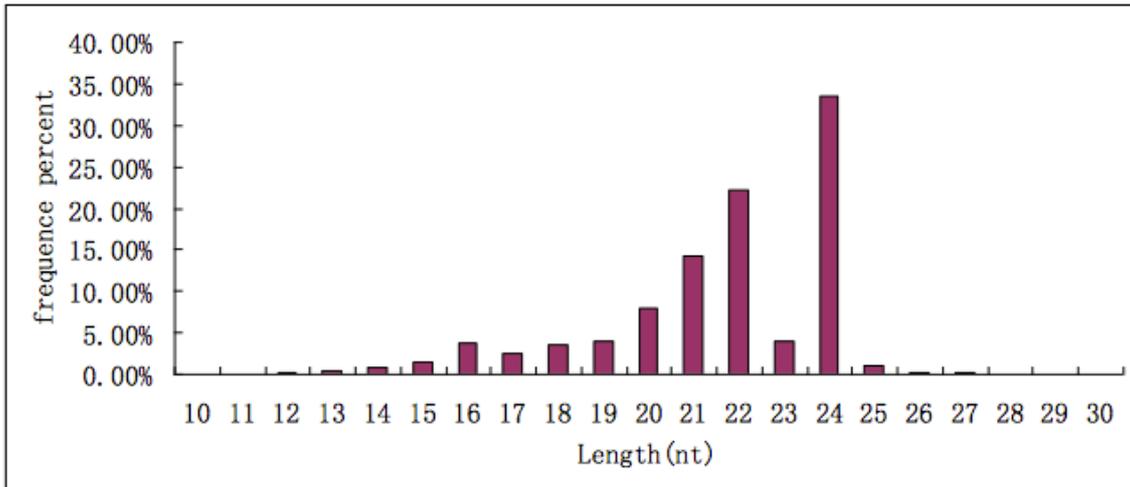
AGO1 y miR168 se mantengan bajo control. De manera similar, DCL1 media la producción de miR162, y miR162 regula a DCL1. (Mallory & Vaucheret, 2006).

Adicionalmente a los roles que juegan los miRNAs en el desarrollo de las plantas y su autorregulación, parece ser que los miRNAs también tienen importantes funciones en respuestas adaptativas durante el estrés biótico y abiótico (Mallory & Vaucheret, 2006). En semillas de arroz, durante estudios de respuesta a estrés, se identificó mediante análisis de Northern blot que al inducir las semillas a estrés mediante tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, miR528; un miRNA específico de monocotiledóneas, se encontraba regulado a la alta (Saini, Li, Jagadeeswaran & Sunkar, 2012). Aun no se ha comprobado un mRNA blanco para miRNA 528, por lo cual no se conoce el mecanismo por el cual ejerce su función; sin embargo se han predicho como sus posibles blancos proteínas involucradas en el metabolismo del cobre como una cupredoxina, multicobre oxidasa y una lacasa, las cuales juegan un rol crítico en la regulación fisiológica en procesos de respuesta al estrés (Wang *et al*, 2011). Entretanto en plantas de *A. thaliana*, miR399 no es detectable en plantas que crecen bajo condiciones normales, pero es inducido mediante condiciones de estrés con bajas concentraciones de fosfato. El blanco de miR399 es una enzima ubiquitina-conjugadora (UBC), la acumulación del mRNA de esta UBC disminuye durante las condiciones de bajo contenido de fosfato, lo cual resulta importante para la inducción del gen del transportador de fosfato AtPT1 y posteriormente disminuir la elongación de la raíz primaria (Mallory & Vaucheret, 2006).

#### **4.7.3.4 MicroRNAs en Maíz**

El número de miRNAs identificados en maíz hasta ahora es relativamente pequeño. La identificación de un set completo de miRNAs en un organismo es de fundamental importancia para entender la regulación genética mediada por miRNAs y la diversidad de RNAs pequeños (Wang *et al*, 2011).

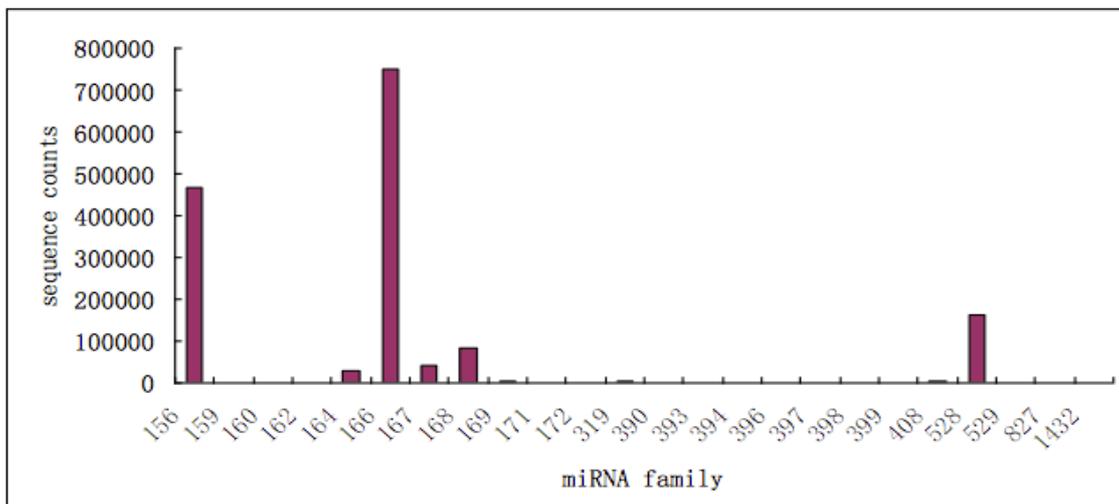
En un estudio realizado por Wang y colaboradores en 2011, mediante secuenciación masiva se llegó a la confirmación de la presencia de 115



**Figura 29.** Distribución del tamaño y abundancia de las secuencias. (Tomado de Wang *et al*, 2011)

miRNAs conocidos y el descubrimiento de 167 miRNAs nuevos en semillas de maíz 24 horas después de la imbibición. En este estudio, se encontró que el tamaño de la mayoría de los RNAs pequeños encontrados era de 24 nt (33.43% de las secuencias encontradas), relativo al total de lecturas (ver Figura 29).

Los 115 miRNAs conservados se encuentran dentro de 24 familias de miRNAs; además dichas familias mantienen una diferencia significativa si se compara la abundancia entre cada una de ellas. Hay variación en la abundancia de las familias de miRNAs, sugiriendo que los genes de miRNAs podrían ser transcritos diferencialmente en esta etapa temprana de la germinación de la



**Figura 30.** Abundancia de las lecturas de miRNAs conservados en semillas de maíz. (Tomado de Wang *et al*, 2011)

semilla. Por ejemplo, la mayoría de los miRNAs de maíz obtuvieron lecturas de menos de 1,000 veces, mientras que zma-miR167a y miR156a fueron detectados 27,634, y 374,492 veces respectivamente. La abundancia de zma-miR172 fue extremadamente baja comparada con la abundancia de zma-miR156, lo cual es consistente con reportes anteriores donde estos dos miRNAs se regulan inversamente (ver Figura 30; Wang *et al*, 2011).

La secuenciación masiva es un método muy poderoso para determinar los perfiles de expresión cualitativos y cuantitativos de las diferentes poblaciones de RNAs pequeños. En trabajos previos del laboratorio; se generaron cuatro bibliotecas de RNAs pequeños: de embriones inmaduros de maíz (IE), callos embriogénicos de maíz subcultivados por uno (C1), cuatro (C4), y diez meses (C10) y fueron secuenciadas en la plataforma Solexa para analizar la expresión de diferentes clases de RNAs pequeños en subcultivos de callos embriogénicos de maíz (Alejandri-Ramirez *et al.*, datos no publicados).

Las secuencias obtenidas fueron clasificadas acorde a su tamaño así como por tipo de RNA pequeño: miRNAs reportados, RNAs pequeños interferentes asociados a secuencias repetidas (ra-siRNAs) y RNAs pequeños interferentes no asociados a secuencias repetidas (siRNAs). La variación en la composición de las bibliotecas indica algunos cambios importantes en la producción de RNAs, especialmente para la biblioteca de C4, por lo que es probable que algunos de los componentes de la maquinaria se encuentren funcionando de manera diferente.

De manera interesante se observó que el incremento de las lecturas de miRNAs observado para las bibliotecas C4 y C10, era debido principalmente a miR398, miR408 y miR528, mientras que otros como miR169 y miR172 mostraban disminución (Alejandri-Ramirez *et al.*, datos no publicados). Adicionalmente, se había observado una falta de correlación entre los niveles de miRNAs y sus mRNAs blanco después de 6 meses de subcultivo de los callos embriogénicos de maíz, esto sugiere que la regulación de blancos se lleva a cabo mediante degradación en el caso del miR164 y sus blancos podría llevarse a cabo mediante represión traduccional, o que la maquinaria de silenciamiento se encuentre afectada.

## **5. Planteamiento del problema**

Durante la embriogénesis somática de maíz, la proliferación de células indiferenciadas puede mostrar patrones de expresión genética diferentes dependiendo del tiempo de subcultivo; es decir, dependiendo del tiempo en el que las células hayan sido sometidas a tratamientos hormonales. Los resultados de los estudios anteriores en el laboratorio en los que se evaluaron las diferencias en la expresión de diferentes familias de miRNAs, así como de los mRNAs blanco de miRNAs, sugirieron que la regulación genética a nivel de microRNAs es variable dependiendo del tiempo de subcultivo.

Aunado a esto, al buscar una correlación entre la expresión genética de los microRNAs y su mRNAs blanco, se encontró que en algunos casos la presencia de un miRNA no afecta los niveles de mRNA blanco, sugiriendo la existencia de posibles cambios en la actividad traduccional influenciados por la diferente expresión de miRNAs.

## **6. Hipótesis**

Durante la embriogénesis somática de maíz existe regulación a nivel traduccional de mRNAs mediada por miRNAs.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo General**

Análisis de la regulación a nivel traduccional por miRNAs durante la embriogénesis somática de maíz.

### **7.2 Objetivos particulares**

a) Obtención de la muestra. Obtención de embriones inmaduros y callos embriogénicos de maíz a diferentes tiempos de subcultivo de dos lotes de maíz.

b) Análisis de la distribución de miR168, miR159, miR398 y miR528 en perfiles polirribosomales de embrión inmaduro y callos embriogénicos de diferentes tiempos de subcultivo.

c) Evaluación de los niveles de acumulación de mRNAs blancos de miRNAs a nivel de RNA total y por su distribución en perfiles polirribosomales mediante RT-PCR.

## 8. Materiales y Métodos

### 8.1 Embriogénesis somática de maíz

#### Materiales

Todas las soluciones se prepararon usando agua desionizada estéril.

#### Composición del medio

Todos los medios se prepararon justo antes de usarlos y pueden ser almacenados un máximo de tres semanas a 4°C.

- **N6I (Medio de Iniciación)**

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

- **N6P (Medio de Proliferación)**

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

#### Material biológico

### **Embriones inmaduros de maíz.**

Se utilizaron embriones de 15-18 días después de la polinización de dos variedades de maíz ( *Zea mays L.* ): Costeño y Tuxpeño. Las muestras se obtuvieron mediante la recolección de las mazorcas dieciocho días después de la polinización

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

#### **Soluciones**

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

Nota: Todo el material de laboratorio usado debe ser esterilizado con anticipación.

Previo a la desinfección, se retiraron las hojas a las mazorcas y se fragmentan en porciones de 6 a 8 cm dependiendo del tamaño total de la mazorca.

En campana de flujo laminar (previamente limpiada con alcohol al 70%); se colocaron los fragmentos de mazorca en un recipiente y se agregó la solución de etanol al 70% agitando suavemente durante un minuto. Se decantó el etanol y enjuagó con agua desionizada estéril. Posteriormente, se adicionó una solución de cloro al 50% y agitó suavemente durante 15 minutos. Finalmente, se decantó la solución de cloro y se enjuagó 3 veces con abundante agua desionizada estéril.

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

Con ayuda de un pinza larga se colocó un fragmento de mazorca en un vidrio o caja Petri. Con bisturí se retiró en hilera una porción del grano (aproximadamente la  $\frac{1}{4}$  parte del total del grano). Se extrajeron los embriones y colocaron en una caja Petri, adicionando agua desionizada estéril y Cefotaxima

(lo equivalente a 0.1U de una jeringa de insulina). Con pinzas, se colocaron los embriones en el medio N6I; 30 embriones por caja Petri. Al final, se envolvieron las cajas Petri con plástico y almacenaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en cámara de cultivo en oscuridad por 3 semanas (los cultivos deben observarse cada 3 o 4 días; si aparece alguna contaminación, los embriones no contaminados se rescatan y se colocan en una nueva caja con medio N6I).

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

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

## **8.2 Perfiles Polirribosomales**

### **Materiales**

Todas las soluciones y equipo usado en este protocolo deben estar libres de RNasa. El material de vidrio, pipetas, tubos y soluciones deben ser esterilizados en autoclave por 15 minutos. Cada una de las reacciones deben realizarse o trasladarse en hielo a  $4^\circ\text{C}$  y todas las soluciones deben prepararse con agua desionizada.

Para preparar la muestra, el tejido debe ser introducido directamente en nitrógeno líquido y se debe mantener congelado. La pulverización del tejido se debe realizar en un mortero y pistilo de porcelana esterilizado previamente en horno a  $200^\circ\text{C}$ .

Los tubos de policarbonato (Beckman) deben ser lavados previamente con peróxido de hidrógeno 2.5% (v/v).

### **Soluciones y Reactivos**

- Sacarosa (Grado Analítico; Sigma-Aldrich).
- Heparina (100 µg /mL) (Sigma-Aldrich) \*Inhibidor de RNAsas

### **Buffer de lisis**

- 200 mM TRIS-HCl (pH 8.5)
- 50 mM KCl
- 25 mM Mg Cl<sub>2</sub>
- 2 mM Etilen glicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético/ (EGTA).

La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos y se almacena a 4°C.

Antes de usar se adiciona:

- 50 µg /mL Ciclohexamida \*Inhibidor de la síntesis de proteínas
- 0.5 mg /mL Heparina
- 0.5 µl /mL RNAsin

Por cada 6 mL de buffer se agrega:

- 120 µl Poliexietilen 10 tridecil eter (PTE)
- 40 µl β-mercaptoetanol [14.3 M]
- 60 µl Nonidet P40

### **Buffer de colchón y gradiente**

- 50 mM TRIS-HCl (pH 8.5)
- 25 mM KCl
- 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>

La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos y se almacena a 4°C.

Antes de usar se adiciona:

- 50 µg /mL Ciclohexamida
- 0.5 µl /mL RNAsin

### **Soluciones de Sacarosa**

Se utilizaron 2 soluciones de sacarosa al 15 y 60%; ambas se prepararon con el buffer de colchón.

### **Aislamiento de polisomas**

El aislamiento de polisomas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Davis y Abe, 1995, con algunas modificaciones. Se maceraron 5 g de muestra congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  en mortero manteniendo la muestra congelada con nitrógeno líquido, en todo momento se debe mantener la muestra congelada hasta formar un polvo fino blanco. Se transfirió la muestra a tubo Falcon de 50 mL y se mezcló con 25 mL de Buffer de lisis para estabilizar los complejos ribosomales e inhibir la actividad de RNasas. Se agitó en vortex durante 1 minuto y centrifugó el homogenado a 15,000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (enfriar previamente la centrifuga) para eliminar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante con pipeta Pasteur estéril. Para obtener un precipitado enriquecido en subunidades ribosomales, monosomas y polisomas, se prepararon los tubos de policarbonato para ultracentrífuga con 4mL de solución de sacarosa al 60%. El sobrenadante se vació lentamente sobre las paredes de los tubos con la solución de sacarosa para formar dos fases, los tubos se llenaron dejando 2-3 cm del borde. Cada tubo debe pesar exactamente lo mismo; de no ser así, durante la ultracentrifugación los tubos pueden colapsar y perderse la muestra. Se ultracentrifugó (rotor de ángulo fijo 75Ti) a 45, 000 rpm durante 3 hr a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se decantó el sobrenadante y posteriormente se agregó 500 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC y se resuspendieron los precipitados y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Gradiente de sacarosa y separación de polirribosomas**

En tubos para ultracentrifugación en rotor de columpio (SW40), se preparó un gradiente continuo de sacarosa 15-60%, agregando 5 mL de solución de sacarosa al 60% y posteriormente con extrema precaución, se agregó sobre las paredes del tubo 5 mL de solución de sacarosa al 15%, cuidando de no mezclar las fases formadas por ambas soluciones. Lentamente, se colocaron

los tubos en una gradilla y se inclinaron en un ángulo de 90°, este último paso es extremadamente importante para la correcta formación del gradiente de sacarosa y la posterior separación de los polisomas, por lo cual se recomienda realizarlo en un lugar donde no haya movimiento y los tubos puedan permanecer estáticos. Los tubos se mantuvieron en esa posición durante 2 horas para la formación del gradiente de sacarosa; al finalizar, se regresaron a la posición vertical inicial con las mismas precauciones. Posteriormente, con cuidado se trasladaron los tubos en la gradilla para su pesado y agregar la muestra. Con pipeta Pasteur, se agregó la muestra al tubo con el gradiente formado, se debe realizar otro gradiente e igualar el peso del tubo con la muestra con H<sub>2</sub>O DEPC. Se ultracentrifugó (rotor de columpio, SW40) a 36 000 rpm durante 2 h a 4°C.

### **Preparación de Auto Density Flow para obtención y lectura de perfil polirribosomal.**

Antes de usar el Auto Density Flow (Labconco Corporation, USA), se debe limpiar con H<sub>2</sub>O desionizada y posteriormente con solución de sacarosa al 15%. Para obtener perfiles polirribosomales con 18 fracciones de 0.5 mL, se ajusta la velocidad de cambio de tubo a 27 s, velocidad del papel a 0.5 mm/s, velocidad de recolección de 2 – 2.5 y la sensibilidad de la lámpara de UV se coloca en 0.5 AUFS (absorbance units full scale) y como blanco de la lectura de absorbancia se utiliza la solución de sacarosa al 15%.

El gradiente se colectó, desde la superficie hacia el fondo en fracciones de ~500 µL en el Auto Density Flow (Labconco Corporation, USA). Simultáneamente, se midió y graficó la absorbancia a 254 nm mediante un detector de absorbancia (ISCO-UV, Lincoln, NE). Los tubos con las fracciones se colectaron y se almacenaron a -70°C.

### **8.3 Extracción de RNA de fracciones Polirribosomales.**

#### **Soluciones**

- Sulfato duodecil de sodio (SDS) al 10%

- Proteinasa K (10 mg /mL)
- Buffer de Fenol saturado (Tris-EDTA 50 mM, pH 8)
- Cloroformo – Alcohol isoamílico (49:1)
- 10 M LiCl
- Isopropanol frio
- Etanol al 70%

### **Metodología**

Se descongelaron las fracciones obtenidas en hielo a 4°C. A cada fracción se agregó 25 µL de SDS al 10% y 1 µl de Proteinasa K (10 mg /mL). Se agitaron en vortex y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregaron 250 µL de Buffer de fenol saturado y 250 µL de solución Cloroformo – alcohol isoamílico 49:1 a cada tubo. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de microfuga limpio y estéril de 1.5 mL y se repitió la extracción con fenol. Al sobrenadante se le agregaron 70 µl de LiCl 10 M y 470 µl de isopropanol frío, se mezclaron las fracciones por inversión y se incubaron durante 30-60 minutos a -20°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavaron los precipitados con 500 µl de etanol frío. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Con cuidado se removió el etanol y se dejó secar el precipitado al aire; dependiendo de la cantidad de precipitado, se resuspendió en 15-50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Finalmente, se cuantificó el RNA mediante un Nanodrop y se revisó la integridad del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa 1%.

## **8.4 Identificación de RNAs pequeños (Ensayos tipo Northern blot)**

### **Soluciones**

#### **Buffer de muestra**

- Xilencianol 0.1%
- Azul de bromofenol 0.1%

Disuelto en formamida al 100%

#### **Buffer TBE 5X 1L**

- 54 g Tris-base
- 27.5 g Ac. Bórico
- 20 mL EDTA [0.5M] pH=8.0

Disuelto en H<sub>2</sub>O DEPC

#### **Acrilamida-Bis (19:1)**

- 1 X TBE
- 7 M Urea
- Acrilamida 15%
- Bis-acrilamida 0.75%

Disuelto en H<sub>2</sub>O DEPC

#### **Metodología**

Para formar los geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15%, se inició la polimerización agregando a una solución de acrilamida/Urea TEMED 0.04% y APS 0.2% (v/v). Los geles se precorrieron a 40mA durante 30 minutos en buffer TBE 0.5x previo al cargado de las muestras; las cuales se desnaturalizaron por calor a 65°C por 5 minutos. Se cargaron 5 µl de muestra de cada fracción y se corrieron con buffer de carga por ~90 minutos a 20mA. Los RNAs pequeños migran entre los colorantes xilencianol y azul de bromofenol (Velarde, 2012). Después, el RNA en los geles se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente Hybond-N+ (Amersham) en un sistema semi-seco (Bio Rad) a 100 mA por 35 minutos en buffer TBE 0.5X. Finalmente, para fijar el RNA a las membranas, éstas fueron entrecruzadas con dos pulsos de luz UV a 1200 J por un minuto en un Stratalinker. Para la identificación de microRNAs, las membranas se pre-hibridaron en ~10 mL de la solución Ultra-Hyb Ultrasensitive Hybridization Buffer (Ambion) a 42°C por 1 hora. Después, se añadieron sondas específicas marcadas radiactivamente, con las cuales se hibridó en rotación a 42°C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron en dos ocasiones con una solución

astringente 2x SSC/ 0.1% SDS a 42°C por 30 minutos. Finalmente, las membranas se expusieron en pantallas *Phosphorimager* (GE Healthcare) y se escanearon para el análisis de autorradiografía en un equipo *Typhoon PhosphorImager* (GE Healthcare).

Nota: Para todas las muestras se unieron las dos fracciones sucesivas en una sola (por ejemplo, fracción 1 y 2 ahora representarán tan sólo 1). Para cargar en un gel la mitad de los pozos necesarios y de esta manera poder tener todas las fracciones de una muestra en una sola membrana.

### **Marcaje de sondas radioactivas**

Las sondas utilizadas consistieron en oligonucleótidos de DNA con la secuencia complementaria reversa para cada microRNA (miR159, 168, 398 y 528). Estos se marcaron radiactivamente en su extremo 5' mediante una reacción de fosforilación con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$  ATP (Perkin- Elmer) con la enzima T4 PNK (por sus siglas en inglés, Polynucleotide Kinase) (New England Biolabs).

### **Reacción de marcaje:**

- 10 pmoles      Oligonucleótido de DNA
- 1  $\mu\text{L}$           10x buffer PNK
- 2  $\mu\text{L}$            $^{32}\text{P}$ - $\gamma$  ATP (3000 Ci/mol)
- 1  $\mu\text{L}$           (T4 PNK) (10,000 U/mL)

Completar con H<sub>2</sub>O DEPC un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ .

La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora y la marca no incorporada se purificó mediante una columna de Sephadex G25, Quick Spin Oligo Columns (Roche).

## **8.5 Tratamiento con DNasa**

Se preparó la reacción para la digestión con DNasa:

- 1–8  $\mu\text{L}$  RNA de fracciones polirribosomales
- 1  $\mu\text{L}$  RQ1 RNase – Free DNase
- 1  $\mu\text{L}$  RQ1 RNase – Free DNase 1x buffer

H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para completar volumen final de 10  $\mu\text{L}$ .

Se Incubó la reacción a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se agregó 1  $\mu\text{L}$  de RQ1 DNase stop solution e incubó a 65°C por 10 min para inactivar a la DNasa y terminar la reacción.

## 8.6 Reacciones de Transcriptasa Reversa (RT)

Todas las reacciones se realizaron de la siguiente manera.

### Reacción A

- RNA (volumen que contenga hasta 1 $\mu\text{g}$ )
- 2  $\mu\text{L}$  Adaptador dT (10 $\mu\text{M}$ )

H<sub>2</sub>O DEPC hasta completar volumen final de 5  $\mu\text{L}$

Se incubó a 70°C durante 5 minutos y posteriormente se llevan las reacciones en hielo a 4°C.

### Reacción B (Mix de RT)

- 7.1  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O DEPC
- 4.0  $\mu\text{L}$  Improm- II<sup>TM</sup> buffer de reacción
- 2.4  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 1.0  $\mu\text{L}$  dNTPs mix 10 mM
- 0.5  $\mu\text{L}$  RNasin

Se mezcló la reacción en vortex y posteriormente se agregó:

- 1.0  $\mu\text{L}$  Improm-II<sup>TM</sup> Transcriptasa Reversa

Se juntaron la reacción A y B para obtener un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{l}$ . Finalmente se incubaron a 42°C por 60 minutos. Transcurrido el tiempo, se colocan en hielo para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **8.7 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) mediante Syber Green**

#### **Reacción**

- 6.25  $\mu\text{L}$  Syber Green
- 1.0  $\mu\text{L}$  Adaptadores (mix Forward & Reverse)
- 4.25  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O DEPC
- 2.0  $\mu\text{L}$  cDNA obtenido en la reacción de RT

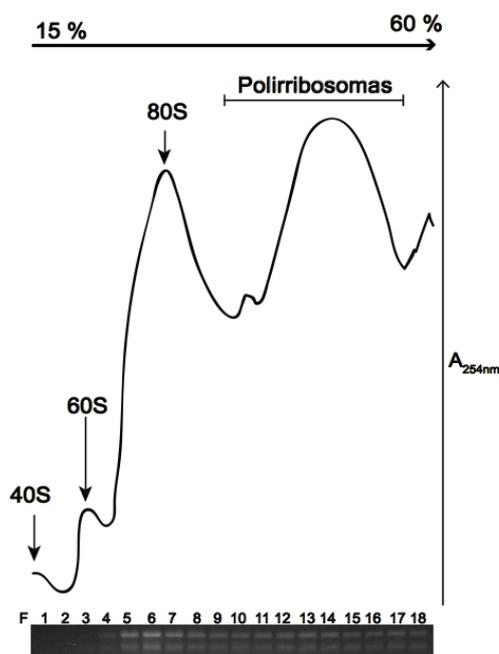
Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Bio Rad) con una temperatura de desnaturalización de 95°C, posteriormente se utilizó una temperatura de alineación de 65°C y una temperatura de extensión de 72°C. La reacción se repitió durante 40 ciclos. Posteriormente se realizaron geles desnaturalizantes de agarosa al 2.0% para visualizar los productos de la PCR.

## 9. Resultados

### I. Análisis de Perfiles Polirribosomales en gradientes de Sacarosa

Con base en los resultados obtenidos anteriormente, se abordó como primer objetivo la obtención de perfiles polirribosomales con el fin de monitorear la existencia de diferencias en la actividad traduccional global durante la inducción y propagación de los callos embriogénicos.

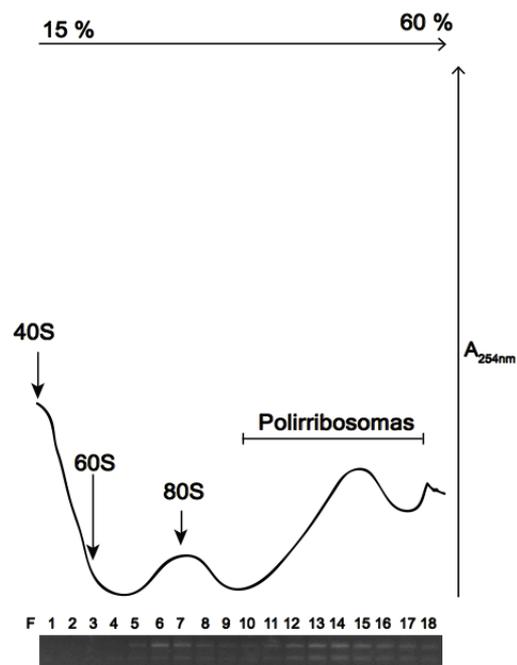
Inicialmente, se procedió a estandarizar el protocolo para la obtención de perfiles polirribosomales en ejes embrionarios después de 24 horas de germinación. Se repitió el experimento en varias ocasiones hasta obtener la resolución adecuada de subunidades ribosomales, monosomas y polirribosomas. Una vez obtenido un perfil con cuatro áreas (o picos) claramente distinguibles como se observa en la Figura 31, se procedió a revisar la integridad del RNA obtenido en cada una de las fracciones mediante electroforesis en geles nativos de agarosa 1.0%. El perfil de distribución del



**Figura 31. Perfil polirribosomal de embriones inmaduros antes de la inducción** (Arriba) Gel agarosa de fracciones polirribosomales de embrión inmaduro, la banda inferior representa a la subunidad menor ribosomal (40S) y la banda superior, la subunidad mayor (60S)(abajo).

RNA ribosomal en las fracciones se usa como referencia para identificar en qué regiones del gradiente migraron las diferentes poblaciones ribosomales. Idealmente, en los geles se puede obtener una distribución de las diferentes bandas de RNAs ribosomales con picos de abundancia que corresponden a los picos de absorbancia del perfil polisomal. Una vez identificadas las bandas de RNA ribosomal y su integridad y abundancia, nos dimos cuenta de que la concentración del RNA obtenido sería muy baja (en el mejor de los casos, la fracción mayormente concentrada en un perfil control sería de  $\approx 1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Por lo que se procedió a realizar los perfiles de

las muestras de callos embriogénicos, teniendo como limitante en todo momento la cantidad de muestra disponible para los ensayos posteriores. Se realizaron perfiles polirribosomales de dos lotes distintos de maíz debido a los grandes intervalos de toma de muestras y el tiempo que hubiese tomado comenzar la inducción de embriones y subcultivarlos hasta cumplir 24 meses de proliferación (muestra que representa el subcultivo más prolongado); siendo de un lote de maíz Costeño las muestras de embrión inmaduro, callos de 1 y 4 meses, y de un lote de maíz Tuxpeño las muestras de callos de 10, 14 y 24 meses de un lote de maíz Tuxpeño. Cabe



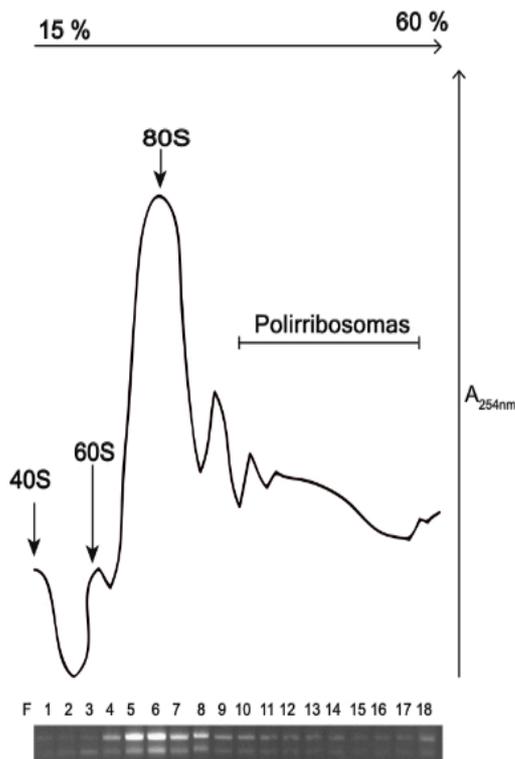
**Figura 32. Perfil polirribosomal de Callos de 1 mes después de la inducción** (Arriba) Gel agarosa de fracciones polirribosomales de embrión inmaduro, la banda inferior representa a la subunidad menor ribosomal (40S) y la banda superior, la subunidad mayor (60S)(abajo).

mencionar que el maíz Costeño, es derivado de la raza Tuxpeño, por lo que se ha utilizado indistintamente en cultivo de callos embriogénicos de maíz. No obstante los resultados de cada grupo de aislamientos serán tratados por separado. Para todas las muestras, se obtuvieron perfiles polisomales recuperados en 18 fracciones. Para todos los perfiles, las fracciones 1-2 contienen la subunidad ribosomal 40S; las fracciones 3-4 a la subunidad ribosomal 60S; las fracciones 5-8 a los ribosomas ensamblados, monosomas (compuestos por la subunidad 40S y 60S) mientras que, las fracciones 9-14 contienen los polisomas ligeros y finalmente, las fracciones 15-18 contienen los polisomas pesados (la distinción entre polisomas ligeros se realiza con base en el hecho de que no todos los polisomas tienen la misma cantidad de ribosomas ensamblados sobre un mismo mRNA).

En el perfil de la muestra de embriones inmaduros antes de la inducción (Figura 31), se observan los mayores niveles de absorbancia en comparación con los otros perfiles obtenidos. En dicho perfil, hay dos picos mayoritarios que representan a los monosomas y polirribosomas. Para la muestra de 1 mes después de la inducción (Figura 32), se obtuvo una disminución drástica de la

absorbancia en todas las fracciones a lo largo del perfil polirribosomal, a pesar de haber partido de la misma cantidad de muestra; En este caso, en las fracciones correspondientes a la subunidad ribosomal 40S se observa el mayor pico de absorbancia, mientras que no es posible distinguir el pico de 60S, ya que este se encuentra desplazado hacia 40S; interesantemente, las fracciones representativas de los monosomas muestran la menor absorbancia y el que debiese ser un pico definido se torna redondeado; para las fracciones correspondientes a los polisomas se observa un aumento en la absorbancia y un pico definido.

En el perfil obtenido para la muestra de callos embriogénicos de 4 meses de subcultivo, existe un drástico cambio respecto a los patrones traduccionales



**Figura 33.** Perfil polirribosomal de Callos de 4 meses después de la inducción. (Arriba) Gel agarosa de fracciones polirribosomales de embrión inmaduro, la banda inferior representa a la subunidad menor ribosomal (40S) y la banda superior, la subunidad mayor (60S)(abajo).

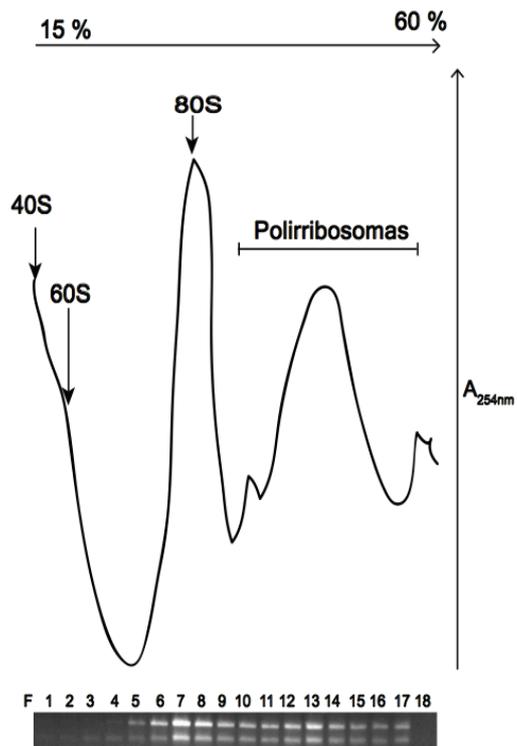
observados en el perfil de 1 mes; en este caso la absorbancia obtenida para las subunidades 40S y 60S es casi la misma (ver Figura 33), mientras que se observa un gran aumento en la absorbancia en las fracciones correspondientes al área de los monosomas; además de que existe una disminución en el área de polisomas; inclusive, no se observa un pico definido en ninguna de las fracciones de polisomas pesados; los picos en los que se observa un aumento en la absorbancia están muy cercanos al área de monosomas y comparados con la absorbancia obtenida en el pico de monosomas es mucho más baja. Como se mencionó anteriormente, el patrón del perfil polirribosomal de callos de 4 meses difiere importantemente del perfil

de callos de 1 mes, donde las fracciones correspondientes a polirribosomas se encontraban más enriquecidas que las fracciones de los monosomas, acorde al

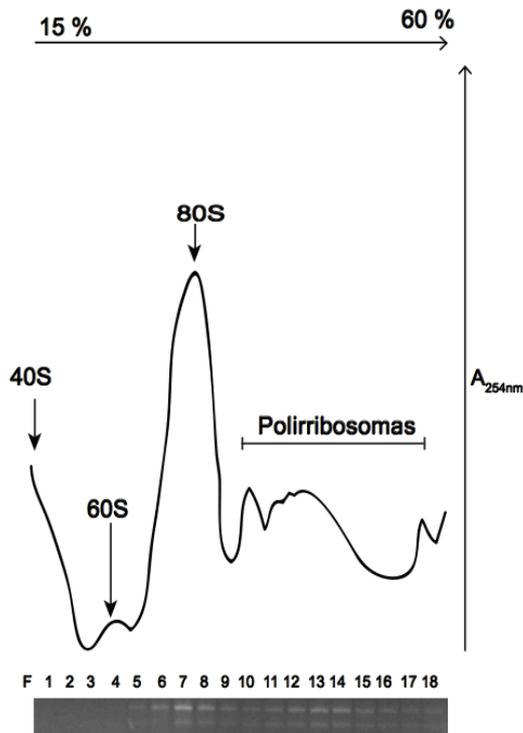
área bajo la curva de cada uno de los picos correspondientes a monosomas y polirribosomas.

Entretanto, en el perfil polirribosomal de callos embriogénicos de 10 meses de subcultivo, se puede observar un aumento en la absorbancia de las fracciones polirribosomales en comparación con los perfiles obtenidos para 1 y 4 meses de subcultivo (ver Figura 34). Se observan valores altos de absorbancia en las fracciones correspondientes a las subunidades ribosomales, sin embargo el pico de la subunidad 60S no se encuentra bien definido, mientras que el pico de monosomas es el que posee la mayor absorbancia y el pico de las fracciones polirribosomales ligeras es menor, sin embargo continua siendo alto; en este perfil polirribosomal los picos definidos de las fracciones monosomales y polirribosomales se asemejan a los patrones obtenidos en el perfil de embriones inmaduros antes de la inducción a embriogénesis somática.

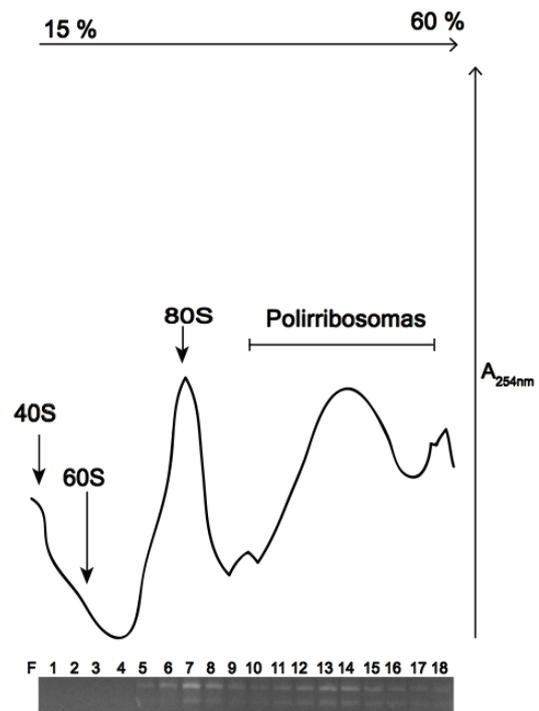
En el perfil polirribosomal correspondiente a la muestra de callos embriogénicos subcultivados durante 14 meses, las fracciones que contienen a los monosomas son las que presentan una mayor absorbancia, mientras que el área correspondiente a la subunidad ribosomal 60S se encuentra muy por debajo de los picos correspondiente a los polirribosomas (ver Figura 35); sin embargo, las fracciones que contienen los polisomas también tienen menor absorbancia que el área de los monosomas y los picos no se encuentran bien definidos.



**Figura 34. Perfil polirribosomal de Callos de 10 meses después de la inducción.** (Arriba) Gel agarosa de fracciones polirribosomales de embrión inmaduro, la banda inferior representa a la subunidad menor ribosomal (40S) y la banda superior, la subunidad mayor (60S)(abajo).



**Figura 35.** Perfil polirribosomal de Callos de 14 meses después de la inducción. (Arriba) Gel agarosa de fracciones polirribosomales de embrión inmaduro, la banda inferior representa a la subunidad menor ribosomal (40S) y la banda superior, la subunidad mayor (60S)(abajo).



**Figura 36.** Perfil polirribosomal de Callos de 24 meses después de la inducción. (Arriba) Gel agarosa de fracciones polirribosomales de embrión inmaduro, la banda inferior representa a la subunidad menor ribosomal (40S) y la banda superior, la subunidad mayor (60S)(abajo).

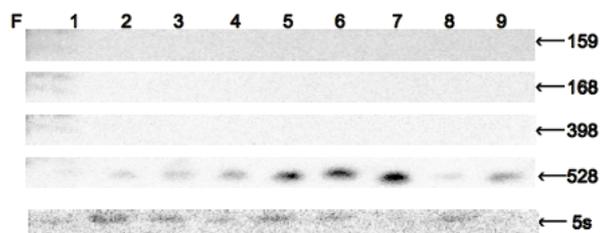
Por último en el perfil polisomal correspondiente a los callos subcultivados durante 24 meses, la menor absorbancia se obtuvo en las fracciones correspondientes a las subunidades 40S y 60S, observándose en el pico correspondiente a los monosomas una recuperación y por ende un aumento en la absorbancia (ver Figura 36); de la misma manera las fracciones que contienen a los polisomas tienen un aumento de la absorbancia que se prolonga desde el área de polisomas ligeros a pesados, ensanchando el área bajo la curva del pico de polisomas, teniendo casi la misma altura que el pico de monosomas; en este perfil el patrón obtenido es muy parecido al obtenido en los perfiles de embriones inmaduros antes de la inducción y callos de 10 meses de subcultivo.

## II. Localización de miRNAs en fraccionamientos polirribosomales de callos embriogénicos de maíz.

Una vez obtenidos los perfiles polirribosomales se realizó la revisión de la integridad del RNA de cada una de las fracciones. Para obtener una membrana

cargada con la totalidad de las fracciones se procedió a unir dos fracciones sucesivas (250µL de cada fracción), de esta manera se extrajo el RNA de 9 fracciones por cada perfil, en las que la fracción 1-2 corresponden a las subunidades ribosomales 40S y 60S, las fracciones 3-4 contienen la unidad ribosomal 80S o monosomas, las fracciones 5-7 corresponden a los polisomas ligeros y finalmente, las fracciones 8-9 contienen los polisomas pesados (ver Figura 37). Posterior a la purificación de RNA de las fracciones, se revisó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes 1%. Las muestras verificadas de RNA se sometieron a PAGE (por sus siglas en inglés, Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 15%/7M urea/TBE 0.5X, para utilizarse en ensayos de tipo northern blot para los miRNAs 159, 168, 398 y 528. Se realizaron pruebas para verificar el protocolo establecido anteriormente por Alejandri-Ramirez *et al.*, 2011; en el que se analizaba el RNA total de muestras de callos embriogénicos de maíz. Finalmente se procedió a realizar los análisis de Northern blot en las muestras de los perfiles polirribosomales cargando 5µL de muestra de cada fracción en las membranas (ver Materiales y Métodos).

Para el perfil polirribosomal de embriones inmaduros antes de la inducción de la embriogénesis somática, se obtuvo que tan sólo el miR528 se encontraba

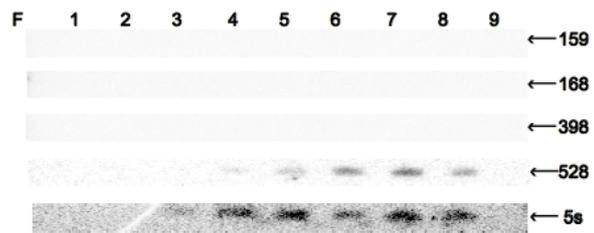


**Figura 37.** Análisis de Northern Blot de Perfil polirribosomal de Embriones inmaduros antes de la inducción de Embriogénesis somática. F: Número de fracción polirribosomal analizada (Arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las fracciones polirribosomales utilizando como control positivo el RNA ribosomal 5s.

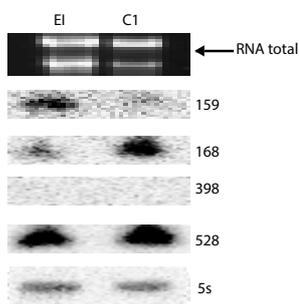
presente en las fracciones polirribosomales analizadas, teniendo una mayor presencia en las fracciones correspondientes a los polisomas ligeros respecto a las de los polisomas pesados y las fracciones correspondientes a las monosomas y subunidades ribosomales (ver Figura 37) En cuanto al perfil polirribosomal de

callos embriogénicos después de un mes de la inducción de la embriogénesis, así como en el análisis de embriones inmaduros, también se observó solamente la presencia de miR528, aunque con una distribución diferente, En este caso miR528 se encontraba desplazado hacia las fracciones correspondientes a polisomas ligeros y pesados (ver Figura 38).

Estos resultados nos hicieron pensar en que los demás miRNAs analizados podrían no haber sido detectados en los perfiles polisomales, debido a su ausencia o bajos niveles en las muestras, por lo que se decidió realizar extracción de RNA total de embriones inmaduros y callos de



**Figura 38.** Análisis de Northern Blot de Perfil polirribosomal de Callos embriogénicos de 1 mes. F: Número de fracción polirribosomal analizada (Arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las fracciones polirribosomales utilizando como control positivo el RNA ribosomal 5s.

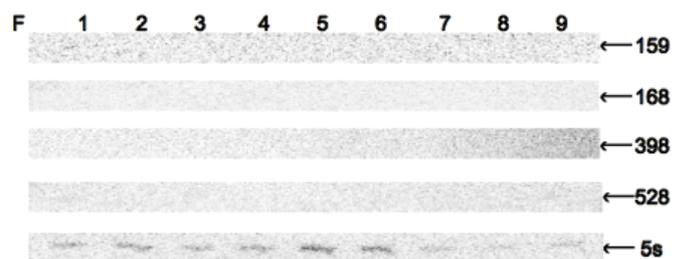


**Figura 39.** Análisis de Northern Blot de RNA total de callos embriogénicos antes de la inducción y Callos embriogénicos de 1 mes. Integridad del RNA analizado (arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las muestras utilizando como control positivo el RNA

1 mes (idealmente se deseaba realizar este procedimiento para todas las muestras analizadas en perfiles polirribosomales; sin embargo, debido a la poca cantidad de muestra obtenida a lo largo de la recolección y subcultivo no fue posible realizarlo). El análisis de Northern Blot de ambas muestras, indicó la presencia de de miRNA 159, 168 y 528, pero no de miR398 (ver Figura 39). De esta manera, pudimos establecer que al menos para las muestras de callos embriogénicos y callos de 1 mes, los miRNAs 159 y 168 se encontraban presentes, pero no en fracciones

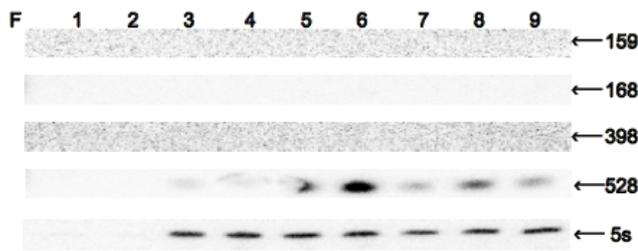
polisomales. Además se observaron diferencias en los

niveles de miR159 y miR168 entre embrión inmaduro y callos de 1 mes. Mientras que



**Figura 40.** Análisis de Northern Blot de Perfil polirribosomal de Callos embriogénicos de 4 meses. F: Número de fracción polirribosomal analizada (Arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las fracciones polirribosomales utilizando como control positivo el RNA ribosomal 5s.

miR159 es más abundante en embrión inmaduro, miR168 incrementa mucho más sus niveles en la muestra de callos de 1 mes. Por otro lado, miR528 está altamente expresado en ambas muestras.

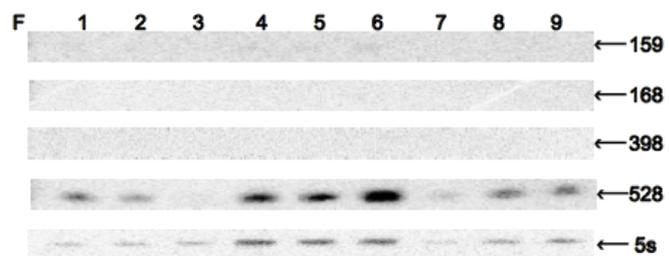


**Figura 41** Análisis de Northern Blot de Perfil polirribosomal de Callos embriogénicos de 10 meses. F: Número de fracción polirribosomal analizada (Arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las fracciones polirribosomales utilizando como control positivo el RNA ribosomal 5s.

Para el análisis del perfil polirribosomal de callos de 4 meses después de la inducción, no se identificó ningún miRNA en las fracciones del perfil polisomal (ver Figura 40). Para esta muestra se realizaron múltiples repeticiones cambiando de sonda marcada

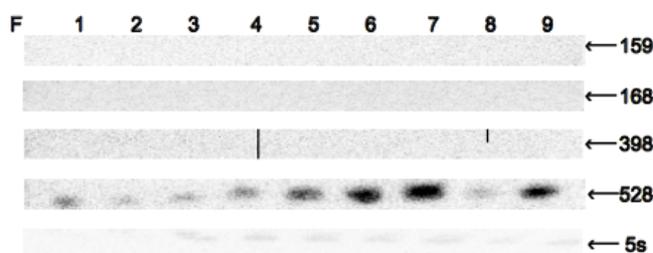
y de membrana, pensando que probablemente se tratase de un error en la realización de la metodología; sin embargo en cada una de las repeticiones se obtuvo el mismo resultado, la ausencia completa de todos los miRNAs analizados.

En los análisis de Northern Blot realizados para las muestras del perfil de callos embriogénicos de 10 meses, se obtuvo un resultado casi idéntico al obtenido en la



**Figura 42.** Análisis de Northern Blot de Perfil polirribosomal de Callos embriogénicos de 14 meses. F: Número de fracción polirribosomal analizada (Arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las fracciones polirribosomales utilizando como control positivo el RNA ribosomal 5s.

muestra de embriones inmaduros antes de la inducción. Se observa la presencia de miR528 a lo largo de las fracciones correspondientes a los monosomas y polisomas (ver Figura 41), sin embargo la mayor concentración



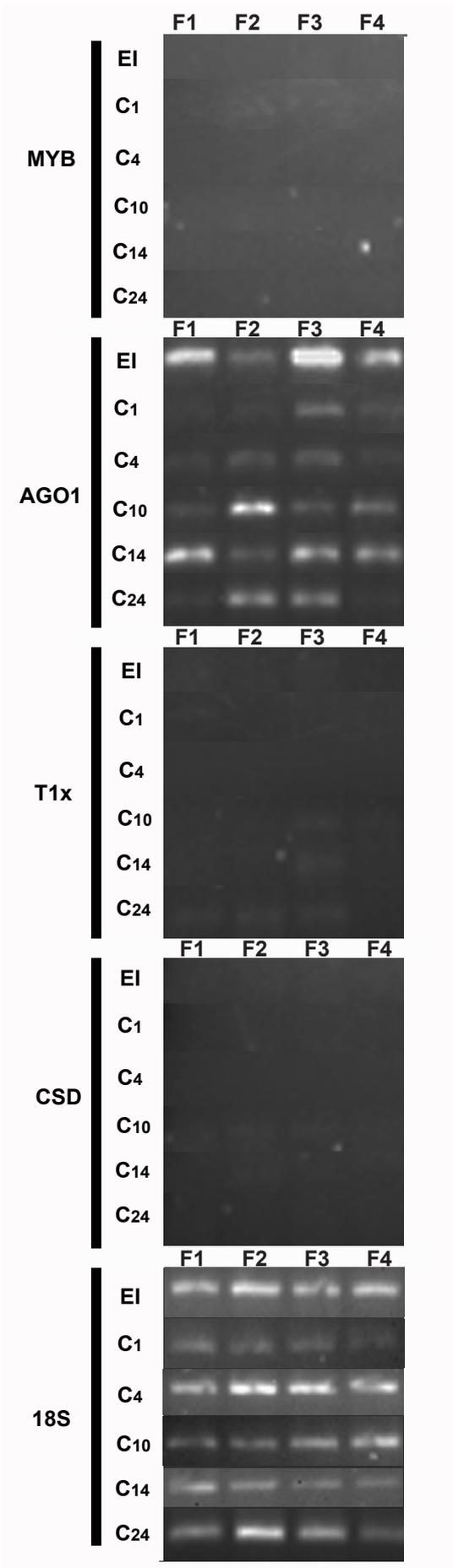
**Figura 43.** Análisis de Northern Blot de Perfil polirribosomal de Callos embriogénicos de 24 meses. F: Número de fracción polirribosomal analizada (Arriba). Los números a la derecha representan los miRNAs analizados en cada una de las fracciones polirribosomales utilizando como control positivo el RNA ribosomal 5s.

se encuentra en las fracciones correspondientes a los polisomas ligeros. De la misma manera que en los perfiles polisomales analizados anteriormente, los otros miRNAs analizados no fueron observados en las fracciones polirribosomales.

Una vez más, en las fracciones analizadas del perfil polirribosomal de 14 meses, el patrón de distribución de miR528 cambia; en dicho perfil se observa una mayor presencia de este miRNA en algunas de las fracciones correspondientes a monosomas y a polisomas ligeros (ver Figura 42); Curiosamente, en este perfil se lograron observar señales tenues de miR159 en las fracciones 4-6. Cabe mencionar que hasta el momento no se ha reportado que este miRNA ejerza regulación para sus blancos a nivel traduccional. Por último, en el análisis realizado para el perfil polirribosomal de callos embriogénicos de 24 meses se puede observar que miR528 nuevamente cambia su distribución hacia polisomas pesados. Este comportamiento podría ser indicativo de una regulación cíclica ejercida por este miRNA durante el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz. Sería muy interesante dilucidar el comportamiento de los mRNA blanco de miR528 tanto a nivel de RNA polisomal como a nivel de RNA total. Al igual que en la mayor parte de los perfiles, no se encuentra la presencia de miR159, 168 y 398, al menos a nivel de RNA de perfiles polirribosomales.

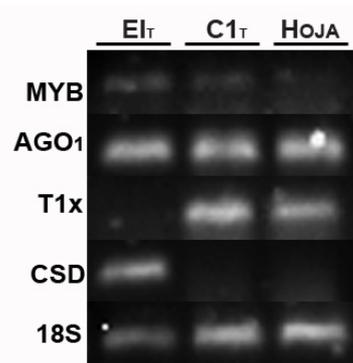
### **III. Presencia de mRNAs blanco de miRNAs en fraccionamientos polirribosomales de callos embriogénicos de maíz.**

Como tercer y último objetivo, se realizó el análisis de la presencia de los mRNAs blanco de los cuatro microRNAs analizados en fracciones polirribosomales y a nivel de RNA total al menos para las muestras de embrión inmaduro y callos de 1 mes. Cabe mencionar que tres de los cuatro miRNAs analizados tienen un mRNA blanco confirmado: miR159, miR168 y miR398. Los mRNAs blancos predichos para miR528 varían y aun no existe un consenso sobre un blanco que pudiese confirmarse. Sin embargo, los trabajos realizados con anterioridad en el laboratorio, mediante alineamiento de secuencias buscando la complementariedad con la secuencia de miR528, brindaron una serie de blancos que resultan los mejores candidatos al menos en maíz (ver Tabla V). Aun así, se debe recordar que al menos para miR528, el blanco elegido es solamente una predicción.



Para el análisis de la abundancia de los mRNAs blanco, se tomaron las 9 fracciones de cada perfil polirribosomal utilizadas en los ensayos de Northern blot. En todos los casos se dividieron las fracciones en cuatro áreas definidas por el perfil polirribosomal (ver Figuras 31-36): El área de subunidades ribosomales (fracciones 1 y 2); el área de monosomas (fracciones 3 y 4); área de polisomas ligeros (fracciones 5, 6 y 7) y el área de polisomas pesados (fracciones 8 y 9). Se obtuvieron cuatro fracciones finales de cada perfil. Posteriormente, se procedió a eliminar el DNA en las muestras tratandola con enzimas endonucleasas de DNA y se realizó la retrotranscripción del RNA contenido en cada una de las fracciones para obtener el cDNA que se utilizó para realizar la amplificación de los fragmentos de los mRNAs mensajeros blanco de miRNAs mediante PCR.

**Figura 44. Presencia y distribución de mRNAs blanco de miRNAs en callos embriogénicos de maíz.** F1-4: Número de fracción en el perfil polirribosomal. MYB: fragmento de mRNA de Factor de transcripción MYB, blanco de miR159. AGO1: fragmento de mRNA de Argonauta1, blanco de miR168. T1x: fragmento mRNA blanco predicho para miR528. CSD: fragmento de mRNA de superóxido dismutasa de cobre, blanco de miR398. EI:Embrión inmaduro; C1-24: Callos embriogénicos de 1-24 meses. 18S: Control de carga



**Figura 45. Presencia y distribución de mRNAs blanco de miRNAs en RNA total** EI<sub>T</sub>: Embrión inmaduro. C1<sub>T</sub>: Callos 1 mes. MYB: fragmento de mRNA de Factor de transcripción MYB, blanco de miR159. AGO1: fragmento de mRNA de Argonauta1, blanco de miR168. T1x: fragmento mRNA blanco predicho para miR528. CSD: fragmento de mRNA de superóxido dismutasa de cobre, blanco de miR398. 18S: Control de carga.

En ninguna de las muestras obtenidas de fracciones correspondientes a perfiles polisomales se observó la amplificación de MYB, blanco de miR159 (ver Figura 44). Sin embargo a nivel de RNA total se puede observar el fragmento amplificado de MYB en la muestra de embrión inmaduro y callos de 1 mes (ver Figura 45).

Para el fragmento amplificado de AGO1, mRNA blanco de miR168, se observaron niveles mayores en F3 (polisomas ligeros) para las muestras de EI, C1 y C4. En el caso de C10, AGO1 está presente más en monosomas, en C14 nuevamente se observa en F3 y F4 (polisomas), así como en F1 (no polisomas). En C24, AGO1 es detectada en F2

y F3 (monosomas y polisomas ligeros). Este comportamiento sugiere que el mRNA de AGO1 cambia sus niveles traduccionales durante la inducción y subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz. Por otra parte a nivel de RNA total no se observaron diferencias en los niveles de AGO1 entre EI y C1 (Figura 45) apoyando la regulación traduccional de este mRNA durante la inducción de callos.

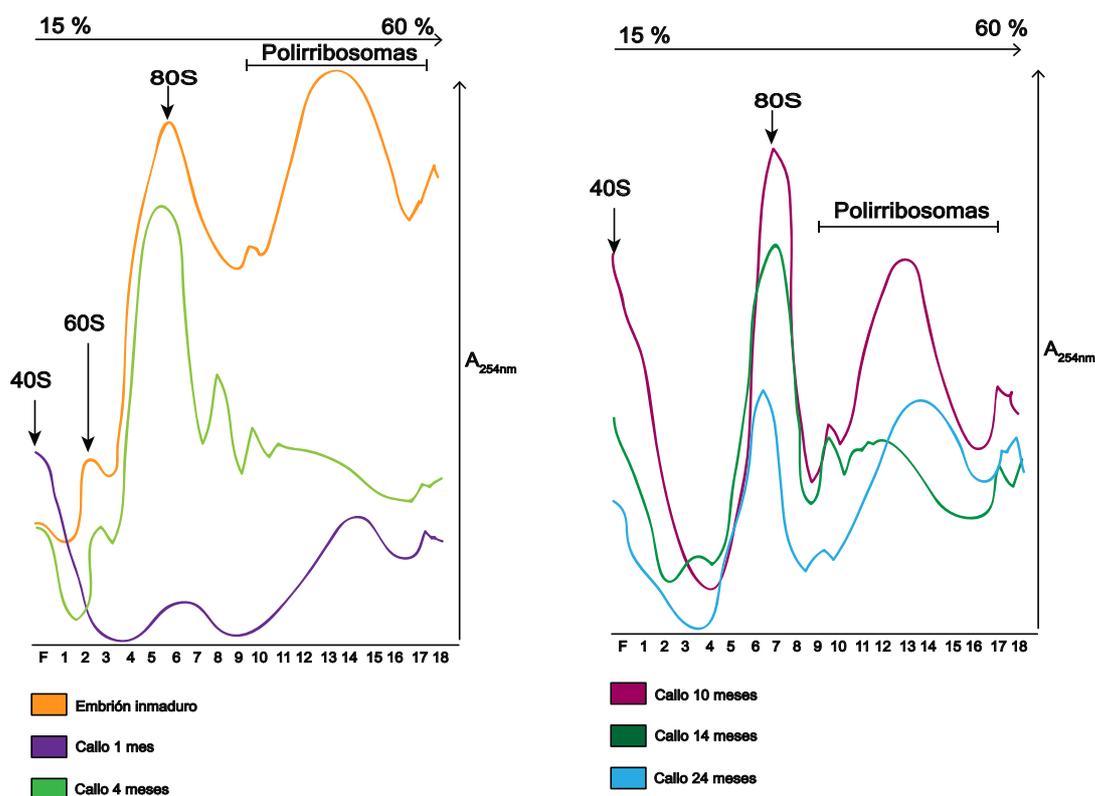
Para el fragmento del blanco propuesto para miR528 (nombrado T1x; ver Figura 44), solamente se puede observar una banda del tamaño del fragmento amplificado en las fracciones 2 y 3 de las muestras de callos de 10 y 14 meses, en la muestra de callos de 24 meses se observan bandas de amplificación en las tres primeras fracciones (F1-3). Mientras que a nivel de RNA total, se encuentra presente en la muestra de callo de 1 mes y hoja (ver Figura 45). El blanco de miR398: CSD, sólo fue amplificado en las fracciones de los perfiles de callos de 14 y 24 meses. Curiosamente a nivel de RNA total, CSD incrementa sus niveles en a en la muestra de callos de 1 mes (ver Figura 45).

**Tabla V. mRNAs blanco de miRNAs**

miRNA	mRNA blanco seleccionado	Complementariedad entre el blanco (target) y miRNA
<b>miR159</b> (zma-miR159a)	<b>MYB</b> (GRMZM2G139688)	<pre> MYB 5' U           C           A 3'       GGAGCUCCCUUCA UCCAAG       UCUCGAGGGAAGU AGGUUU miR159 3' G           U           5'           </pre>
<b>miR168</b> (zma-miR168a)	<b>AGO1</b> (GRMZM2G039455)	<pre> AGO1 5' U           G           C 3'       UCCCGA CUGCACCAAGC       AGGGCU GACGUGGUUCG miR168 3' C           A           CU 5'           </pre>
<b>miR398</b> (zma-miR398a-3p)	<b>CSD</b> (GRMZM2G058522)	<pre> CSD1 5' G           C           U 3'       CGGGGGU GCCUGAGAACACA       GCCCCCG UGGACUCUUGUGU miR398 3'           C           5'           </pre>
<b>miR528</b> (zma-miR528a-5p)	<b>MCO</b> (GRMZM2G148937)	<pre> MCO 5' C           C           3'       CUCCUCUGC UGCCUCUUUCA       GAGGAGACG ACGGGGAAGGU miR528 3'           U           5'           </pre>

## 10. Discusión

Con base en todos los resultados obtenidos, surgen muchos aspectos interesantes a analizar. En primer lugar y de manera general, se observa que a lo largo de la inducción y proliferación de los cultivos de callos embriogénicos de maíz, existen cambios drásticos en la actividad traduccional (ver Figura 46). Uno de los cambios mas notables ocurre durante el inicio de la inducción (callos embriogénicos de 1 mes). Es de esperarse que al inicio de la inducción existan grandes cambios genéticos y regulatorios que permitan la obtención de células somáticas indiferenciadas capaces de dividirse y formar los callos embriogénicos, por lo que sería lógico esperar un reajuste en la maquinaria traduccional como la que se observa en el perfil de callos de 1 mes. Aunado a esto, las células se encuentran sometidas a altos niveles de estrés por la manipulación de los embriones y las nuevas condiciones a las cuales se tienen



**Figura 46. Comparación de patrones traduccionales entre las muestras de los lotes de maíz utilizados durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos.** (Izquierda) Perfiles polirribosomales de las muestras obtenidas del lote de maíz Costeño correspondientes a Embrión inmaduro, callos de 1 y 4 meses. (Derecha) Perfiles polirribosomales de las muestras obtenidas del lote de maíz Tuxpeño correspondientes a callos de 10, 14 y 24 meses.

que enfrentar al mantenerse en medios de cultivo con condiciones completamente diferentes a las que tenían dentro de las semillas en la mazorca. El comportamiento del perfil de callos de 1 mes puede deberse a varios aspectos. En primer lugar, las fracciones obtenidas para este perfil fueron las que mostraron menor concentración de RNA, lo cual puede explicar la drástica caída en los niveles de actividad traduccional, sin embargo las condiciones de obtención de los perfiles y extracción de RNA fueron las mismas, por lo que las bajas concentraciones de RNA pueden ser debidas a una disminución en la actividad traduccional global, en la que se mantiene detenida o es más lenta la formación de complejos ribosomales que inicien la traducción y probablemente la actividad observada en el área polisomal sea resultado de los complejos ribosomales y polisomales formados antes de la inducción de la embriogénesis somática. También, el pico observado en polisomas pesados podría deberse a grandes complejos ribonucleoprotéicos detenidos en su traducción (gránulos de estrés) o incluso de degradación (cuerpos de procesamiento) (Bailey-Serres *et al*, 2009). Por otro lado, a 4 meses de subcultivo los callos embriogénicos ya se encuentran acondicionados al medio y muestran mejores niveles de proliferación que los callos de 1 mes. Curiosamente, en cuanto a las características fenotípicas de los callos embriogénicos, es hasta después de los cuatro meses de subcultivo cuando los callos comienzan a tener ese aspecto completamente blanquecino o amarillo tenue y una menor muerte celular reflejada en menores áreas donde el tejido se observa dañado de color café oscuro y sin la dureza característica de los callos embriogénicos de maíz. E importantemente, es en estos tiempo de subcultivo donde se tiene una real capacidad de proliferación de los lotes de callos embriogénicos; es decir, después de los cuatro meses se puede duplicar la cantidad de callos obtenidos en cada subcultivo. Con los resultados obtenidos en el perfil de callos de cuatro meses, podemos inferir que en este punto, se recupera la actividad traduccional de nuevos complejos ribosomales, lo cual puede sugerir que se ha iniciado la producción de nuevos mRNAs listos para traducirse, siendo el pico correspondiente al área monosomal (ver Figura 46) el que tiene mayor actividad y se observan picos correspondientes a las áreas traduccionalmente activas. Con todos estos resultados, sugerimos que son necesarios varios subcultivos para que los cultivos que se someten a

embriogénesis somática puedan en primer lugar reprogramarse, después adaptarse y poder proliferar. Importantemente, se debe recordar que los medios utilizados se encuentran enriquecidos con ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) y aun cuando continuamos sin entender el papel directo de esta auxina sintética durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos, es claro que sus efectos pueden verse reflejados indirectamente o directamente (no lo sabemos) en la actividad traduccional de los diferentes tiempos de subcultivo de callos embriogénicos de maíz.

En el laboratorio de cultivo de tejidos, los callos embriogénicos de maíz son mantenidos en subcultivos hasta por más de dos años conservando la capacidad de regenerar plantas. Sin embargo, morfológicamente puede comenzar a observarse un incremento en la proporción de tejido oxidado, no embriogénico, e incluso disminución en la capacidad regenerativa. También se ha observado entre plantas regeneradas a partir de callos subcultivados por más de dos años una mayor proporción de aberraciones fenotípicas. Sin embargo, la capacidad proliferativa, no parece verse afectada por largos períodos de subcultivo. En este contexto, en el análisis de perfiles polisomales para callos de 10, 14 y 24 meses se esperaba observar un restablecimiento de la actividad traduccional en las áreas de polisomas, lo cual corresponde la proliferación acelerada en estas muestras. En efecto, en el perfil obtenido para los callos de 10 meses tanto el área de inicio de la traducción (monosomas) como la de las fracciones traduccionalmente activas (polisomas) se encuentran con picos altamente definidos, siendo el área de los monosomas la que tiene mayor actividad con respecto al área de subunidades ribosomales y polisomas, en donde también se observa niveles altos de actividad en comparación con los perfiles de 14 y 24 meses. Parece ser que en la muestra de 10 meses, no sólo se ha restablecido la actividad traduccional, sino que además la presencia de niveles altos de subunidades ribosomales nos hace suponer que la maquinaria de traducción se encuentra en su estado de mayor actividad, desde el reclutamiento de mRNAs por la subunidad 40S, el ensamblaje de nuevos complejos ribosomales y la traducción activa en los polirribosomas (ver Figura 46). Hasta este punto se podría pensar que las células de los callos embriogénicos se han adaptado y pueden seguir proliferando hasta que se

sometan a regeneración donde sufrirán nuevamente cambios y reprogramación para regresar a su estado diferenciado y producir una planta. Esta aseveración podría confirmarse con la ausencia de cambios fenotípicos aparentes en los cultivos prolongados de callos embriogénicos. Sorprendentemente, al analizar el perfil de callos de 14 meses, se pueden observar nuevamente cambios en la actividad traduccional (ver Figura 46). Existiendo una caída en la actividad de las fracciones traduccionalmente activas (área de polisomas) y las correspondientes a las subunidades ribosomales respecto al área de monosomas. En el perfil obtenido para callos de 24 meses se restablece la actividad traduccional en el área de polisomas al menos al mismo nivel que el área de monosomas, mientras que las fracciones correspondiente a las subunidades se encuentra en menor proporción respecto a las otras fracciones (ver Figura 46). Sin embargo, con la información obtenida mediante los perfiles polirribosomales no es posible establecer una ruta de los eventos exactos que ocurren durante cada subcultivo de los callos embriogénicos. Aun así nos brindaron mucha información sobre los patrones traduccionales que se siguen a lo largo de la embriogénesis.

El interés principal del trabajo era analizar la participación de miRNAs en regulación de la traducción durante embriogénesis somática. Los datos obtenidos de la secuenciación indicaban que unos pocos miRNAs eran enriquecidos durante los subcultivos, por lo que se realizó el análisis de miR528, miR159 y miR398. Se incluyó miR168 por las implicaciones que podría tener su rol en toda la maquinaria de biogénesis de miRNAs y porque se había observado un aumento de este miRNA particularmente durante la inducción y establecimiento de los callos embriogénicos, pero en subcultivos prolongados había disminución drástica de sus niveles.

La presencia de miR528 en las fracciones de todos los perfiles exceptuando el de cuatro meses, parece indicar que al menos, durante la embriogénesis somática miR528 es requerido dentro de los complejos traduccionales, ya que aun cuando cambia su distribución, se observa preferentemente en las fracciones correspondientes a los complejos ribosomales ya ensamblados o en los polisomales. Acorde a este tipo de distribución, se puede sugerir que miR528 realiza al menos parte de su función a nivel traduccional. Numerosos trabajos en animales han demostrado que la presencia de miRNAs en perfiles

polisomales es indicativa de su rol en la inhibición traduccional de sus mRNA blanco (Fabian M. & Sonenberg N, 2012). En plantas, esto ha sido demostrado para algunos miRNAs (Voinnet, 2009). Para miR528 este sería el primer reporte de actividad a nivel de regulación traduccional. Es difícil explicar la ausencia de miR528 en las fracciones del perfil de callos de 4 meses. Lamentablemente no se contaba con muestra de callos de 4 meses para obtener RNA total y verificar la presencia de miR528. Sin embargo, los datos de secuenciación y Northern blot realizados previamente con otros lotes de callos de 4 meses indicaban altos niveles de miR528 en RNA total. Otra posibilidad interesante sería que miR528 necesita a AGO1 para ejercer su función a nivel de inhibición traduccional. Acorde a los resultados mostrados en las Figuras 34 y N, en la muestra de callos de 4 meses bajan de manera importante los niveles de mRNA para AGO1, y su presencia en polisomas lo cual podría implicar menores niveles de proteína. Los mRNA blanco de miR528 no se conocen con certeza para maíz. Existen reportes en arroz y caña de azúcar que identifican a una multicobroxidasa y una lacasa como blancos para miR528 (Sun, 2012). Sin embargo para maíz los análisis bioinformáticos arrojaron los blancos GRMZM2G148937 (Fostatasa alcalina) y GRMZM5G839518 (secuencia con dominio multicobroxidasa, MCO). El análisis de blancos para miR528 en el genoma de maíz (<http://www.maizesequence.org/index.htm>) utilizando el programa RNAhybrid 2.2 De los candidatos obtenidos, se seleccionó Tx1 (GRMZM2G148937), por mostrar una mejor complementariedad. El fragmento seleccionado en la predicción como mRNA blanco de miR528 sólo se observa en los cultivos prolongados de 10, 14 y 24 meses en algunas de las fracciones y a nivel de RNA total en la muestra de callos de 1 mes y hoja. Esto sugiere que los niveles de mRNA para Tx1 son bajos en las muestras analizadas, lo cual podría ser debido a la misma acción de miR528. Por otra parte, es posible que miR528 regule a otros mRNAs blanco a nivel traduccional. Resultaría interesante poder establecer el mRNA blanco, puesto que con los resultados obtenidos en este análisis se tiene un miRNA candidato para ejercer su efecto inhibiendo la traducción de su mRNA blanco. Además, miR528 se ha relacionado con regulación en eventos de estrés (Wang *et al*, 2011). Lo cual podría explicar su alta expresión durante la embriogénesis somática. Los resultados obtenidos

con este miR528, nos dejaron aun más dudas y preguntas que las planteadas al inicio de la investigación, lo cual nos permite establecer futuras líneas de investigación centradas en miR528.

Debido a la ausencia de miR159 y miR168 en los perfiles de todas las muestras y su presencia en al menos las dos muestras analizadas de RNA total, sugerimos que el mecanismo por el que actúan mayoritariamente estos miRNAs sea mediante el corte de sus mRNAs blancos. Interesantemente la expresión de ambos miRNA a nivel de RNA total es diferente, habiendo una disminución en la expresión de miR159 y de forma inversa un aumento de miR168 al inicio de la inducción, así como con los bajos niveles de AGO1 (blanco de miR168) en los primeros meses de subcultivo de callos embriogénicos. No siendo así para miR159, donde en los resultados obtenidos de la secuenciación masiva muestran un aumento de miR159 después de la inducción. Esto sugiere que no sólo existen cambios en la expresión de miRNAs durante la embriogénesis somática, sino que además estos cambios son dependientes del fondo genético del lote de maíz usado. En cuanto a miR398, al no observar su presencia a nivel de RNA total ni en los perfiles polirribosomales (ver Figura W). Pensamos que probablemente no podamos identificarlo debido a su disminuida expresión durante la embriogénesis somática, lo cual pudiese ser resultado de que miR398 actúa en respuesta al estrés oxidativo y durante la embriogénesis somática existe una gran producción de especies reactivas de oxígeno al inhibir la fotosíntesis (Yu & Wang, 2010) mediante la suplementación con sacarosa y las condiciones de oscuridad total en las que se mantienen los callos embriogénicos. Por lo cual, los niveles de miR398 debiesen ser bajos, de esta manera se puede aumentar la expresión de sus mRNAs blanco, las Super Oxido Dismutasas de cobre (CSD1 y 2) y así poder contener todo el estrés oxidativo al cual se encuentran expuestos los callos embriogénicos. Lo ideal hubiese sido analizar su presencia a nivel de RNA total en todas las muestras, ya que pudiese ser el caso que solamente no se encuentre presente en la muestra antes de la inducción (embriones inmaduros) y después de la inducción (callos de 1 mes), pero que su expresión aumentará en cultivos más prolongados a nivel de RNA total y que al menos actuase mediante el corte endonucleolítico de sus blancos. En el único caso donde es congruente la ausencia de miR398 y la presencia de su

mRNA blanco, es en la muestra de embriones inmaduros a nivel de RNA total (ver Figura 39 y Figura 45). Sin embargo, una vez iniciada la inducción, los niveles de mRNA de CSD disminuyen en su totalidad al menos en RNA total de callos de 1 mes y durante los siguientes subcultivos en los perfiles polirribosomales, lo cual parece indicar que el mRNA de CSD no se encuentra traduciéndose activamente, por lo que el mecanismo de protección contra el estrés oxidativo probablemente no se esté llevando por medio de las CSD. Sin embargo, para poder probar la ausencia de actividad de estas enzimas, se deben analizar los niveles de expresión del producto proteico de este mRNA.

AGO1, el mRNA blanco miR168 se encuentra presente en la muestras de RNA total de E1 y C1, pero no se pudo analizar en muestras de C4 y C10. Datos previos indicaban disminución del mRNA para AGO1 durante los primeros subcultivos y en perfiles polirribosomales (ver Figura 44). En los perfiles polisomales se observaron bajos niveles de AGO1 en la muestra de C1 y C4, sobre todo en las fracciones correspondientes a polisomas, mientras que en embrión inmaduro y los subcultivos prolongados este mRNA se encuentra presente abundantemente en las fracciones de polisomas. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos mediante la secuenciación masiva, en donde se observa un aumento de lecturas correspondientes a miRNAs en los cultivos prolongados. Ya que un aumento en la abundancia de miRNAs requerirá en su mayoría a la proteína Argonata1 para poder formar el complejo RISC y ejercer la función específica de cada miRNA. Por lo que la presencia de los mRNAs de AGO1 en los complejos traduccionales es indispensable para su mayor expresión a nivel de proteína, sería importante corroborar los niveles de proteína Argonata1 en los diferentes tiempos de subcultivo. Por otro lado, la distribución del mRNA de AGO1 en las fracciones polirribosomales parece tener un patrón similar a los observados en la actividad traduccional global durante todos los tiempos de subcultivo, lo cual puede ser otro indicativo de la traducción constitutiva de AGO1 en cualquier punto de la embriogénesis.

En cuanto al mRNA MYB blanco de miR159, solamente se pudo se puede identificar a nivel de RNA total en la muestra de embriones inmaduros y callos de 1 mes (Ver Figura 45), lo cual pudiese significar que al menos durante la embriogénesis somática no se encuentra traduccionalmente activo, pudiendo

deberse en parte a la presencia de miR159 a nivel de RNA total, donde probablemente se encuentre inhibiéndolo mediante el corte endonucleolítico. Finalmente, durante la realización de toda la parte experimental nos fue posible establecer puntos clave para la realización de los protocolos utilizados (ver Materiales y Métodos). Y mediante prueba y error pudimos detectar posibles errores en el diseño experimental, como el haber obtenido más muestra de cada tiempo de subcultivo para realizar todos los análisis a nivel de RNA total. Sin embargo, cada error sirvió para enriquecer la metodología aquí establecida, la cual podemos asegurar es reproducible y puede ser utilizada para futuros análisis y líneas de investigación.

## 11. Conclusiones

Durante la embriogénesis somática de maíz se producen cambios importantes en los patrones y actividad traduccional dependiendo el tiempo de subcultivo. Durante la inducción ocurre una gran disminución de la traducción, la cual se restablece a partir de los 4 meses de subcultivo y se mantiene elevada incluso en los subcultivos prolongados de dos años de proliferación.

Uno de los microRNAs más abundantes durante la embriogénesis somática de maíz, miR528, se encuentra localizado en fracciones de polisomas por lo cual, miR528 es un potencial candidato para ejercer su mecanismo de acción mediante la inhibición traduccional de su mRNAs blanco.

El mRNA correspondiente a AGO1 (blanco de miR168) cambia sus niveles y distribución en fracciones polirribosomales durante los subcultivos de callos embriogénicos de maíz. Durante la inducción y establecimiento del cultivo disminuye su presencia en polirribosomas, mientras que en subcultivos prolongados aumenta en las fracciones traduccionalmente activas, lo cual coincide con la mayor expresión de miRNAs específicos.

Los mRNA blanco de los miRNAs mas abundantes en embriogénesis somática se encuentran a niveles muy bajos o están ausentes en las condiciones de cultivo de callos embriogénicos de maíz.

## **12. Perspectivas**

Realizar la búsqueda y comprobación experimental del mRNA blanco del miR528 mediante análisis de 5'RACE.

Realizar el análisis de la expresión de mRNAs blanco de los miRNAs de forma cuantitativa mediante qRT-PCR.

Realizar el análisis de la expresión a nivel proteína de AGO1, CSD y MYB mediante análisis de Western blot.

### 13. Bibliografía

Anderson, Edgar and Cutler, Hugh C. Races of Zea Mays: I. Their Recognition and Classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol. 29, No. 2 (Apr., 1942), pp. 69-86+88

Bailey-Serres J, Sorenson R, Juntawong P. Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Trends Plant Sci*. 2009 Aug;14(8):443-53.

Balagopal V. And Parker R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Jun;21(3):403-8.

Bonnet E., Van de Peer Y., & Rouzé P, The small RNA world of plants. *New Phytologist* 2006. 171: 451-468.

Brodersen, P. et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185–1190 (2008).

Bucher Etienne and Prins Marcel. RNA Silencing: A Natural Resistance Mechanism in Plants. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Springer, 2006. 45-72p.

Cai Hongwei. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 1. Cereals and Millets, Maize*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009; 135-139p.

Campbell Tessa N. And Choy Francis Y. M. RNA Interference: Past, Present and Future. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2005. Vol.7: 1-6.

Chapman Elisabeth J. and Carrington James C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, 2007. Vol. 8: 884-896

Che, Ping; Love, Tanzy M. Frame, Bronwyn R. Wang, Kan; Carriquiry, Alicia L. Howell, Stephen H. Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol Biol* (2006) 62:1–14

Chen X. microRNA biogenesis and function in plants. *Federation of European Biochemical Societies*, 2005. 579: 5923–5931.

Chen Xuemei. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2009. Vol.25: 21-44.

Chu, Chih-Ching. Wang, Ching-Chu. Sun, Ching-San. Hsu, Chen. Yin, Kwang-Chu. Chu, Chih-Yin. And Bi, Feng-Yun. Establishment Of An Efficient Medium

For Anther Culture Of Rice Through Comparative Experiments On The Nitrogen Sources. *Journal Science China Mathematics*. 1975; V.18: 659-668p.

Colasanti, J., Yuan, Z., and V. Sundaresan. The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell*. 2009; 93: 593–603p.

Craig Nancy L., Cohen-Fix Orna, Green Rachel, Greider Carol W, Storz Gisela, Wolberger Cynthia. *Molecular Biology. Principles of Genome function*. Oxford University Press. 2010.

Curtis, Helena; N. Barnes, Sue; Schnek, Adriana. *Biología*. 7ª. Ed. Editorial Médica Panamericana, 2008. 890 p.

Davies E, Stankovic B, Vian A, Wood AJ. Where has all the message gone? *Plant Sci*. 2011 Apr;185-186:23-32.

Davies E and Abet S. Methods for Isolation and Analysis of Polyribosomes. *Methods In Cell Biology*. Vol. 5 Chapter 15. Academic Press. Inc, 1995 .

Doebley J. F and Iltis H.H. Taxonomy of *Zea* (Gramineae): a subgeneric classification with key to taxa. *Am J Bot*. 1980; 67(6):982–993p.

Doebley, J. F. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica*. 2009; **35**: 143-150p.

Doebley JF, Gaut BS, Smith BD. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*. 2006 Dec 29;127(7):1309-21p. Review.

Duncan, D.R.; Williams, M.E.; Zehr, B.E. and Widholm, J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* (1985) 165: 322-332.

Eddy Sean R. Non-Coding RNA Genes and The Modern RNA World. *Nature Reviews Genetics*, 2001. Vol. 2: 919-929.

Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jun 5;19(6):586-93.

Flynt Alex S. and Lai Eric C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid Diversity. *Nat Rev Genet*. 2008 Vol. 9(11):831-42.

Finnegan E. Jean and Matzke Marjori A. The small RNA World. *Journal of Cell Science*, 2003. Vol.116: 4689-4693.

Garrocho-Villegas, Verónica; Jesús-Olivera, María Teresa; and Estela Sánchez Quintanar, Estela. Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration. *Plant Cell Culture Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 877, Springer Science+Business Media, LLC. 2012

González, Germán A., Pacheco, María G., Oneto, Cecilia D., Etchart, Valeria J., Kandus, Mariana V., Salerno, Juan C., Eyherabide, G., Presello, D., Lewi, Dalia M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2012. Vol. 15:1

Herrera, Jorge; Alizaga, Ramiro; Guevara, Eric; Jimenez, Victor. *Germinación y crecimiento de la Planta*. 1ª. Ed.- San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica, 2006; 56 p.

Jackson, Dave. *Handbook of Maize: Its Biology. Vegetative Shoot Meristems*. Springer Science + Business Media. 2009; 1-3p.

Jakubeková, Miroslava; Pretová, Anna; Obert, Bohuš. Somatic Embryogenesis and Plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2011. 1 (4) 478-487

Kaufmann K, Pajoro A, Angenent GC. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nat Rev. Genet.* 2010. Dec;11(12): 830-42.

Lee Tzoo-fen, Li Pingchuan, and Meyers Blake C. The Biology and Dynamics of Plant Small RNAs. *Plant Genome Diversity Vol. 1*, Springer-Verlag Wien 2012. 81-101p.

Lewin Benjamin. *Genes*. 1996. 2ª. Ed. Editorial Reverte S.A., Barcelona, España. 154-155p.

Loza-Rubio E, Rojas E, Gómez L et al (2008) Development of an edible rabies vaccine in maize using Vnukovo strain. In: Dodet B, Fooks AR, Müller T, Tordo N, Scientific and Technical Department of the OIE (eds) *Towards the elimination of rabies in Eurasia. Developments in biologicals*, vol 131. Karger, Basel, pp 477–482

Lu, C. Vasil, I. K. & Ozias-Akins, K. Somatic Embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 1982. 62: 109-112.

Mallory AC, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet.* 2006. Vol. 38(7): 850.

Márquez-Sánchez F. From creole corn varieties (*Zea mays* L.), to transgenic hybrids. I: Germplasm Collection and improved cultivars. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. Julio-Diciembre 2008. Centro Regional Universitario de Occidente, Dirección de Centros Regionales Universitarios, Universidad Autónoma Chapingo.

Mateos Julieta L., Bologna Julieta L., and Palatnik Javier F. Biogenesis of Plant microRNAs. Non Coding RNAs in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. 252-264p.

Matranga Christian, Zamore Phillip D. Small silencing RNAs. Current Biology, 2007. Vol. 17(18): R789-93

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez G J, Buckler E, Doebley J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 30;99(9):6080-4.

Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJ, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J. Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, 106:18843–18848.

Nardmann, Judith and Werr, Wolfgang. Handbook of Maize: Its Biology. Patterning of the Maize Embryo and the Perspective of Evolutionary Developmental Biology, 2009. Springer Science + Business Media, LLC, J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.). 105-107p.

Perkins D.O., Jeffries C. and Sullivan P. Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. Molecular Psychiatry (2005) 10, 69–78.

Pluskota W. E. , Martínez-Andújar C., Martin R. C., and Nonogaki H. MicroRNA Function in Seed Biology. Non Coding RNAs in Plants. RNA Technologies. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. 340-352p.

Anónimo, 1557. Popol vuh. Ed. Panamericana, 1997; 104p

Ross Michael H. and Pawlina Wojciech. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 2007 5ª. Ed., Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 48p.

R. van der Krol Alexander, Mur Leon A., Beld Marcel, N.M. Mol Joseph,' and Stuitje Antoine R. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. The Plant Cell, 1990. Vol. 2, 291-299

Sadava David [et. al.]. Vida / Life: *La ciencia de la biología / The Science of Biology*. 8ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009. 638-639, 797 p.

Saini A., Li Y., Jagadeeswaran G., and Sunkar R. Role of microRNAs in Plant Adaptation to Environmental Stresses. MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. Signaling and Communication in Plants Vol.15. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012; 219-232.

Saito K, Miyoshi K., Siomi C., & Siomi H, The Key Features of RNA Silencing. RNA Technologies and Their Applications, RNA Technologies. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010. 2-23 p.

Sánchez de Jiménez, Estela; Dinkova, Tzvetanka D. y Reyes de la Cruz, Homero. Mecanismos De Control Traduccional En La Germinación De Maíz. 2005. Mensaje Bioquímico, Vol. XXIX. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO.

Sanchez G. J. J. And Goodman M. M. Relationships among the Mexican Races of Maize. Economic Botany. Vol. 46, No. 1 (Jan. - Mar., 1992), pp. 72-85

Sánchez G. J. J. 2011. Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto "Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México" Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Manuscrito.

Springer Nathan M. Epigenetics and crop improvement. Trends in Genetics, April 2013, Vol. 29, No. 4, 247-247.

Staller, J. E. Scientific, Botanical, and Biological Research on Maize. Maize Cobs and Cultures: History of Zea mays L. Springer Berlin Heidelberg. 2010; 85-86.

Sun, Guiling. MicroRNAs and their diverse functions in plants. Plant Mol. Biol, 2012. 80: 17-36.

Sun, Lifang; Wu, Ying; Su, Shengzhong; Liu, Hongkui; Yang, Guang; Li, Shipeng; Shan, Xiaohui and Yuan, Yaping. Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays* L.) inbred line H99. 2012. Plant Cell Tiss Organ Cult (2012) 109:271–286

Sun Ying-Hsuan , Lu Shanfa , Shi Rui , and Chiang Vincent L. *RNAi and Plant Gene Function Analysis*, Methods in Molecular Biology. Computational Prediction of Plant miRNA Targets. Springer Science+Business Media, 2011; 175-176

Tang Guiliang, Xiang Yu, Kang Zhensheng, Mendu Venugopal, Tang Xiaohu, Jia Xiaoyun, Chen Qi-Jun , and Tang Xiaoqing. *Current Perspectives in microRNAs (miRNA)*, Small RNA Technologies: siRNA, miRNA, antagomiR, Target Mimicry, miRNA Sponge and miRNA Profiling. Springer Science + Business Media, 2008; 17-22.

Teale W. D., Paponov I. A. , Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Nov; 7(11): 847-59. Epub 2006 Sep 20. Review

Twyman, R. M. Control of Gene Expression, Regulation of Transcription. 2003a, GROWTH AND DEVELOPMENT. Elsevier Ltd. 558-567.

Twyman, R. M. Control of Gene Expression, Posttranscriptional Regulation 2003b, GROWTH AND DEVELOPMENT. Elsevier Ltd. 549-557.

Vaucheret Hervé, Béclin Christophe and Fagar Mathilde. Post-transcriptional gene silencing in plants. Journal of Cell Science, 2001. Vol. 114: 3083-3091.

Velarde Garduño David A. 2012. Mecanismos moleculares de la regulación por miR2199 de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en respuesta al déficit hídrico. Reporte por actividad de investigación para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Genómicas. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Licenciatura en Ciencias Genómicas Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México.

Vielle-Calzada, Jean-Philippe and Padilla, Jaime. The Mexican Landraces: Description, Classification and Diversity. Handbook of Maize: Its Biology. Springer New York. 2009; 543-544.

Voinnet Olivier. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. Cell, 2009. Vol. 136 (4): 669-687.

Vollbrecht, Erik and Schmidt, Robert J., Handbook of Maize: Its Biology. Development of the Inflorescences. Springer Science + Business Media 2009; 13p.

Wusirika, Ramakrishna. Li, Kefeng. Phillips, Ronald L. and Bennetzen Jeffrey L. Zea. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Cereals. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011; 464-465.

Wang Liwen, Liu Huaihua, Li Detao and Chen Huabang. Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. BMC Genomics 2011, 12:154

Warner J. R., Knopf P. M, Rich A. A Multiple Ribosomal Structure In Protein Synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1963 Jan 15;49:122-9.

Yu Bin and Wang Hai. *miRNA Regulation of the Translational Machinery*, Progress in Molecular and Subcellular Biology 50, Translational Inhibition by MicroRNAs in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; 48-53.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. Dev Biol. 2006; 289(1): 3-16.

